

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ

*Нарушение метилирования ДНК
при злокачественных
новообразованиях*

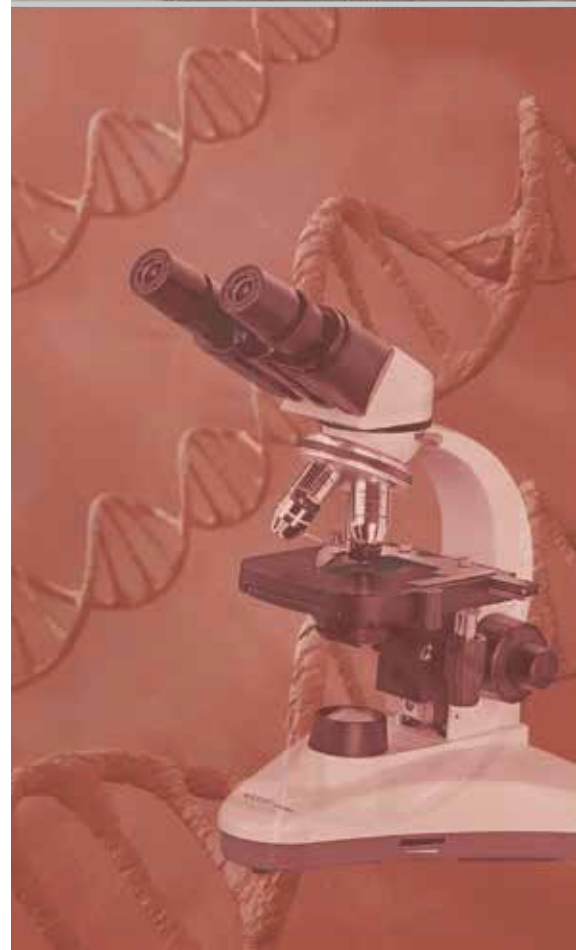
*Экспрессия длинной некодирующей
РНК PROX1-AS1 и микроРНК miR-647
при раке желудка*

*Экспрессионная гетерогенность
генов ABC-транспортёров
и генов химиочувствительности
при раке желудка*

*Мутации гена PIK3CA при раке
молочной железы с низкой
экспрессией белка HER2/neu*

*Проявления апоптоза
в субпопуляциях циркулирующих
опухолевых клеток при карциноме
молочной железы*

ТОМ 9 № 4
2022

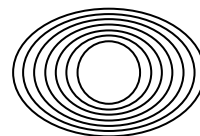


Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук. Журнал включен в Научную электронную 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 .

ПРИЛОЖЕНИЕ
ТОМ 9
4'22

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.
2022. Том 9. № 4. 1–116.

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2022.
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 рентгенодиагностики» 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)

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

Кжышковская 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)

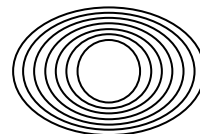
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

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

APPENDIX
4 Vol. 9
'22

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
(PII 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.
2022. Vol. 9 No. 4. 1–116.

© PH "ABV-Press", 2022
Pressa Rossii catalogue
index: 93562.

Printed at the Mail Technology Ltd
Bld. 16, 13 Perevedensky 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 University 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)

Kzhyskovskaya 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 Immunocytochemistry 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)

Jurisc 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)

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 подписными 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 подписной 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, полимерная 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.

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

<i>Г.А. Белицкий, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, М.Г. Якубовская</i> Механизмы канцерогенного действия наноматериалов	8
<i>В.П. Максимова, О.Г. Усалка, Ю.В. Макусъ, В.Г. Попова, Е.С. Трапезникова, Г.И. Хайриева, Г.Р. Сагитова, Е.М. Жидкова, А.Ю. Прус, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов</i> Нарушение метилирования ДНК при злокачественных новообразованиях	24

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

<i>Л.В. Спирина, И.В. Ковалева, С.Ю. Чижевская, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзонов</i> Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов, рецепторов стероидных гормонов, LC3В в ткани папиллярного рака щитовидной железы и связь с прогнозом заболевания и риском рецидивирования	41
<i>Е.А. Ветчинкина, А.И. Калинин, Е.Б. Кузнецова, А.Э. Киселева, Е.А. Алексеева, М.В. Немцова, И.В. Буре</i> Диагностическое и прогностическое значение экспрессии длинной некодирующей РНК PROX1-AS1 и микроРНК miR-647 при раке желудка	50
<i>D.D. Grigoreva, E.M. Zhidkova, E.S. Lylova, A.D. Enikeev, K.I. Kirsanov, G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, E.A. Lesovaya</i> Autophagy activation in breast cancer cells <i>in vitro</i> after the treatment with PI3K/AKT/mTOR inhibitors	61
<i>Н.В. Любимова, Ю.С. Тимофеев, А.В. Лебедева, Е.В. Артамонова, И.С. Стилиди, Н.Е. Кушлинский</i> Биохимические показатели в сыворотке крови больных нейроэндокринными опухолями с карциноидным синдромом	71
<i>М.М. Цыганов, И.А. Цыденова, В.А. Маркович, М.К. Ибрагимова, Е.О. Родионов, С.А. Тузиков, Н.В. Литвяков</i> Экспрессионная гетерогенность генов семейства ABC-транспортёров и генов химиочувствительности в опухоли желудка, канцероматозе и метастазах в лимфатические узлы	78
<i>И.А. Павленко, П.Е. Повилайтите, В.Ю. Кацияев, Н.С. Макаревич, А.В. Петров</i> Мутации в гене <i>PIK3CA</i> при раке молочной железы с низкой экспрессией белка HER2/neu	89
<i>В.М. Перельмутер, Е.С. Григорьева, М.В. Завьялова, Л.А. Таширева, В.В. Алифанов, О.Е. Савельева, С.В. Вторушин, Е.Л. Чойнзонов, Н.В. Чердынцева</i> Проявления апоптоза в субпопуляциях циркулирующих опухолевых клеток с фенотипами, ассоциированными со стволовостью и эпителиально-мезенхимальным переходом, при карциноме молочной железы	96

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

<i>О.Е. Андреева, Д.В. Сорокин, А.М. Щербаков, Ю.Ю. Щеголев, М.В. Гудкова, М.А. Красильников</i> Сигнальный путь микроРНК-484/Akt в регуляции чувствительности клеток рака молочной железы к противоопухолевым препаратам	112
---	-----

REVIEW

<i>G.A. Belitsky, K.I. Kirsanov, E.A. Lesovaya, M.G. Yakubovskaya</i> Mechanisms of the carcinogenicity of nanomaterials	8
<i>V.P. Maksimova, O.G. Usalka, Yu.V. Makus, V.G. Popova, E.S. Trapeznikova, G.I. Khayrieva, G.R. Sagitova, E.M. Zhidkova, A.Yu. Prus, M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov</i> Aberrations of DNA methylation in cancer	24

EXPERIMENTAL REPORT

<i>L.V. Spirina, I.V. Kovaleva, S.Yu. Chizhevskaya, I.V. Kondakova, E.L. Choyazonov</i> Expression of transcription, growth factors, steroid hormone receptors, LC3B in papillary thyroid cancer tissue, association with prognosis and risk of recurrence	41
<i>E.A. Vetchinkina, A.I. Kalinkin, E.B. Kuznetsova, A.E. Kiseleva, E.A. Alekseeva, M.V. Nemtsova, I.V. Bure</i> Diagnostic and prognostic value of long non-coding RNA PROX1-AS1 and miR-647 expression in gastric cancer	50
<i>D.D. Grigoreva, E.M. Zhidkova, E.S. Lylova, A.D. Enikeev, K.I. Kirsanov, G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, E.A. Lesovaya</i> Autophagy activation in breast cancer cells <i>in vitro</i> after the treatment with PI3K/AKT/mTOR inhibitors	61
<i>N.V. Lyubimova, Yu.S. Timofeev, A.V. Lebedeva, A.V. Artamonova, I.S. Stilidi, N.E. Kushlinskii</i> Biochemical factors in the blood serum of neuroendocrine tumor patients with carcinoid syndrome	71
<i>M.M. Tsyganov, I.A. Tsydenova, V.A. Markovich, M.K. Ibragimova, E.O. Rodionov, S.A. Tuzikov, N.V. Litvyakov</i> Expression heterogeneity of ABC-transporter family genes and chemosensitivity genes in gastric tumor, carcinomatosis and lymph node metastases	78
<i>I.A. Pavlenko, P.E. Povilaitite, V.Yu. Kaciyaev, N.S. Makarevich, A.V. Petrov</i> PIK3CA mutations in breast cancer with low HER2/neu expression	89
<i>V.M. Perelmuter, E.S. Grigorieva, M.V. Zavyalova, L.A. Tashireva, V.V. Alifanov, O.E. Saveleva, S.V. Vtorushin, E.L. Choyazonov, N.V. Cherdyntseva</i> Signs of apoptosis in circulating tumor cell subpopulations with phenotypes associated with stemness and epithelial-mesenchymal transition in breast carcinoma	96

BRIEF COMMUNICATION

<i>O.E. Andreeva, D.V. Sorokin, A.M. Scherbakov, Y.Y. Shchegolev, M.V. Gudkova, M.A. Krasil'nikov</i> MicroRNA-484/Akt axis in the regulation of breast cancer cells sensitivity to antitumor drugs	112
---	-----

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-8-23



Механизмы канцерогенного действия наноматериалов

Г.А. Белицкий¹, К.И. Кирсанов^{1,2}, Е.А. Лесовая^{1,3}, М.Г. Якубовская¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;

³ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»; Россия, 390026 Рязань, ул. Высоковольная, 9

Контакты: Марианна Геннадиевна Якубовская mgyakubovskaya@mail.ru

Наноматериалы получают все большее распространение во многих областях жизни человека, формируя новую философию техносферы и, в частности, новые подходы к получению и использованию материалов в бытовых процессах, производстве, медицине и пр. Физико-химические характеристики наноматериалов существенно отличаются от соответствующих показателей агрегатных материалов и, по крайней мере, некоторые из них – высокой реакционноспособностью и/или повышенной каталитической активностью. Это позволяет предположить их агрессивность по отношению к биологическим системам, включая участие в процессах канцерогенеза.

В обзоре рассмотрены сферы использования современных наноматериалов, при этом особое внимание уделено описанию лекарственных препаратов, произведенных с использованием нанотехнологий, приведен анализ механизмов действия тех из них, которые уже признаны канцерогенными, а также представлены имеющиеся экспериментальные и механистические данные, полученные при изучении канцерогенного/проканцерогенного действия различных групп наноматериалов, не классифицируемых в настоящее время как представляющие канцерогенную опасность для человека.

При подготовке обзора был проведен анализ публикаций информационных баз биомедицинской литературы Scopus (507), PubMed (561), Web of Science (268), eLibrary.ru (190). Для получения полнотекстовых документов использованы электронные ресурсы PubMed Central (PMC), Science Direct, Research Gate, базы данных Sci-Hub и eLibrary.ru.

Ключевые слова: наноматериалы, канцерогенез, фуллерены, генотоксичность, эпигенетическая активность, модели канцерогенеза *in vivo*

Для цитирования: Белицкий Г.А., Кирсанов К.И., Лесовая Е.А., Якубовская М.Г. Механизмы канцерогенного действия наноматериалов. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(4):8–23. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-8-23

Mechanisms of the carcinogenicity of nanomaterials

G.A. Belitsky¹, K.I. Kirsanov^{1,2}, E.A. Lesovaya^{1,3}, M.G. Yakubovskaya¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

³I.P. Pavlov Ryazan State Medical University; 9 Vysokovol'naya St., Ryazan 390026, Russia

Contacts: Marianna Gennadiyevna Yakubovskaya mgyakubovskaya@mail.ru

Nanomaterials become more widespread in the different areas of human life, forming the new technosphere philosophy, in particular, new approaches for development and usage of these materials in everyday life, manufacture, medicine etc. The physicochemical characteristics of nanomaterials differ significantly from the corresponding indicators of aggregate materials and at least some of them are highly reactive and/or highly catalytic. This suggests their aggressiveness towards biological systems, including involvement in carcinogenesis. The review considers the areas of use of modern nanomaterials, with special attention paid to the description of medicine production using nanotechnologies, an analysis of the mechanisms of action of a number of nanomaterials already recognized as carcinogenic, and also presents the available experimental and mechanistic data obtained from the study of the carcinogenic/procarcinogenic effects of various groups of nanomaterials currently not classified as carcinogenic to humans.

Preparing the review, information bases of biomedical literature were analysed: Scopus (307), PubMed (461), Web of Science (268), eLibrary.ru (190) were used. To obtain full-text documents, the electronic resources of PubMed Central (PMC), Science Direct, Research Gate, Sci-Hub and eLibrary.ru databases were used.

Keywords: nanomaterials, carcinogenesis, fullerenes, genotoxicity, epigenetic activity, models of carcinogenesis *in vivo*

For citation: Belitsky G.A., Kirsanov K.I., Lesovaya E.A., Yakubovskaya M.G. Mechanisms of the carcinogenicity of nanomaterials. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(4):8–23. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-8-23

ВВЕДЕНИЕ

Идея о том, что материалы, сконструированные из частиц с размерами, приближенными к размерам атомов, могут обладать уникальными физическими, химическими и электрическими свойствами, была впервые опубликована Ричардом Фейнманом в 1960 г. [1]. Считается, что именно его работа стала толчком к развитию нанотехнологий по получению новых материалов с уникальными свойствами, которые содержат в своей структуре элементы размерами от 1 до 100 нм хотя бы по одному измерению.

Нanomaterialы весьма разнообразны как по своему составу, так и по структуре [2]. По составу среди наноматериалов выделяют неорганические наноматериалы, аллотропы углерода и гибридные наноструктуры. Неорганические наноструктуры могут быть сформированы из металлов и их соединений, диэлектриков и полупроводников. К аллотропам углерода относят фуллерены и их производные, одностеночные и многостеночные нанотрубки, углеродные нановолокна, нанобутены, нанопену, наноалмазы, графены и некоторые другие наноструктуры (рис. 1) [3]. Из гибридных структур наибольшее распространение получили неорганические частицы в оболочке углерода.

По структуре (морфологии) наноматериалы принято подразделять на следующие группы: 1) нульмерные/квазинульмерные (квантовые точки, сфероидные наночастицы); 2) одномерные/квазиодномерные (квантовые проводники, нанотрубки, нанопроволоки, наностержни, наноленты и др.); 3) двумерные/квазидвумерные (нанопленки, поверхности разделов); 4) трехмерные/квазитрехмерные (многослойные структуры с наноразмерными дислокациями, сверхрешетки, нанокластеры) (рис. 2) [4].

Общим уникальным свойством наноматериалов является необычайно высокое отношение площади их поверхности к массе. Из частицы сажи массой 0,3 мг, размером 60 мкм и площадью 0,01 мм² изготавливается 1×10^9 наночастиц размером 60 нм с суммар-

ной площадью на 3 порядка большей, чем у исходной частицы. На поверхности сверхтонкой структуры, созданной из таких частиц, значительная часть атомов находится в поверхностном слое, и поэтому их реакционная, каталитическая и сорбционная способности могут существенно превышать соответствующие характеристики атомов внутренних слоев и тем более агрегатных состояний. По этой причине наноматериалы, соответствующие инертным агрегатным формам, могут быть агрессивными, участвовать в генерации свободных радикалов и активных форм кислорода. Кроме того, сравнимый со структурами клетки размер наночастиц и высокое соотношение максимального размера к минимальному по 3 измерениям делают возможным механическое повреждение ее структур. Помимо этого, плохая растворимость в биологических жидкостях и низкая склонность к агрегации обеспечивают их длительную персистенцию в клетке [5]. Потенциальная возможность повышенной реакционной способности наноматериалов и индукции ими механических повреждений органелл клетки обуславливает необходимость особого внимания к эффектам каждого из наноматериалов, вводимых в жизнь человека.

ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ

В последние 2 десятилетия наблюдается активный рост производства наноматериалов, преднамеренно разрабатываемых и синтезируемых для применения в оптике, электронике, механике, медицине, пищевой промышленности и других областях, и объемы их производства увеличиваются каждый год на 18 % [6]. В 2015 г. было произведено сотни тысяч тонн некоторых типов наноматериалов (рис. 3). В наибольшем количестве изготавливают 5 наноматериалов: двуокись кремния (SiO₂), двуокись титана (TiO₂), наноформы глины, окись цинка (ZnO) и окись алюминия (Al₂O₃) [6, 7].

Следует отметить, что наноматериалы как форма материи существовали и ранее, они повсюду встречаются в живой природе: в шелке и хлопке, нитях

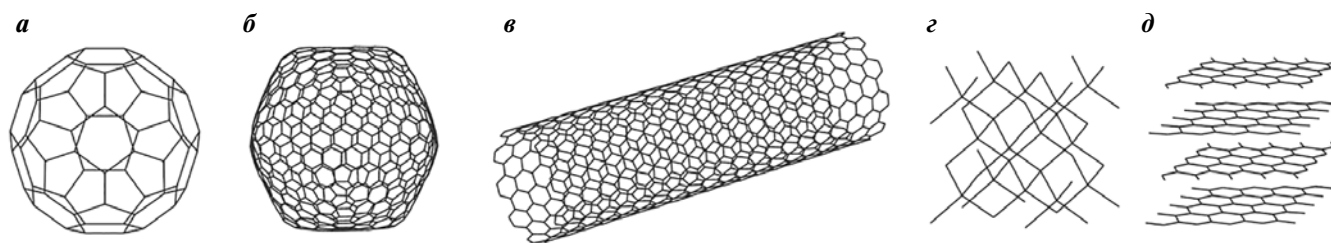


Рис. 1. Примеры аллотропов углерода: а – C₆₀-фуллерен; б – C₅₄₀-фуллерен; в – углеродная нанотрубка; г – алмаз; д – графен [3]

Fig. 1. Carbon allotrop examples: а – C₆₀-fullerene; б – C₅₄₀-fullerene; в – carbon nanotube; г – diamond; д – graphene [3]

паутины, клювах и перьях птиц, шерсти и костном матриксе животных. К неорганическим природным наноматериалам следует отнести некоторые виды глин, вулканический пепел и сажу, ряд минералов, включая тонковолокнистые минералы из класса силикатов, получившие собирательное название «ас-

бест». Эти неорганические наноматериалы представляют собой результаты термических, механических, химических и фотохимических процессов.

Искусственные наноматериалы нашли широкое применение в быту и различных отраслях экономики. Они широко используются в самой разнообразной

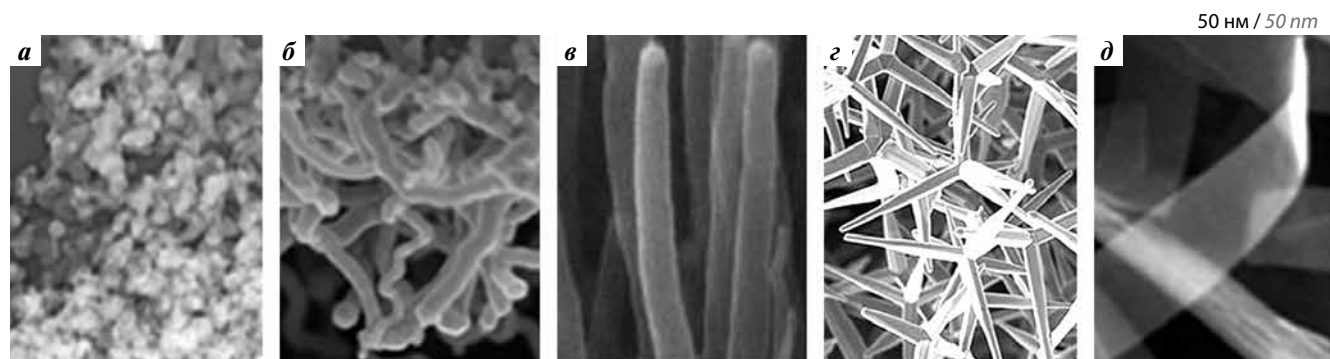


Рис. 2. Примеры наноматериалов различной морфологии: а – наночастицы двуокиси кремния; б – нанопроволоки германия; в – углеродные нанотрубки; г – нанокристаллы окиси цинка; д – наноленты

Fig. 2. Examples of nanomaterials of various morphologies: а – silicon dioxide nanoparticles; б – germanium nanowires; в – carbon nanotubes; г – zinc oxide nanocrystals; д – nanoribbons

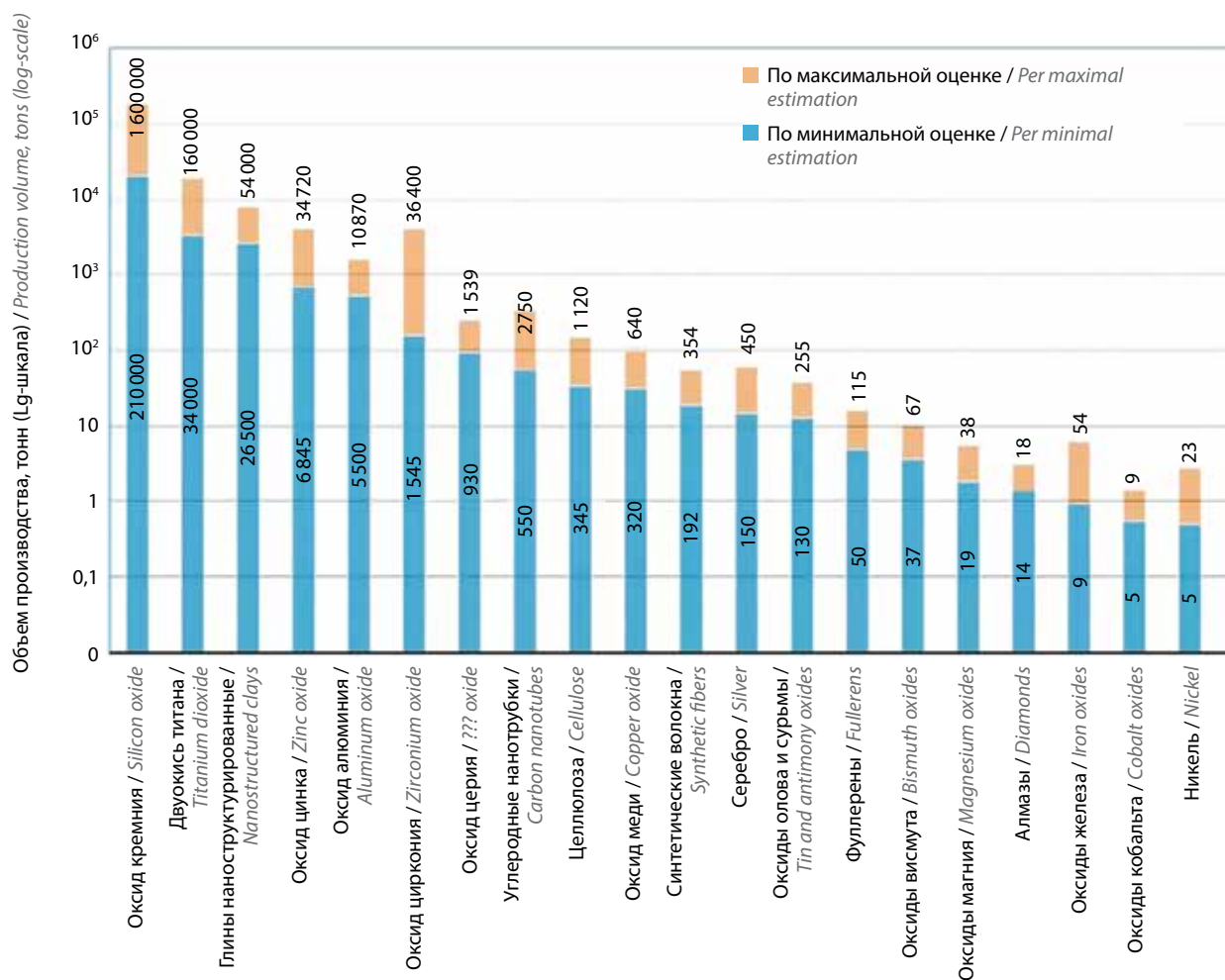


Рис. 3. Объемы производства наиболее распространенных наноматериалов в мире [7]

Fig. 1. Production volumes of the most common nanomaterials in the world [7]

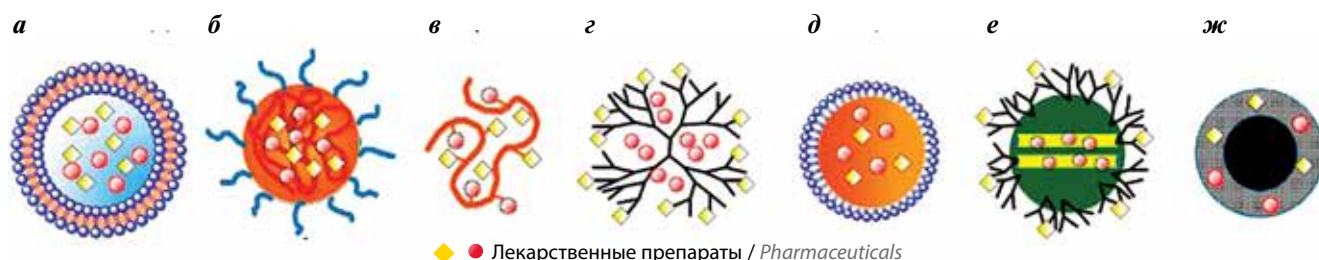


Рис. 4. Использование наночастиц при разработке новых лекарственных форм: а — липосома; б — полимерная мицелла; в — нановолокна; г — дендример; д — масляная наноэмульсия; е — мезопористая (поры 2–50 нм диаметром) наночастица окиси кремния; ж — наночастица оксида железа
Fig. 4. The use of nanocarriers in the development of new drug forms: a — liposome; б — polymer micelle; в — nanofibers; г — dendrimer; д — oil nanoemulsion; e — mesoporous (pores 2–50 nm in diameter) silicon oxide nanoparticle; ж — iron oxide nanoparticle [9]

продукции: дезинфицирующих средства, косметике, средствах личной гигиены, одежде и электронных устройствах. Серебряные и медные наночастицы придают одежде и другим текстильным изделиям антимикробные свойства; изделия легкой промышленности, покрытые наночастицами диоксида кремния или диоксида титана, приобретают водоотталкивающие и термостойкие свойства; наночастицы графена и углеродные нанотрубки широко применяются для создания легких и прочных изделий повседневного использования и т. д. [8]. Пористые наноматериалы размером 0,45–1,55 нм используют в качестве красителей, катализаторов, пористых сорбентов, фильтров, сенсоров и др. Благодаря своим физическим свойствам широкое распространение получают, например, наноматериалы в виде магнитных структур. Монокристаллические наночастицы полупроводников используют в составе композитов с полимерными матрицами в производстве светодиодов, переключателей и сенсоров для лазерной аппаратуры. В сельском хозяйстве на основе наноматериалов создают минеральные и органические удобрения, а в медицине — хирургическое и диагностическое оборудование, материалы для трансплантаций, наноформы лекарственных препаратов, биодобавок и т. д.

Важным направлением применения нанотехнологий в медицинской промышленности стало создание наночастиц, содержащих на своей поверхности различные молекулярные конструкции, что обеспечивает одновременный захват лечебного препарата путем физической адсорбции, инкапсуляции и химической конъюгации (рис. 4).

Такие многофункциональные наночастицы с таргетным и регулируемым высвобождением лечебного препарата находят все более широкое применение в клинической практике [9–14]. В числе других препаратов разработаны наноформы растительных полифенолов, использование которых ранее было ограничено из-за их низкой биодоступности [10]. В настоящее время официальное разрешение для использования в клинической практике получили многие десятки наноразмерных лекарственных препаратов (табл. 1).

Это дает возможность повышения эффективности лекарств и уменьшения их побочного действия путем

использования сверхмалых доз и адресной доставки. По такому механизму только для лечения рака предстательной железы доцетакселом разработаны его конъюгаты с наночастицами золота, титана и супермагнитного железа [15, 16]. Для лечения злокачественных новообразований, помимо традиционных противоопухолевых препаратов, конъюгированных с различными наноструктурами, в настоящее время разрабатываются наноформы микро РНК (миРНК) [17]. Их использование в терапевтических целях имеет ряд преимуществ по сравнению с принятой цитотоксической терапией. В частности, миРНК обладают мультитаргетным эффектом. Кроме того, в исходном состоянии миРНК имеют короткое время циркуляции в крови с периодом полураспада около 2 мин, тогда как в комплексе с наночастицей время жизни препарата увеличивается до нескольких часов и повышается его биодоступность. Таким образом, использование наноматериалов в качестве носителей лекарственных препаратов позволяет существенно повысить их эффективность.

КАНЦЕРОГЕННОСТЬ И ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ НАНОМАТЕРИАЛОВ В ОТНОШЕНИИ ЧЕЛОВЕКА

В связи с таким широким применением наноматериалов и активным ростом их производства актуальным стал вопрос о безопасности нанопроductов и, в частности, об их канцерогенном действии. Уверенность в наличии канцерогенных свойств у определенных синтетических наноматериалов повышает их сходство с природными неорганическими нановолокнами, из которых к безусловным канцерогенам человека (группа 1 канцерогенных факторов, согласно классификации Международного агентства по изучению рака, МАИР) отнесены хризотиовые и амфиболовые асбесты — кроцидолит, тремолит, амосит, актинолит и антофиллит [18], а также волокна фторэдинита [19]. Как показано в многочисленных экспериментах, критическими параметрами для канцерогенных свойств хризотиовых и амфиболовых асбестов являются длина, ширина, механическая прочность на изгиб и устойчивость к ферментам в биологической системе.

Необходимость оценки канцерогенного риска относится и к наноматериалам, используемым в качестве

Таблица 1. Наноразмерные лекарственные средства, разрешенные к применению [11, 12]

Table 1. List of regulatory approved nanomedicines [11, 12]

Препарат (производитель) Drug (manufacturer)	Тип лекарственного средства или носителя Type of pharmaceutical or carrier	Показания к применению Indications	Год регистрации (регуляторный орган) Registration year (regulatory authority)
Препараты, не относящиеся к противоопухолевым Pharmaceuticals not related to anti-tumor drugs			
Onpattro® (Alnylam)	Патисиран (липосомальная форма) Patisiran (liposomal form)	Врожденная форма амилоидоза Hereditary amyloidosis	2018 (FDA, EMA)
Rapamune® (Wyeth Pharmaceuticals Inc.)	Рапамицин (сиролимус входит в состав наночастиц, содержащих также маннит, микрокристаллическую целлюлозу и гидроксипропилметилцеллюлозу) Rapamycin (sirolimus is included in nanoparticles also containing mannitol, microcrystalline cellulose and hydroxypropyl methyl cellulose)	Редкая болезнь легких — лимфангиолейомиоматоз Rare lung disease lymphangioleiomyomatosis	2015 (FDA)
Ryanodex® (Eagle pharm)	Дантролен (суспензия наночастиц) Dantrolene (nanoparticle suspension)	Злокачественная гипертермия Malignant hyperthermia	2014 (FDA)
Xeplion (Johnson & Johnson)	Палиперидон (нанокристаллы пальмитата) Paliperidone (palmitate nanocrystals)	Шизофрения Schizophrenia	2011 (EMA)
Invega Sustenna® (Janssen Pharmaceuticals)	Палиперидон пальмитат (наночастицы палиперидона пальмитата) Paliperidone palmitate (paliperidone palmitate nanocrystals)	Шизофрения Schizophrenia	2009 (FDA)
EquivaBone® (Zimmer Biomet)	Гидроксиапатит (нанокристаллы) Hydroxyapatite (nanocrystals)	Материал для костной пластики Material for bone plastic surgery	2009 (FDA)
Ivemend® (Merk & Co. Inc.)	Апрепитант (антагонист рецепторов нейрокина-1, нанокристаллы) Aprepitant (neurokinin-1 receptor antagonist, nanocrystals)	Противорвотное Anti-nausea	2008 (FDA, EMA)
Focalin XR® (Novartis)	Дексаметилфенидат гидрохлорид (нанокристаллы) Dexmethylphenidate hydrochloride (nanocrystals)	Синдром дефицита внимания с гиперактивностью Attention deficit hyperactivity disorder	2008 (FDA)
Feraheme® (AMAG Pharmaceuticals, Inc.)	Ферумокситол (супермагнитные наночастицы железа) Ferumoxytol (supermagnetic iron nanoparticles)	Железодефицитная анемия Iron deficiency anemia	2007 (FDA)
Megace ES® (Par Pharmaceuticals)	Мегестрола ацетат (нанокристаллы) Megestrol acetate (nanocrystals)	Антианорексик Antianorexic	2005 (FDA)
NanOss® (RTI Surgical)	Гидроксиапатит (нанокристаллы) Hydroxyapatite (nanocrystals)	Материал для костной пластики Material for bone plastic surgery	2005 (FDA)
Ostim® (Osartis GmbH & Co.)	Гидроксиапатит кальция (нанокристаллы) Calcium hydroxyapatite (nanocrystals)	Материал для костной пластики Material for bone plastic surgery	2004 (FDA)
TriCor® (Abbott Laboratories)	Фенофибрат (суспензия наночастиц) Fenofibrate (nanoparticle suspension)	Гиперлипидемия Hyperlipidemia	2004 (FDA)
Emend® (Merk & Co. Inc.)	Апрепитант (антагонист рецепторов нейрокина-1, нанокристаллы) Aprepitant (neurokinin-1 receptor antagonist, nanocrystals)	Противорвотное Anti-nausea	2003 (FDA)
Vitoss® (Orthovita Inc.)	Бета-трикальцийфосфат (синтетическая губчатая кость, получаемая сплавлением наночастиц) Beta tricalcium phosphate (synthetic cancellous tissue produced through nanoparticle fusion)	Материал для костной пластики Material for bone plastic surgery	2003 (FDA)

Продолжение табл. 1

Continuation of table 1

Препарат (производитель) Drug (manufacturer)	Тип лекарственного средства или носителя Type of pharmaceutical or carrier	Показания к применению Indications	Год регистрации (регуляторный орган) Registration year (regulatory authority)
Ritalin LX® (Novartis)	Метилфенидат (нанокристаллы) Methylphenidate (nanocrystals)	Ингибитор обратного захвата норадреналина (норэпинефрина) и дофамина в пресинаптические нейроны Inhibitor of norepinephrine and dopamine reuptake in presynaptic neurons	2002 (FDA)
Pegasys® (Hoffmann–La Roche)	Пегилированный интерферон α-2a (PEG-конъюгация) Pegylated interferon α-2a (PEG conjugation)	Хронический гепатит В, С Chronic hepatitis B, C	2002 (FDA)
Avinza® (Pfizer Pharmaceuticals)	Сульфат морфина (нанокристаллы) Morphine sulfate (nanocrystals)	Психостимулятор Psychostimulant	2002 (FDA)
Zanaflex® (Acorda)	Тизанидин гидрохлорид (наноэмульсия) Tizanidine hydrochloride (nano-emulsion)	Миорелаксант Myorelaxant	2002 (FDA)
Rapamune® (Wyeth Pharmaceuticals Inc.)	Рапамицин (сиролимус входит в состав наночастиц, содержащих также маннит, микрокристаллическую целлюлозу и гидроксипропилметилцеллюлозу) Rapamycin (sirolimus is included in nanoparticles also containing mannitol, microcrystalline cellulose and hydroxypropyl methyl cellulose)	Иммунодепрессант Immunosuppressant	2001 (EMA), 2010 (FDA)
Epaxal® (Crucell Berna Biotech)	Инактивированный вирус гепатита А (наночастицы) Inactivated hepatitis A virus (nanoparticles)	Профилактика гепатита А Hepatitis A prevention	1993 (EMA)
Infed® (Actavis Pharma)	Наночастицы, состоящие из ядер Fe (III) оксигидроксида/оксида, экранированных углеродными оболочками Nanoparticles consisting of Fe (III) oxyhydroxide/oxide nuclei shielded by carbon coat	Железодефицитная анемия Iron deficiency anemia	1992 (FDA)
Противоопухолевые препараты Anti-tumor drugs			
Hensify® (Nanobiotix)	Наночастицы оксида гафния Hafnium oxide nanoparticles	Плоскоклеточный рак Squamous cell carcinoma	2019 (EMA)
Vyxeos® (Jazz Pharmaceuticals)	Даунорубин и цитарабин (липосомальная форма) Daunorubicin and cytarabine (liposomal form)	Острый миелолейкоз Acute myeloid leukemia	2017 (FDA), 2018 (EMA)
Lipusu® (не указан) Lipusu® (not provided)	Паклитаксел (липосомальная форма) Paclitaxel (liposomal form)	Рак молочной железы, немелкоклеточный рак легких Breast cancer, non-small cell lung cancer	2016 (FDA)
Lipodox® (Sun Pharma Global FZE)	Доксорубин гидрохлорид (липосомальная форма) Doxorubicin hydrochloride (liposomal form)	Метастатический рак яичников, саркома Капоши Metastatic ovarian cancer, Kaposi sarcoma	2013 (FDA)
Mepect (Takeda France SAS)	Мифамуртид (липосомальная форма) Mifamurtide (liposomal form)	Остеогенная саркома Osteogenic sarcoma	2009 (EMA)
Marqibo® (Talon Therapeutics)	Винкристин (в качестве субстрата-носителя использованы наночастицы на основе сфингомиелина и холестерина) Vincristine (sphingomyelin and cholesterol-based nanoparticles are used as substrate carrier)	Миелоидный лейкоз Myeloid leukemia	2012 (FDA)

Окончание табл. 1

The end of table 1

Препарат (производитель) Drug (manufacturer)	Тип лекарственного средства или носителя Type of pharmaceutical or carrier	Показания к применению Indications	Год регистрации (регуляторный орган) Registration year (regulatory authority)
Oncorine™ (H101) (Shanghai Sunway Biotech Co., Ltd)	Онколитический рекомбинантный аденовирус (PEG-конъюгация) Oncolytic recombinant adenovirus (PEG conjugation)	Опухоли головы и шеи Head and neck tumors	2005 (CFDA)
Abraxane® (Abraxis BioScience, LLC/Celgene Corporation)	Паклитаксел (наноразмерные агрегаты альбумина с нековалентно связанным Ptx) Paclitaxel (nanosized aggregates of albumin with non-covalently bound Ptx)	Метастазирующий рак молочной или поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого, рак печени Metastatic breast and pancreatic cancer, non-small cell lung cancer, liver cancer	2005 (FDA)
Eligard® (Tolmar Pharmaceuticals Inc.)	Лейпролид ацетат (в качестве субстрата-носителя использованы поли-DL-лактат-гликолевые наночастицы) Leuprolide acetate (poly-DL-lactic acid-glycol nanoparticles used as substrate carrier)	Рак предстательной железы Prostate cancer	2002 (FDA)
Doxil®/Caelyx™ (Johnson & Johnson)	Доксорубицин (липосомальная форма) Doxorubicin (liposomal form)	Ассоциированная с синдромом приобретенного иммунодефицита саркома Капоши, рак молочной железы, яичников, множественная миелома Kaposi sarcoma associated with acquired immunodeficiency syndrome, breast cancer, ovarian cancer, multiple myeloma	1995 (FDA)
Doxil® (Johnson & Johnson)	Доксорубицин (адриамицин) (липосомальная форма) Doxorubicin (adriamycin) (liposomal form)	Метастатический рак яичников, саркома Капоши Metastatic ovarian cancer, Kaposi sarcoma	1995 (FDA), 1996 (EMA)
Oncaspar® (Enzon Pharmaceuticals Inc)	Конъюгат L-аспарагиназы с олиэтиленгликолем (липосомальная форма) L-asparaginase and polyethylene glycol conjugate (liposomal form)	Острый лимфолейкоз, острый миелолейкоз Acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia	1994 (FDA), 2016 (EMA)

Примечание. FDA — Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration); EMA — Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency); CFDA — Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств Китая (China Food and Drug Administration).

Note. FDA — Food and Drug Administration; EMA — European Medicines Agency; CFDA — China Food and Drug Administration.

носителей для таргетной терапии онкологических и аутоиммунных заболеваний, при которых применяются генотоксические препараты, способные вызывать у излеченных пациентов вторые злокачественные опухоли. Кроме того, в отдельных случаях для изготовления наноматериалов используются и элементы с доказанной канцерогенностью для человека, такие как кобальт и никель, по классификации МАИР относящиеся к группе 1 [20].

Латентный период развития опухолей у работников канцерогенноопасных производств довольно

большой: более 15–20 лет непрерывного стажа. В случае индукции мезотелиом у работавших с асбестом этот период мог достигать 40 лет [21]. В связи с этим мы пока не имеем достаточных эпидемиологических данных для оценки канцерогенности наноматериалов для человека, поскольку в настоящее время находимся на раннем этапе развития нанотехнологических производств. Тем не менее накапливающиеся сведения о ранних изменениях у работников, непосредственно занятых в разработке или производстве некоторых наноматериалов, свидетельствуют о высокой

вероятности повышения канцерогенного риска [22, 23]. Так, у сотрудников предприятия ООО «Нанотех-Центр» (Тамбов, Россия), на котором производятся многослойные углеродные нанотрубки, по размеру соответствующие MWCNT-7 и волокнам асбеста, были обнаружены ранние маркеры поражения дыхательной системы, приводящие к воспалению и фиброзу. В слювах носа, мокроте и сыворотке крови выявлено значительное повышение уровня воспалительных цитокинов: интерлейкина 1 β , интерлейкина 6, фактора некроза опухоли α (TNF- α) и гликопротеина MUC1, высокое содержание которого наблюдается при интерстициальных пневмониях с исходом в фиброз легких [24].

Масштабное исследование, проведенное на образцах крови и мокроты у 108 рабочих из 12 центров нанопроизводства США, также выявило изменение биомаркеров, связанных с окислительным стрессом, воспалением, фиброзом легких и онкологическими заболеваниями. В мокроте были изменены уровни коллагеназы типа IV, интерлейкина 18 (IL-18), глутатионпероксидазы (GPx), миелопероксидазы и супероксиддисмутаза (SOD), матричных металлопротеиназ 9 и 2, а в сыворотке крови — ингибитора металлопротеиназы 1 (8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина), GPx, SOD, эндотелина-1, фибриногена и белка адгезии клеток сосудов [22].

На Тайване у рабочих, занятых производством наноматериалов из оксидов металлов, в лейкоцитах обнаружено значительное снижение общего метилирования ДНК по сравнению с контрольной выборкой, что было обратно пропорционально уровню 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина — маркера окислительного повреждения ДНК [25].

Еще в одном исследовании у небольшой группы разработчиков, экспонированных к наноматериалам в среднем в течение 14 лет, были обнаружены значительные изменения в профилях метилирования ДНК. Наиболее сильные изменения CpG выявлены в генах, участвующих в метаболизме липидов, регуляции иммунной системы, детоксикации ксенобиотиков и канцерогенезе. Самым характерным было гипометилирование 341 локуса CpG и гиперметилирование локуса 364 [26].

В другом исследовании у работников, занятых в производстве многослойных нанотрубок, не было выявлено значительных изменений в глобальном метилировании ДНК, но наблюдались выраженные изменения метилирования отдельных сайтов CpG в промоторах генов ДНК-метилтрансферазы (DNMT1), серин/треониновой протеинкиназы (ATM), необходимых для процесса репарации, гена SKI, участвующего в регуляции сигнального пути трансформирующего фактора роста β (TGF- β) и деацетилазы гистонов HDAC4, изменяющей конформацию хроматина [27].

В эксперименте на культуре эпителиальных клеток бронха человека было показано, что цитотоксический и цитогенетический эффекты, связанные с экспрессией провоспалительных цитокинов, окислительным стрессом, образованием микроядер и двунитевыми

разрывами ДНК, вызывают нанотрубки большой длины, как единичные, так и их агломераты [19, 28]. Наличие металлов в волокнах асбеста является одним из объяснений его канцерогенных свойств. В первую очередь это касается двухвалентного (Fe²⁺) и трехвалентного (Fe³⁺) железа, с которыми связывают генотоксические и цитотоксические эффекты. Аналогичным образом наличие биодоступного железа на поверхности нанотрубок связано с окислительным стрессом и воспалительными реакциями [29–32]. В связи с отсутствием прямых эпидемиологических данных о канцерогенности многослойных углеродных нанотрубок MWCNT-7 на основании данных молекулярной эпидемиологии о проканцерогенных изменениях в ткани легких и плевры эти наноматериалы были отнесены по канцерогенной опасности к группе 2В по классификации МАИР [19].

Следует отметить, что физико-химическими признаками потенциальной токсичности и канцерогенности наноматериалов является также положительный заряд, который может формироваться на поверхности некоторых наноматериалов, что способствует взаимодействию наноструктур и макромолекул клетки и их повреждению.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПО КАНЦЕРОГЕННОМУ, ГЕНОТОКСИЧЕСКОМУ И ТОКСИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЯМ НАНОМАТЕРИАЛОВ

В хронических экспериментах на мышах и крысах было показано, что прямоволокнистые многослойные углеродные нанотрубки типа MWCNT-7 обладают способностью вызывать опухоли при различных путях введения (табл. 2).

Внутрибрюшинные инъекции многослойных углеродных нанотрубок MWCNT-7 мышам и крысам индуцировали мезотелиомы брюшной полости [19]. Существенно, что этот наноматериал вызывал у мышей мезотелиомы при однократном введении всего 3 мкг [33]. Такие же опухоли образовывались у самцов крыс при введении взвеси MWCNT-7 в полость мошонки. У крыс, находившихся в атмосфере с взвесью нанотрубок в течение 108 нед, возникали карциномы легких и мезотелиомы плевры. При этом увеличение концентрации частиц в воздухе с 0,2 до 2 мг/м³ повышало частоту развития опухолей у самцов в 8 и 11 раз по сравнению с концентрацией 0,02 мг/м³ [19, 34].

Аналогичный эффект наблюдался и у мышей при вдыхании воздуха с другой разновидностью углеродных нанотрубок MWCNT-7. В эксперименте по методике инициации — промоции у мышей, первоначально экспонированных к 3-метилхолантрону, а затем дышавших в течение 17 мес воздухом с нанотрубками, аденомы и карциномы легких возникли у 38 из 42 особей, а у получавших только 3-метилхолантрон — у 28 из 54 ($p < 0,0001$), только загрязненный воздух — у 13 из 49 [35].

Таблица 2. Эффекты наноматериалов, созданных на основе различных химических соединений и аллотропов углерода

Table 2. Effects of nanomaterials elaborated on the basis of various chemical compounds and carbon allotropes

Элемент или его соединение Element or its compound	Объект Object	Эффект Effect
C	Крысы, мыши Rats, mice	Мезотелиомы плевры, рак легкого Pleural mesothelioma, lung cancer
Co	Крысы Rats	Плеоморфные саркомы на фоне хронического воспаления Pleomorphic sarcomas with chronic inflammation
	Культура клеток BALB/3T3 BALB/3T3 cell culture	Окислительный стресс, генотоксичность, однонитевые и двунитевые разрывы ДНК, злокачественная трансформация Oxidative stress, genotoxicity, single and double stranded DNA breaks, malignant transformation
Ni(OH) ₂	Крысы Rats	Рабдомиосаркомы на месте имплантации, окислительный стресс, ингибирование апоптоза, хроническое воспаление Rhabdomyosarcomas at implantation sites, oxidative stress, apoptosis inhibition, chronic inflammation
Arg	Крысы Rats	Окислительный стресс, повреждение ДНК Oxidative stress, DNA damage
ZnO	Мыши Mice	Поражение почек, анемия Kidney failure, anemia
	Культура клеток K562 K562 cell culture	Цитотоксическое действие путем индукции апоптоза Cytotoxic effect through apoptosis induction
	Сальмонелла Salmonella	Мутагенное действие низких концентраций Mutagenic effect of low concentrations
SiO ₂	Крысы Rats	Образование микроядер и повреждение ДНК, выявленное методом ДНК-комет Formation of micronuclei and DNA damage found in comet assay
	Культура клеток Bhas 42 Bhas 42 cell culture	Промоция злокачественной трансформации клеток, имеющих в геноме несколько копий v-Ha-ras Promotion of malignant transformation in cells containing several copies of v-Ha-ras in their genome
TiO ₂	Культура клеток легкого человека Human lung cancer cell culture	Злокачественная трансформация Malignant transformation
	Культура клеток Caco-2 Caco-2 cell culture	Изменение экспрессии генов, связанных с воспалением, иммунной системой, транспортом и злокачественным ростом Changes in expression of genes associated with inflammation, transport, and malignant growth
V ₂ O ₅	Культура клеток B16F10, A549 и PANC1 B16F10, A549 and PANC1 cell cultures	Ингибирование пролиферации путем окислительного стресса и активации апоптоза Inhibition of proliferation through oxidative stress and apoptosis activation
Al ₂ O ₃	Культура клеток JB6 JB6 cell culture	Окислительный стресс, нарушение функций митохондрий, усиление пролифера- ции Oxidative stress, disruption of mitochondrial function, increased proliferation
Fe ₂ O ₃ , Fe ₃ O ₄	Крысы, мыши Rats, mice	Индукция активных форм кислорода, гиперплазия и фиброз тканей легкого Induction of reactive oxygen species, hyperplasia, and lung tissue fibrosis
	Культура клеток мыши Balb/3T3 Balb/3T3 murine cell culture	Промоция действия 20-метилхолантрена, сравнимая с эффектом на модели двухстадийного канцерогенеза в культуре Promotion of 20-methylcholanthrene effect comparable to the effect in the two-stage carcinogenesis model in culture
CuO	Крысы Rats	Воспалительные и атрофические изменения в печени, легких, селезенке и почках Inflammatory and atrophic changes in liver, lungs, spleen, and kidneys

Окончание табл. 2

The end of table 2

Элемент или его соединение Element or its compound	Объект Object	Эффект Effect
Au	Крысы Rats	Эмбриотоксичность, нарушение фертильности самцов Embryotoxicity, infertility in males
	Культура клеток мыши Balb/3T3 Balb/3T3 murine cell culture	Промоция действия 20-метилхолантрена, сравнимая с эффектом ТРА (12–0-тетра-деканойлфорбол-13-ацетат) на модели злокачественной трансформации в культуре Promotion of 20-methylcholanthrene effect comparable to the TPA (12–0-tetra-decanoylphorbol-13-acetate) effect in malignant transformation model in culture
SeO ₂	Культура клеток BALB/3T3 BALB/3T3 cell culture	Цитотоксическое действие, ингибирующее канцерогенез на модели злокачественной трансформации в культуре Cytotoxic effect inhibiting carcinogenesis in malignant transformation model in culture

Такие данные позволили экспертам МАИР в 2014 г. отнести жесткие многослойные углеродные нанотрубки MWCNT-7 к потенциальным канцерогенам человека (группа 2В) [19]. На основании этих и других экспериментов было предложено считать предельно допустимой концентрацией агентов типа MWCNT-7 в воздухе рабочей зоны не более 0,1–0,15 мкг/м³.

Наночастицы никеля и кобальта также оказались канцерогенными (табл. 2). У всех крыс, которым имплантировали такие наночастицы, на месте введения возникли саркомы. В клеточных культурах они вызывали одно- и двухцепочечные разрывы ДНК, хромосомные aberrации, активацию антиапоптотических факторов, таких как фосфорилированный Akt и белки Bcl-2 [36, 37]. В этом же эксперименте имплантация наночастиц SiO₂ опухолей не вызывала. Несмотря на возможность канцерогенного действия, нанопрепараты кобальта используются при магнитно-резонансной томографии в качестве контрастирующих агентов [38, 39].

В настоящее время широкое распространение получили и изделия, включающие наноматериалы на основе двуокиси титана (TiO₂). Поскольку исходный TiO₂ был классифицирован как возможный канцероген человека (группа 2В по классификации МАИР), генотоксичность и канцерогенность его наночастиц для человека также вполне вероятны. Подтверждением этого являются результаты исследования пищевой добавки E171, которая представляет собой смесь нано- и микрочастиц TiO₂ и используется в качестве красителя. В эксперименте на мышах E171 вызывала опухоли толстого кишечника [40, 41].

В процессе производства и обработки наночастиц TiO₂ они могут проникать в организм помимо желудочно-кишечного тракта через поврежденную кожу с косметикой и через дыхательные пути. Дальнейшие исследования показали, что генотоксическое действие наночастиц TiO₂ связано с концентрацией, режимом

и временем воздействия, типом клеток или видом животных, а также с физико-химическими свойствами (типом, размером и формой кристаллов) [42].

Наночастицы золота и серебра не проявили канцерогенных свойств, хотя золото в этой форме оказалось эмбриотоксичным, особенно при размере частиц около 0,8 нм [43]. Частицы размером 5 нм при длительном введении вызывали у самцов крыс нарушение фертильности. В то же время в культуре клеток мыши Balb/3T3 наночастицы золота, как и Fe₃O₄, оказались сильными промоторами при инициации канцерогенеза 20-метилхолантеном в двухстадийной модели [44].

Наноструктурированные биоконкомпозиты серебра, широко используемые в медицине вследствие их большой антимикробной активности, повышают в печени экспрессию цитохрома P4501A, белка теплового шока (Hsp70) и p53 и вызывают окислительное повреждение ДНК [45, 46].

Несмотря на то что кристаллический кремнезем является канцерогеном для человека (группа 1 по классификации МАИР) и имеется много данных о генотоксичности его наночастиц как в клеточных культурах, так и у животных, канцерогенность таких наночастиц не доказана [18]. Эти сведения неоднозначны, поскольку эффект на культивируемых клетках был связан как с формой и размерами частиц, так и с гистогенезом клеточных культур. В одном из экспериментов наночастицы SiO₂ промотировали злокачественную трансформацию клеток, имеющих в геноме несколько копий v-Ha-ras [47, 48]. Внутривенное введение самцам крыс наночастиц TiO₂ размером 15 и 55 нм приводило к образованию микроядер и повреждению ДНК, выявленному методом ДНК-комет. Наночастицы солей цинка, ванадия, алюминия, меди и селена вызывали у животных и в клеточных культурах генотоксическое действие путем окислительного стресса (табл. 2) [49, 50].

Использование обратного мутагенеза на штаммах аутокотрофных бактерий для оценки генотоксичности

наноматериалов не может служить адекватным методом как в силу больших размеров нановолокон, нанолент и других форм наноматериалов по отношению к бактериям, так и из-за отсутствия у них эндоцитоза и невозможности проникновения наночастиц через клеточную стенку [51]. Так, квантовые точки, наночастицы и нановолокна оксида и гидроксида алюминия, многостенные и одностенные углеродные нанотрубки не индуцировали генные мутации при использовании различных штаммов *Salmonella typhimurium* как в присутствии, так и в отсутствие активации ферментами S9-фракции микросомных монооксигеназ. Тем не менее в 22 исследованиях генотоксического эффекта наночастиц различного состава с помощью данного подхода были получены данные о наличии статистически значимого генотоксического эффекта: для наночастиц золота, серебра, меди, оксидов цинка, индия и вольфрама, диоксида кремния и титана, а также некоторых вариантов фуллеренов [51].

МЕХАНИЗМЫ ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ

Генотоксическое действие бывает прямым и косвенным. Прямое генотоксическое действие, в свою очередь, принято разделять на непосредственное и опосредованное. Поскольку наноматериалы проникают через ядерную мембрану и обнаруживаются в ядрах клеток, прямой первичный генотоксический эффект связывают с их механическим действием. Воздействуя на центриолы, они нарушают процесс митоза, тем самым вызывая хромосомные aberrации и образование микроядер. В интерфазе наноматериалы влияют на репликацию и транскрипцию. Кроме того, находящиеся на поверхности наноструктур свободные радикалы относительно стабильны и непосредственно действуют на геномную ДНК. Трехмерные реконструкции оптических сечений визуализировали углеродные нанотрубки, встроенные в centrosomes, микротрубочки и ДНК. После 24 ч инкубации с наноматериалом наблюдалось дозозависимое увеличение числа разрушенных centrosomes, появление анеуплоидных хромосом и аномалий митотического веретена. Выраженность этих эффектов определяется материалом и размерами нанопроductов, их формой, прочностью на изгиб и стабильностью в биологических средах. Биорезистентность некоторых из них очень велика. Например, многослойные углеродные нанотрубки, как и волокна асбеста, сохранялись в легочной ткани мышей в течение 1 года после их однократного введения [52–54].

Первичный опосредованный механизм генотоксического действия наночастиц металлов связан со способностью индуцировать в митохондриях и мембранно-связанной системе цитохрома P450 перекись водорода (H_2O_2), супероксидный анион (O_2^-), гидроксильный радикал ($HO\cdot$), активную форму азота (NO) и пероксинитрил (ONOO). В зависимости от матери-

ала изготовления и свойств покрытия наноматериалы могут повреждать ДНК с помощью и других электрофильных молекул. Они атакуют ДНК, вызывая одно- и двунитевые разрывы, в результате чего нерепарированные повреждения дают клоны с мутациями или цитогенетическими аномалиями [55, 56]. Косвенный механизм генотоксического действия наноматериалов связан с их способностью вызывать хроническое воспаление. Это было показано как в системах *in vivo*, так и *in vitro* на смешанных культурах эпителия легких и клеток иммунной системы [57].

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

Эпигенетические эффекты нанопроductов тесно связаны с генотоксическими и могут порождать друг друга. В связи с этим вопрос о том, что первично, а что вторично, может быть решен только в каждом конкретном случае. Основными механизмами эпигенетического воздействия наночастиц и наноматериалов на клетки являются нарушение метилирования ДНК и модификация гистонов, которые развиваются в результате воспаления, окислительного стресса и нарушения экспрессии кодирующих и не кодирующих генов [27, 58–60] (рис. 4).

Наноматериалы и наночастицы изменяют работу белков, метилирующих и деметилирующих ДНК, а также модифицирующих гистоны. Они также вызывают окислительный стресс, извращают метаболизм фолатов и цикл лимонной кислоты. Это повреждает ДНК и нарушает механизмы ее репарации, а также



Рис. 4. Механизм метилирования ДНК и модификации гистонов наноматериалами и наночастицами [27]

Fig. 4. Mechanism of DNA methylation and histone modification by nanomaterials and nanoparticle [27]

работу ферментов, модифицирующих хроматин, и происходят гипометилирование ДНК и модификации гистонов [27, 61, 62].

В исследованиях на клеточных культурах легочно-го эпителия, моноцитов и других тканей было показано, что одно- и многослойные углеродные нанотрубки вызывают как гипометилирование промоторов тысяч генов, так и гиперметилирование CpG сайтов промоторов некоторых других генов [63–66]. Наличие в ДНК продуктов свободнорадикального окисления в виде 8-OHdG и 5-hmC ингибирует ДНК-метилтрансферазу, что приводит к глобальному гипометилированию ДНК [67]. Кроме того, воздействие наночастиц и наноматериалов вызывает истощение пула глутатиона — основного антиоксиданта клетки. Аберрантное гиперметилирование при воспалении может происходить и вследствие появления галогенизированных продуктов цитозина типа 5-хлорцитозина и 5-бромцитозина, которые вместо 5-метилцитозина способны направлять метильную группу на неметилированные сайты [68–70]. В отличие от сложных наноструктур наночастицы размером меньше 10 нм, используемые для адресной доставки лекарственных препаратов, не влияют на метилирование ДНК, но изменяют экспрессию многих матричных РНК (мРНК), связанных с канцерогенезом, иммунным ответом, апоптозом и регуляцией клеточного цикла [71, 72].

Одним из наиболее типичных изменений, вызываемых наноматериалами, в том числе и наночастицами, является усиление фосфорилирования гистона H2AX по серину-139 (γ -H2AX), которое входит в число самых ранних показателей повреждения ДНК [27, 69]. Этот эффект был получен в большом числе экспериментов с наночастицами на основе различных металлов — серебра, золота, меди, цинка, титана, а также неметаллов, в частности кремния. Наночастицы кремния вызывали в культуре клеток мыши усиление ацетилирования гистонов H3 и H4, повышение содержания гистондеацетилазы HDAC2 при снижении уровней HDAC1 и HDAC6 [27, 65]. Наночастицы золота и мышьяка вызывали несколько типов модификаций гистонов в культуре эпителиальных клеток дыхательных путей, что приводило к подавлению экспрессии близлежащих генов [27].

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ НА НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК

Одной из составляющих эпигенетических механизмов действия нанопродуктов на клетку является их способность изменять экспрессию микроРНК (миРНК), которые представляют собой некодирующие эндогенные РНК, состоящие из коротких нуклеотидных последовательностей. Они участвуют в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов и влияют на основные клеточные процессы, такие как метаболизм, пролиферация, дифференцировка и апоптоз.

В 2011 г. было впервые обнаружено, что наночастицы с титановым покрытием значительно изменяют экспрессию 16 миРНК неизвестной на тот момент функциональности в клетках легких мыши [72]. Аналогичный эффект был получен и после введения в легкие мышей частиц сажи. Дальнейшие исследования также продемонстрировали измененную экспрессию миРНК [72, 73].

Значительное изменение профилей миРНК было обнаружено в клетках крови мышей, у которых возникли различные патологии легких вследствие хронического дыхания воздухом, запыленным углеродными нанотрубками. У животных с фиброзом легких, среди других, были изменены промотор гена NAD-зависимой метилентетрагидрофолат дегидрогеназы MTHFD2 и MIR-206-3P, связанная с функциями митохондрий. У мышей с бронхоальвеолярной аденомой был изменен уровень Fam178a, связанной с пострепликативной репарацией повреждений ДНК и MIR-130A-3P, ингибирующей экспрессию пролактина. При аденокарциноме наблюдалось повышение экспрессии рецептора интерлейкина 7, участвующего в активации STAT3, который связан с работой интерлейкинов и факторов роста, и понижение MIR-210-3P, активирующей ангиогенез при гипоксии. Данный эксперимент был поставлен по схеме двухстадийного канцерогенеза, когда часть животных получала предварительно внутрибрюшинную инъекцию 20-метилхолантрена. Поскольку злокачественные опухоли возникли не только в этой группе, полученные изменения миРНК нельзя связывать только с действием нанотрубок [74, 75].

В целом изменение эпигенома наноструктурными элементами в настоящее время связывают с процессами глобального деметилирования и специфичного для отдельных генов метилирования ДНК, повышением фосфорилирования гистонов, в частности H2AX, сопровождающимся окислительным стрессом, усилением ацетилирования гистонов H3 и H4 и повышением активности гистондеацетилазы 2 (HDAC2), деацетилирующей остатки лизина коровых гистонов (H2A, H2B, H3 и H4) и играющей большую роль в регуляции транскрипции и клеточного цикла при одновременном снижении уровней белков HDAC1 и HDAC6 [27, 61, 71].

НАНОПРОДУКТЫ КАК СОРБЕНТЫ КАНЦЕРОГЕННЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ БИОСФЕРЫ

Данные ряда экспериментов свидетельствуют о том, что, помимо собственной канцерогенности, наноматериалы могут быть промоторами канцерогенеза, инициированного другими агентами. В частности, показано, что хроническое вдыхание мышами многослойных углеродных нанотрубок MWCNT-7 резко увеличивает способность ранее введенного 20-метилхолантрена вызывать карциномы легких [19].

Аналогичным образом адсорбция наноматериалами гидрофобных органических соединений, в том числе

канцерогенных и неканцерогенных полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) из окружающей среды, может усиливать их токсичность и канцерогенность. При исследовании адсорбции нафталина, фенантрена и пирена на 6 структурах, включая фуллерены, однослойные и многослойные углеродные нанотрубки, было показано, что их максимальные концентрации содержат внешние поверхности структур, а не внутренние полости и перегородки. При этом величина адсорбционной способности наноматериала зависит от площади поверхности, объема микропор и отношения мезопор к микропорам. В свою очередь, адсорбируемость ПАУ связана с размером молекул, т. е. чем больше их размер, тем меньше адсорбируемая емкость. Десорбция ПАУ происходит довольно легко. Гистерезис, то есть задержка десорбции, был характерен только для фуллеренов из-за наличия замкнутых межзельных пространств в этих сферических агрегатах.

Таким образом, активная сорбция ПАУ на наноносителях и легкость их десорбции свидетельствуют о возможности транспортировки наноструктурами в клетки ПАУ и других канцерогенов, что должно привести к повышению биодоступности канцерогенных молекул и, как следствие, в совокупности с собственными эффектами наноструктур — к повышению токсического и канцерогенного рисков [76, 77]. Глобальная

опасность такой возможности вполне реальна, если учесть, что средняя концентрация ПАУ в атмосфере производственных мощностей еще 10 лет назад составляла до 336 мкг/м³. В связи с этим тестирование новых наноструктур на канцерогенность должно включать испытание их промоторной активности по отношению к загрязнениям биосферы [78–80].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Некоторые типы наночастиц и наноструктур оказывают на клетки генотоксическое и эпигенетическое воздействие, что является основой их канцерогенности.

Генотоксическое действие вызывается путем механического повреждения структур ядра, а мутации — действием активных радикалов, находящихся на поверхности наноструктур или возникающих в процессе воспаления. В основе эпигенетических изменений лежат процессы метилирования/деметиличирования ДНК, изменение профилей гистонов и мРНК. Наночастицы также способны промотировать канцерогенное действие других агентов типа канцерогенов биосферы, которые сорбируются на их поверхности и, возможно, генотоксических химиопрепаратов. Эти их свойства необходимо учитывать при испытании безопасности новых соединений с использованием наночастиц.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Feynman R.P. There's plenty of room at the bottom. *Engineering Sci* 1960;23(5):22–36.
2. Карпов Д.А., Литуневский В.Н. Наноматериалы. СПб.: ФГУП «НИИЭФА им. Д.В. Ефремова», 2007. 82 с.
Karpov D.A., Litunovsky V.N. *Nanomaterials*. Saint Petersburg: FSUE "NIIIEFA named after D.V. Efremov", 2007. 82 p. (In Russ.).
3. Karthik P.S., Himaja A.L., Singh S.P. Carbon-allotropes: synthesis methods, applications and future perspectives. *Carbon Letters* 2014;15(4):219–37.
4. Кирчанов В.С. Наноматериалы и нанотехнологии. Пермь, 2016. 193 с.
Kirchanov V.S. *Nanomaterials and nanotechnologies*. Perm, 2016. 193 p. (In Russ.).
5. Menezes de B.R.C., Rodrigues K.F., Fonseca da Silva B.C. Recent advances in the use of carbon nanotubes as smart biomaterials. *J Mater Chem B* 2019;7:1343–60. DOI: 10.1039/c8tb02419g
6. Janković N., Plata D. Engineered nanomaterials in the context of global element cycles. *Environmental Science: Nano* 2019;6(9):2697–711. DOI: 10.1039/c9en00322c
7. Chemical accidents involving nanomaterials: potential risks and review of prevention, preparedness and response measures — project report. *Series on chemical accidents*. OECD 2022;34:50.
8. Выявление наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека: Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. 35 с.
Identification of nanomaterials posing a potential hazard to human health: Methodological Recommendations. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology Rospotrebnadzor, 2009. 35 p. (In Russ.).
9. Hu C.M., Zhang L. Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol* 2012;83(8):1104–11. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.01.008
10. Davatgaran-Taghipour Y., Masoomzadeh S., Farzaei M.H. et al. Polyphenol nanoformulations for cancer therapy: experimental evidence and clinical perspective. *Int J Nanomedicine* 2017;12:2689–702. DOI: 10.2147/IJN.S131973
11. Бовина Е.М., Романов Б.К., Казаков А.С. и др. Наноразмерные лекарственные средства: особенности оценки безопасности. *Безопасность и риск фармакотерапии* 2019;7(3):127–38. DOI: 10.30895/2312-7821-2019-7-3-127-138
Bovina E.M., Romanov B.K., Kazakov A.S. et al. *Nanoscale therapeutic system: safety assessment features*. *Bezopasnost i risk farmakoterapii* = Safety and Risk of Pharmacotherapy 2019;7(3): 127–38. (In Russ.). DOI: 10.30895/2312-7821-2019-7-3-127-138
12. Halwani A. Development of pharmaceutical nanomedicines: from the bench to the market. *Pharmaceutics* 2022;106:1–21. DOI: 10.3390/pharmaceutics14010106
13. Rajora A.K., Ravishankar D., Zhang H. et al. Recent advances and impact of chemotherapeutic and antiangiogenic nanoformulations for combination cancer therapy. *Pharmaceutics* 2020;12(6):592. DOI: 10.3390/pharmaceutics12060592
14. Allemailem K.S., Almatroudi A., Alsahli M.A. et al. Novel strategies for disrupting cancer-cell functions with mitochondria-targeted antitumor drug-loaded nanoformulations. *Int J Nanomedicine* 2021;16:3907–36. DOI: 10.2147/IJN.S303832
15. Thambiraj S., Vijayalakshmi R., Ravi Shankar D. An effective strategy for development of docetaxel encapsulated gold nanoformulations for treatment of prostate cancer. *Sci Rep* 2021;11:2808. DOI: 10.1038/s41598-020-80529-1

16. Mirjolet C., Boudon J., Loiseau A. Docetaxel-titanate nanotubes enhance radiosensitivity in an androgen-independent prostate cancer model. *Int J Nanomedicine* 2017;2:6357–64. DOI: 10.2147/IJN.S139167.12
17. Ganju A., Khan S., Hafeez B.B. et al. miRNA nanotherapeutics for cancer. *Drug Discov Today* 2017;22(2):424–32. DOI: 10.1016/j.drudis.2016.10.014
18. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 100C. Arsenic, metals, fibres, and dusts, 2009. International Agency for Research on Cancer. II Series. Available at: <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono100C.pdf>.
19. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 111. Some nanomaterials and some fibres. 2017. International Agency for Research on Cancer. II Series. Available at: <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono111.pdf>.
20. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 131. Cobalt Metal (without Tungsten Carbide or Other Metal Alloys) and Cobalt (II) Salts, Trivalent and Pentavalent Antimony, and Weapons-grade Tungsten (with Nickel and Cobalt) Alloy. 2022. International Agency for Research on Cancer. II Series. Available at: <https://www.iarc.who.int/news-events/iarc-monographs-vol-131/>.
21. Бычков М.Б., Абдуллаев А.Г., Багрова С.Г. и др. Практические рекомендации по лечению мезотелиомы плевры, брюшины и других локализаций. Злокачественные опухоли. RUSSCO 2019 (#3s2):55–67. DOI: 10.18027/2224-5057-2019-9-3s2-55-67
22. Bychkov M.B., Abdullaev A.G., Bagrova S.G. et al. Practical recommendations for treatment of pleural mesothelioma, peritoneum and other localization. *Zlokachestvennyye opuholi. RUSSCO = Malignant Tumours. RUSSCO 2019 (#3s2):55–67.* (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2019-9-3s2-55-67
23. Beard J.D., Erdely A., Dahm M.M. Carbon nanotube and nanofiber exposure and sputum and blood biomarkers of early effect among U.S. workers. *Environ Int* 2018;116:214–28. DOI: 10.1016/j.envint.2018.04.004
24. Vlaanderen J., Pronk A., Rothman N. A cross-sectional study of changes in markers of immunological effects and lung health due to exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology* 2017;11(3):395–404. DOI: 10.1080/17435390.2017.1308031
25. Fatkhutdinova L.M., Khaliullin T.O., Vasil'yeva O.L. et al. Fibrosis biomarkers in workers exposed to MWCNTs. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016;299:125–31. DOI: 10.1016/j.taap.2016.02.016
26. Liou S.-H., Wu W.-T., Liao H.-Y. et al. Global DNA methylation and oxidative stress biomarkers in workers exposed to metal oxide nanoparticles. *J Hazard Mater* 2017;331:329–35. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.02.042
27. Rossnerova A., Honkova K., Pelcova D. et al. DNA Methylation profiles in a group of workers occupationally exposed to nanoparticles. *Int J Mol Sci* 2020;21(7):2420. DOI: 10.3390/ijms21072420
28. Pogribna M., Hammons G. Epigenetic effects of nanomaterials and nanoparticles. *J Nanobiotechnology* 2021;19(1):2. DOI: 10.1186/s12951-020-00740-0
29. Pilger A., Rüdiger H.W. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health* 2006;80:1–15. DOI: 10.1007/s00420-006-0106-7
30. Gupta S.S., Singh K.P., Gupta S. et al. Do carbon nanotubes and asbestos fibers exhibit common toxicity mechanisms? *Nanomaterials (Basel)* 2022;12(10):1708. DOI: 10.3390/nano12101708
31. Fraser K., Kodali V., Yanamala N. et al. Physicochemical characterization and genotoxicity of the broad class of carbon nanotubes and nanofibers used or produced in US facilities. Part I. *Fibre Toxicol* 2020;17(1):62. DOI: 10.1186/s12989-020-00392-w
32. Kane A.B., Hurt R.H., Gao H. The asbestos-carbon nanotube analogy: an update. *Toxicol Appl Pharmacol* 2018;361:68–80. DOI: 10.1016/j.taap.2018.06.027
33. Guo L., Morris D.G., Liu X. et al. Iron bioavailability and redox activity in diverse carbon nanotube samples. *Chem Mater* 2007;19:3472–8. DOI: 10.1021/cm062691p
34. Fukushima S., Kasai T., Umeda Y. et al. Carcinogenicity of multi-walled carbon nanotubes: challenging issue on hazard assessment. *J Occup Health* 2018;60:10–30. DOI: 10.1539/joh.17-0102-RA
35. Numano T., Higuchi H., Alexander D.B. et al. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats. *Cancer Sci* 2019;110(8):2485–92. DOI: 10.1111/cas.14121
36. Takagi A., Hirose A., Futakuchi M. et al. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci* 2012;103(8):1440–4. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02318.x
37. Muller J., Decordier I., Hoet P.H. et al. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis* 2008;29(2):427–33. DOI: 10.1093/carcin/bgm243
38. Magaye R., Zhao J., Bowman L., Ding M. Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles. *Exp Ther Med* 2012;4(4):551–61. DOI: 10.3892/etm.2012.656
39. Bouchard L., Anwar M., Liu L. et al. Picomolar sensitivity MRI and photoacoustic imaging of cobalt nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(11):4085–89. DOI: 10.1073/pnas.0813019106
40. Li Y., Ye F., Zhang S. et al. Carbon-coated magnetic nanoparticle dedicated to MRI/photoacoustic imaging of tumor in living mice. *Front Bioeng Biotechnol* 2021;2;9:800744. DOI: 10.3389/fbioe.2021.800744
41. Carbon black, titanium dioxide, and talc. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 93. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer, 2010. 466 p.
42. Proquin H., Jonkhout M., Jetten M. et al. Transcriptome changes in undifferentiated Caco-2 cells exposed to food-grade titanium dioxide (E171): contribution of the nano- and micro- sized particles. *Sci Rep* 2019;9(1):18287. DOI: 10.1038/s41598-019-54675-0
43. Shi J., Han S., Zhang J. et al. Advances in genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles *in vivo* and *in vitro*. *NanoImpact* 2022;100377. DOI: 10.1016/j.impact.2021.100377
44. Xia Q., Li H., Liu Y. et al. The effect of particle size on the genotoxicity of gold nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* 2017; 105(3):710–9. DOI: 10.1002/jbm.a.35944
45. Sighinolfi G.L., Artoni E., Gatti A.M., Corsi L. Carcinogenic potential of metal nanoparticles in BALB/3T3 cell transformation assay. *Environ Toxicol* 2016;31(5):509–19. DOI: 10.1002/tox.22063
46. Rodriguez-Garraus A., Azqueta A., Vettorazzi A. et al. Genotoxicity of silver nanoparticles. *Nanomater (Basel, Switzerland)* 2020;10(2):251. DOI: 10.3390/nano10020251
47. Liu L., Kong L. Research progress on the carcinogenicity of metal nanomaterials. *Appl Toxicol* 2021;41(9):1334–44. DOI: 10.1002/jat.4145
48. Yazdimamaghani M., Moos P.J., Dobrovolskaia M.A., Ghandehari H. Genotoxicity of amorphous silica nanoparticles: status and prospects. *Nanomedicine* 2019;16:106–25. DOI: 10.1016/j.nano.2018.11.013
49. Downs T., Crosby M., Hu T. et al. Silica nanoparticles administered at the maximum tolerated dose induce genotoxic effects through an inflammatory reaction while gold nanoparticles do not. *Mutat Res* 2012;745(1–2):38–50. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2012.03.012
50. Xi W., Tang H., Liu Y. et al. Cytotoxicity of vanadium oxide nanoparticles and titanium dioxide-coated vanadium oxide nanoparticles to human lung cells. *J Appl Toxicol* 2020;40(5): 567–77. DOI: 10.1002/jat.3926
51. Sighinolfi G., Artoni E., Gatti A., Corsi L. Carcinogenic potential of metal nanoparticles in BALB/3T3 cell transformation assay. *Environ Toxicol* 2016;31(5):509–19. DOI: 10.1002/tox.22063
52. Ахальцева Л.В., Журков В.С., Ингель Ф.И. Мутагенная активность наноматериалов в тесте Эймса. *Гигиена и санитария* 2019;98(11):1309–20.

- Akhaltseva L.V., Zhurkov V.S., Ingel F.I. Mutagenic activity of nanomaterials in the ames test. literature review. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation* 2019;98(11):1309–20. (In Russ.).
52. Zhou F., Liao F., Chen L. et al. The size-dependent genotoxicity and oxidative stress of silica nanoparticles on endothelial cells. *Environ Sci Pollut Res Int* 2019;26:1911–20. DOI: 10.1007/s11356-018-3695-2
 53. Murphy F.A., Poland C.A., Duffin R. et al. Length-dependent retention of carbon nanotubes in the pleural space of mice initiates sustained inflammation and progressive fibrosis on the parietal pleura. *Am J Pathol* 2011;178(6):2587–600. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.02.040
 54. Murphy F.A., Schinwald A., Poland C.A. The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells. *Part Fibre Toxicol* 2012;9:8. DOI: 10.1186/1743-8977-9-8
 55. Magdolenova Z., Drlickova M., Henjum K. et al. Coating-dependent induction of cytotoxicity and genotoxicity of iron oxide nanoparticles. *Nanotoxicology* 2015;9(1):44–56. DOI: 10.3109/17435390.2013.847505
 56. Kohl Y., Rundén-Pran E., Mariussen E. et al. Genotoxicity of nanomaterials: advanced in vitro models and high throughput methods for human hazard assessment – a review. *Nanomater (Basel, Switzerland)* 2020;10(10):1911. DOI: 10.3390/nano10101911
 57. Evans S.J., Clift M.J.D., Singh N. et al. Critical review of the current and future challenges associated with advanced *in vitro* systems towards the study of nanoparticle (secondary) genotoxicity. *Mutagenesis* 2017;32(1):233–41. DOI: 10.1093/mutage/gew054
 58. Hanot-Roy M., Tubeuf E., Guilbert A. et al. Oxidative stress pathways involved in cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on cells constitutive of alveolo-capillary barrier in vitro. *Toxicol In Vitro* 2016;33:125–35. DOI: 10.1016/j.tiv.2016.01.013
 59. Wan R., Mo Y., Feng L. et al. DNA damage caused by metal nanoparticles: involvement of oxidative stress and activation of ATM. *Chem Res Toxicol* 2012;25(7):1402–11. DOI: 10.1021/tx200513t
 60. Brown T.A., Lee J.W., Holian A. et al. Alterations in DNA methylation corresponding with lung inflammation and as a biomarker for disease development after MWCNT exposure. *Nanotoxicology* 2016;10(4):453–61. DOI: 10.3109/17435390.2015.1078852
 61. Yu J., Loh X.J., Luo Y. et al. Insights into the epigenetic effects of nanomaterials on cells. *Biomater Sci* 2020;8(3):763–75. DOI: 10.1039/c9bm01526d
 62. Öner D., Ghosh M., Bové H. et al. Differences in MWCNT- and SWCNT-induced DNA methylation alterations in association with the nuclear deposition. *Part Fibre Toxicol* 2018;15(1):11. DOI: 10.1186/s12989-018-0244-6
 63. Öner D., Ghosh M., Coorens R. et al. Induction and recovery of CpG site specific methylation changes in human bronchial cells after long-term exposure to carbon nanotubes and asbestos. *Environ Int* 2020;137:105530. DOI: 10.1016/j.envint.2020.105530
 64. Ghosh M., Öner D., Duca R.C. et al. Single-walled and multi-walled carbon nanotubes induce sequence-specific epigenetic alterations in 16 HBE cells. *Oncotarget* 2018;9(29):20351–65. DOI: 10.18632/oncotarget.24866
 65. Sierra M.I., Rubio L., Bayón G.F. et al. DNA methylation changes in human lung epithelia cells exposed to multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology* 2017;11(7):857–70. DOI: 10.1080/17435390.2017.1371350
 66. Valinluck V., Sowers L.C. Inflammation-mediated cytosine damage: a mechanistic link between inflammation and the epigenetic alterations in human cancers. *Cancer Res* 2007;67(12):5583–6. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0846
 67. Jiang Z., Lai Y., Beaver J.M. et al. Oxidative DNA damage modulates DNA methylation pattern in Human Breast Cancer 1 (*BRCA1*) gene via the crosstalk between DNA polymerase β and a *de novo* DNA methyltransferase. *Cells* 2020;9(1):225. DOI: 10.3390/cells9010225
 68. Sima M., Vrbova K., Zavodna T. et al. The differential effect of carbon dots on gene expression and DNA methylation of human embryonic lung fibroblasts as a function of surface charge and dose. *Int J Mol Sci* 2020;21(13):4763. DOI: 10.3390/ijms21134763
 69. Kopp B., Dario M., Zalko D. et al. Assessment of a panel of cellular biomarkers and the kinetics of their induction in comparing genotoxic modes of action in HepG2 cells. *Environ Mol Mutagen* 2018;59(6):516–28. DOI: 10.1002/em.22197
 70. Seidel C., Kirsch A., Fontana C. et al. Epigenetic changes in the early stage of silica-induced cell transformation. *Nanotoxicology* 2017;11(7):923–35. DOI: 10.1080/17435390.2017.1382599
 71. Shyamasundar S., Ng C.T., Yung L.Y.L. et al. Epigenetic mechanisms in nanomaterial-induced toxicity. *Epigenomics* 2015;7(3):395–411. DOI: 10.2217/epi.15.3
 72. Halappanavar S., Jackson P., Williams A. et al. Pulmonary response to surface-coated nanotitanium dioxide particles includes induction of acute phase response genes, inflammatory cascades, and changes in microRNAs: a toxicogenomic study. *Environ Mol Mutagen* 2011;52(6):425–39. DOI: 10.1002/em.20639
 73. Shukla R.K., Badiye A., Vajpayee K. et al. Genotoxic potential of nanoparticles: structural and functional modifications in DNA. *Front Genet.* 2021;12:728250. DOI: 10.3389/fgene.2021.728250
 74. Brzóska K., Grądzka I., Kruszewski M. Silver, gold, and iron oxide nanoparticles alter miRNA expression but do not affect DNA methylation in HepG2 cells. *Mater (Basel, Switzerland)* 2019;12(7):1038. DOI: 10.3390/ma12071038
 75. Snyder-Talkington B.N., Dong C., Sargent L.M. et al. mRNAs and miRNAs in whole blood associated with lung hyperplasia, fibrosis, and bronchiolo-alveolar adenoma and adenocarcinoma after multi-walled carbon nanotube inhalation exposure in mice. *J Appl Toxicol* 2016;36(1):161–74. DOI: 10.1002/jat.3157
 76. Yang K., Zhu L., Xing B. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by carbon nanomaterials. *Environ Sci Technol* 2006;40(6):1855–61. DOI: 10.1021/es052208w
 77. Yang K., Xing B. Desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from carbon nanomaterials in water. *Environ Pollut* 2007;145:529–37. DOI: 10.1016/j.envpol.2006.04.020
 78. Birch M.E. Exposure and emissions monitoring during carbon nanofiber production. Part II: polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann Occup Hyg* 2011;55:1037–47. DOI: 10.1093/annhyg/mer070
 79. Samburova V., Zielinska B., Khlystov A. Do 16 polycyclic aromatic hydrocarbons represent PAH air toxicity? *Toxics* 2017;5. DOI: 10.3390/toxics5030017
 80. Chalbot M.-C.G., Pirela S.V., Schiffman L. et al. Synergistic effects of engineered nanoparticles and organics released from laser printers using nano-enabled toners: potential health implications from exposures to the emitted organic aerosol. *Environ Sci Nano* 2017;4:2144–56. DOI: 10.1039/C7EN00573C

Вклад авторов

Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская: разработка концепции и структуры обзора, определение порядка изложения материала, выбор наиболее важных публикаций, редактирование;

Е.А. Лесовая: работа с литературой, обсуждение опубликованных работ, написание текста статьи, оформление текста обзора в соответствии с требованиями к изданию журнала;

К.И. Кирсанов: работа с литературой, обсуждение опубликованных работ, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала.

Authors' contribution

G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya: development of the concept and structure of the review, determination of the order of presentation of the material, selection of the most important publications, editing;

E.A. Lesovaya: work with literature, discussion of published works, article writing, the design of the review text in accordance with the requirements for the publication of the journal;

K.I. Kirsanov: work with literature, discussion of published works, article writing, preparation of illustrative material.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>.

Е.А. Лесовая / E.A. Lesovaya: <https://orcid.org/0000-0002-1967-9637>.

М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflicts of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (грант № 17-15-01526).

Funding. The research was carried out with the financial support of a grant from the Russian Science Foundation (grant No. 17-15-01526).

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-24-40

CC BY 4.0

Нарушение метилирования ДНК при злокачественных новообразованиях

В.П. Максимова¹, О.Г. Усалка^{1,2}, Ю.В. Макус^{1,3}, В.Г. Попова^{1,4}, Е.С. Трапезникова², Г.И. Хайриева², Г.Р. Сагитова², Е.М. Жидкова¹, А.Ю. Прус^{1,5}, М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России; Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;

⁴ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева»; Россия, 125047 Москва, Миусская площадь, 9;

⁵ФГБУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»; Россия, 119454 Москва, проспект Вернадского, 78

Контакты: Кирилл Игоревич Кирсанов kkirsanov85@yandex.ru

Метилирование ДНК представляет собой модификацию хроматина, которая играет важную роль в эпигенетической регуляции экспрессии генов. Изменение паттернов метилирования ДНК характерно для многих злокачественных новообразований. Метилирование ДНК осуществляется ДНК-метилтрансферазами (DNMTs), в то время как деметилирование происходит под действием метилцитозиновых диоксигеназ, или белков семейства ТЕТ. Мутации и изменение профиля экспрессии данных ферментов, приводящие к гипо- и гиперметилированию ДНК, могут оказывать сильное влияние на канцерогенез.

В обзоре рассмотрены ключевые аспекты механизмов регуляции метилирования и деметилирования ДНК, а также проведен анализ роли ДНК-метилтрансфераз и белков семейства ТЕТ в патогенезе различных злокачественных новообразований.

При подготовке обзора были использованы информационные базы биомедицинской литературы Scopus (504), PubMed (553), Web of Science (1568), eLibrary (190), для получения полнотекстовых документов – электронные ресурсы PubMed Central (PMC), Science Direct, Research Gate, КиберЛенинка, для анализа мутационного профиля эпигенетических регуляторных ферментов – портал cBioportal (<https://www.cbioportal.org/>), данные проекта The AACR Project GENIE Consortium (<https://www.mycancergenome.org/>), базы данных COSMIC, Clinvar и Атласа генома рака (The Cancer Genome Atlas, TCGA).

Ключевые слова: эпигенетическая регуляция транскрипции, онкогенез, метилирование ДНК, гидроксиметилирование ДНК, ДНК-метилтрансферазы, белки семейства ТЕТ, злокачественные новообразования

Для цитирования: Максимова В.П., Усалка О.Г., Макус Ю.В. и др. Нарушение метилирования ДНК при злокачественных новообразованиях. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(4):24–40. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-24-40

Aberrations of DNA methylation in cancer

V.P. Maksimova¹, O.G. Usalka^{1,2}, Yu.V. Makus^{1,3}, V.G. Popova^{1,4}, E.S. Trapeznikova², G.I. Khayrieva², G.R. Sagitova², E.M. Zhidkova¹, A.Yu. Prus^{1,5}, M.G. Yakubovskaya¹, K.I. Kirsanov^{1,3}

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

³Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

⁴Mendeleev University of Chemical Technology of Russia; 9 Miusskaya ploshchad', Moscow 125047, Russia;

⁵MIREA – Russian Technological University; 78 Vernadsky Prospekt, Moscow 119454, Russia

Contacts: Kirill Igorevich Kirsanov kkirsanov85@yandex.ru

DNA methylation is a chromatin modification that plays an important role in the epigenetic regulation of gene expression. Changes in DNA methylation patterns are characteristic of many malignant neoplasms. DNA methylation is occurred by DNA methyltransferases (DNMTs), while demethylation is mediated by TET family proteins. Mutations and changes

in the expression profile of these enzymes lead to DNA hypo- and hypermethylation and have a strong impact on carcinogenesis. In this review, we considered the key aspects of the mechanisms of regulation of DNA methylation and demethylation, and also analyzed the role of DNA methyltransferases and TET family proteins in the pathogenesis of various malignant neoplasms.

During the preparation of the review, we used the following biomedical literature information bases: Scopus (504), PubMed (553), Web of Science (1568), eLibrary (190). To obtain full-text documents, the electronic resources of PubMed Central (PMC), Science Direct, Research Gate, CyberLeninka were used. To analyze the mutational profile of epigenetic regulatory enzymes, we used the cBioportal portal (<https://www.cbioportal.org/>), data from The AACR Project GENIE Consortium (<https://www.mycancergenome.org/>), COSMIC, Clinvar, and The Cancer Genome Atlas (TCGA).

Key words: epigenetic regulation of transcription, oncogenesis, DNA methylation, DNA hydroxymethylation, DNA methyltransferases, TET family proteins, malignant tumors

For citation: Maksimova V.P., Usalka O.G., Makus J.V. et al. Aberrations of DNA methylation in cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(4):24–40. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-24-40

ВВЕДЕНИЕ

Ключевыми молекулярными событиями в патогенезе злокачественных новообразований (ЗНО) являются изменения как в структуре генома, так и в системе эпигенетической регуляции транскрипции [1]. Изменения паттернов мутаций, экспрессии или ферментативной активности компонентов названной системы могут приводить к нарушению профиля экспрессии генов, обуславливающему проявление биологических характеристик опухолевой клетки [2].

Метилирование ДНК — наследуемая эпигенетическая модификация, играющая важную роль в инактивации X-хромосомы, геномном импринтинге, репрессии транскрипции повторяющихся элементов генома, а также регуляции экспрессии генов [3, 4]. Интегральное изменение паттерна метилирования генома опухолевой клетки, так называемое aberrantное метилирование ДНК, приводит к инактивации генов супрессоров опухолевого роста и последующей активации онкогенов, а также к активации ретротранспозонов, дестабилизирующих геном, и транскрипции некодирующих последовательностей, влияющих на процессинг РНК [5]. В результате происходит нарушение процессов пролиферации, дифференцировки и апоптоза, что способствует формированию клона опухолевых клеток с более агрессивным фенотипом и, в частности, развитию множественной лекарственной устойчивости [6, 7].

Метилирование ДНК осуществляется ДНК-метилтрансферазами (DNMTs), в то время как деметилирование происходит под действием метилцитозиновых диоксигеназ, или белков семейства TET [8]. Aberrantное метилирование ДНК является следствием как структурных нарушений этих ферментов, определяющих изменение их функциональной активности, так и изменения уровня их экспрессии [5]. При некоторых ЗНО наличие определенной мутации и изменение уровней экспрессии ферментов метилирования/деметилирования ДНК может быть использовано для дифференциальной диагностики заболевания, а также в качестве прогностических и предикторных факторов.

В предлагаемом обзоре рассмотрены наиболее актуальные данные о метилировании и деметилировании ДНК, а также роль белков ДНК-метилтрансфераз (DNMTs) и белков семейства TET (TETs) в генезе различных ЗНО.

МЕХАНИЗМ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Метилирование ДНК у эукариот представляет собой модификацию цитозина в 5-м положении путем замещения атома водорода (H) на метильную группу (CH₃) под действием S-аденозилметионина (SAM) [9]. Процесс метилирования ДНК осуществляется семейством ДНК-метилтрансфераз (DNMTs), которые катализируют перенос метильной группы с SAM на цитозин [10]. DNMT1, являющаяся наиболее распространенной ДНК-метилтрансферазой в дифференцированных клетках, отвечает за поддержание метилирования ДНК [11]. DNMT2 представляет собой фермент, который метилирует множественные транспортные РНК (тРНК), защищая их от деградации [12]. Метилтрансферазы *de novo* DNMT3a и DNMT3b ответственны за установление профиля метилирования во время развития, в связи с чем экспрессируются на высоком уровне в эмбриональных стволовых клетках и на более низком уровне в дифференцированных клетках [13]. При этом DNMT3a предпочтительно вносит модификацию в линкерную ДНК, а активность DNMT3b направлена на нуклеосомную ДНК [14]. DNMT3L является вспомогательным ферментом, который повышает каталитическую активность метилтрансфераз DNMT3a и DNMT3b, не взаимодействуя при этом с ДНК [13, 15].

Поддерживающее метилирование осуществляется в S-фазе клеточного цикла полуконсервативным образом. Ключевую роль в поддерживающем метилировании играет взаимодействие фермента DNMT1 с убиквитин-подобным белком UHRF1. Он состоит из нескольких доменов, каждый из которых выполняет определенную функцию. Взаимодействие UHRF1 с малой и большой бороздками ДНК, содержащей вновь синтезированный фрагмент, реализуется с помощью домена SRA, включающего поддоменные области SRA

и NKR. Домены PHD и TTD, в свою очередь, ответственны за распознавание гистоновой модификации H3K9me2/3. Кроме того, в структуре UHRF1 выделяют домен RING, выполняющий функцию E3 убиквитин-лигазы, и домен UBL, который связывается с E2 убиквитин-конъюгирующим ферментом Ube2D. В результате связывания UHRF1 с гемиметилированной ДНК и гистоновой модификацией H3K9me2/3, а также моноубиквитинирования гистона H3 по остаткам лизина K18 и K23 ферментом E2 происходит направленное взаимодействие DNMT1 с неметилированными цитозинами в растущей дочерней цепи ДНК (см. рисунок) [16, 17].

Для метилирования *de novo* предполагается несколько механизмов направленного взаимодействия метилтрансфераз DNMT3a и DNMT3b с цитозинами конкретных генетических областей. Основным механизмом заключается во взаимодействии DNMT3a/b с ДНК через консервативный домен PWWP [18]. У млекопитающих метилирование ДНК происходит преимущественно в динуклеотидах CpG. Некоторые динуклеотиды CpG рассредоточены по геному, тогда как другие встречаются в виде плотных кластеров, называемых CpG-островками. В нормальных клетках дисперсно распространенные динуклеотиды CpG гиперметилированы, в то время как CpG-островки обычно не метилированы и часто располагаются в областях промоторов генов, которые регулируют активацию и репрессию транскрипции [14]. Наряду с метилированием CpG встречается метилирование цитозинов с последующим основанием, отличным от гуанина, которое называется non-CpG метилированием, а метки обозначаются как mCpH, где H – A, C или T [19]. Non-CpG метилирование более выражено в эмбриональных стволовых клетках (ESCs) по сравнению с дифференцированными клетками и играет ключевую роль в возникновении и поддержании плюрипотентного состояния [20–22]. Non-CpG метилирование поддерживается постоянной активностью метилтрансфераз *de novo* в основном ферментом DNMT3b [23].

Деметилирование ДНК подразумевает ряд процессов, в ходе которых цитозин не подвергается метилированию (пассивное деметилирование) или происходит модификация метильной метки, приводящая к замене нуклеотида на неметилированный цитозин (активное деметилирование). Пассивное деметилирование может осуществляться вследствие дисфункции фермента DNMT1 или при нарушении паттерна метилирования материнской цепи. Одним из факторов, препятствующих действию комплекса UHRF1-DNMT1, является окисление 5-метилцитозина (5-mC) до 5-гидроксиметилцитозина (5-hmC) белками семейства TET. Дело в том, что ферментативная активность DNMT1 в отношении гемиметилированного субстрата более чем в 60 раз превышает его активность в отношении гемигидроксиметилированных и немодифицированных сайтов [24]. Активное деметилирование ДНК про-

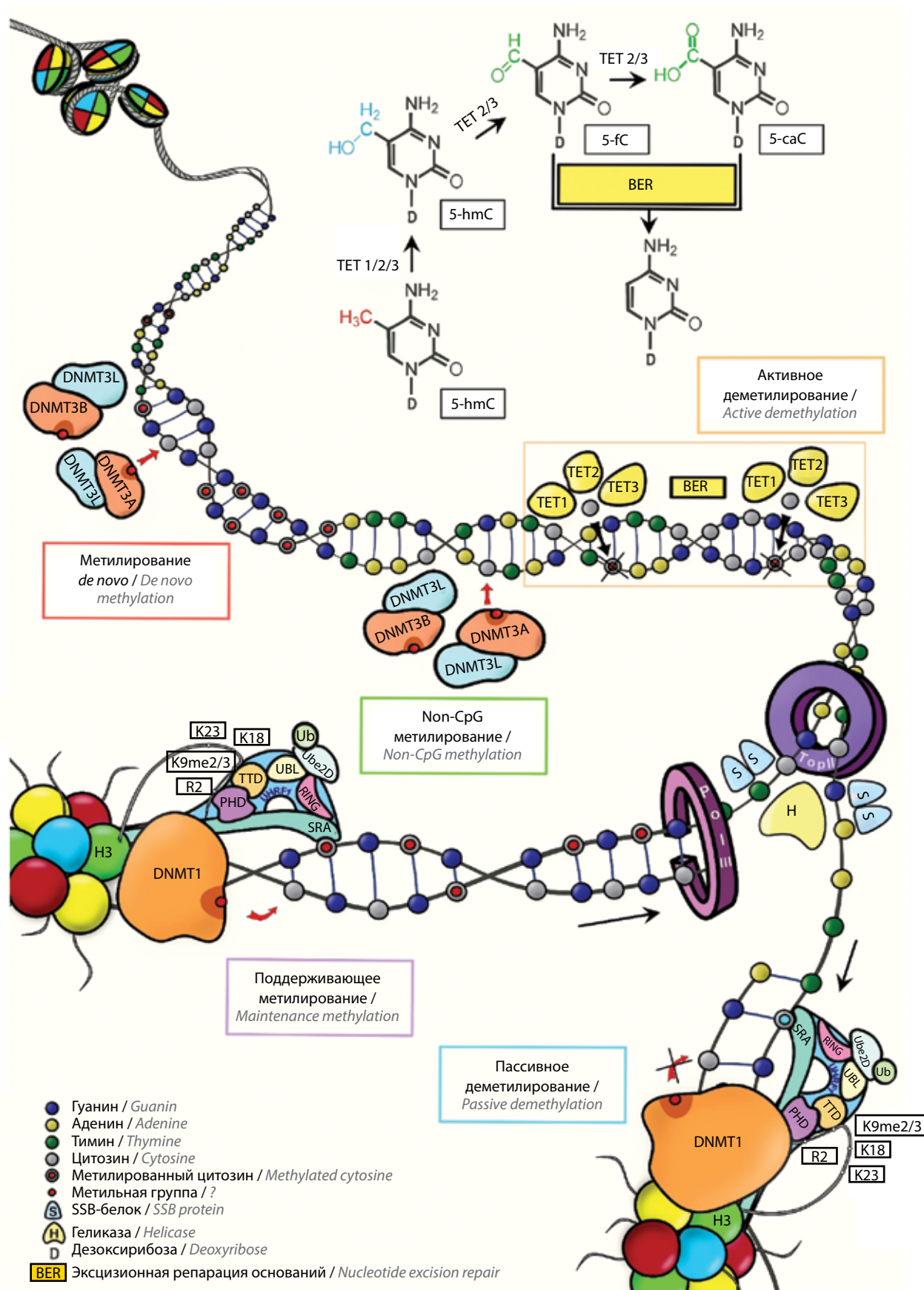
исходит при участии ферментов метилцитозиновых диоксигеназ (TETs), которые окисляют метильную группу цитозина до гидроксиметильной группы, вызывая превращение в 5-mC в 5-hmC. Впоследствии белки TETs окисляют 5-гидроксиметилцитозин до 5-формилцитозина (5-fC) и 5-карбоксиметилцитозина (5-caC) [25]. Образование 5-fC и 5-caC приводит к запуску механизма эксцизионной репарации оснований (base excision repair, BER), что вызывает замену цитозина на неметилированный (см. рисунок) [26].

Гидроксиметилирование цитозина является стабильной меткой, которая располагается в промоторах, энхансерах и экзонах генов и участвует в формировании структуры хроматина и регуляции экспрессии генов [27]. В геноме человека метилировано почти 4 % цитозинов, в то время как доля 5-hmC составляет 0,5–0,005 % от общего количества нуклеотидов [28, 29]. Профилирование 5hmC в эмбриональных стволовых клетках мыши показало, что только 4 % 5hmC находится в промоторах генов, тогда как 48 % располагается в межгенных областях, а 48 % – в теле гена [30]. Относительное содержание 5-hmC тканеспецифично и составляет в головном мозге – 0,67 %, сердце – 0,05 %, почках – 0,38 %, толстой кишке – 0,45 %, прямой кишке – 0,57 %, печени – 0,46 %, легких – 0,14 %, молочной железе – 0,05 %, плаценте – 0,06 % [31].

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

Онкологические заболевания характеризуются нарушением паттерна метилирования ДНК, включающим общее снижение уровня метилированных цитозинов одновременно с гиперметилированием определенных CpG-островков. Аберрантное гиперметилирование ДНК приводит к транскрипционному молчанию и инактивации генов супрессоров опухолей, тогда как гипометилирование связано с хромосомной нестабильностью и потерей импринтинга [32]. Гиперметилирование генов супрессоров опухолевого роста характерно для таких заболеваний, как лейкозы различного генеза, немелкоклеточный рак легких, колоректальный рак, рак молочной железы, предстательной железы и мочевого пузыря [33–43].

Паттерны гидроксиметилирования в опухолевых клетках также подвергаются изменению. При раке толстой кишки и прямой кишки количество гидроксиметилированной ДНК снижается более чем в 10 раз [31]. Кроме того, у пациентов с метастатическим раком легкого наблюдается уменьшение содержания 5-hmC в клетках крови [28]. Снижение уровня 5-hmC по сравнению с нормальными тканями также характерно при раке предстательной железы, молочной железы, а также раке печени и легкого [40]. Кроме того, низкие уровни 5-hmC коррелируют с низкими показателями выживаемости при глиоме, меланоме, раке молочной железы и печени [41].



Механизм метилирования и деметилирования ДНК
DNA methylation and demethylation mechanisms

Нарушение профиля метилирования ДНК в опухолях может быть обусловлено мутацией, эпигенетической репрессией или гиперэкспрессией генов ферментов — ДНК-метилтрансфераз (DNMTs) и белков семейства ТЕТ.

НАРУШЕНИЯ СТРУКТУРЫ ГЕНОВ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

Мутации DNMT3a являются одним из ключевых событий, происходящих на ранних стадиях ряда заболеваний системы крови, таких как острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и миелодиспластический синдром (МДС) [44–47]. Наиболее распространенными патогенетически значимыми мутациями DNMT3a при МДС и ОМЛ являются миссенс-мутации аргинина в кодоне 882 (R882) — rs147001633 (G>T, G>C, G>A) и rs377577594 (C>T, C>G, C>A) [45, 48]. Мутации R882 обнаруживаются в 53 % случаев мутаций DNMT3a у пациентов с ОМЛ и коррелируют с ухудшением показателей общей выживаемости и ускоренным прогрессированием заболевания [46, 47, 49]. У больных МДС наличие мутаций R882 в ферменте DNMT3a ассоциировано с повышением вероятности возникновения ОМЛ в 15 раз [46]. Также мутации DNMT3a R882 коррелируют с развитием резистентности к препаратам антрациклинового ряда, в том числе доксорубину [50]. Мутация rs147001633 может возникать в гемопоэтических стволовых клетках и приводить к клональной экспансии клеток, несущих мутантный аллель, за месяцы и годы до постановки диагноза [51]. Например, в ходе исследования D. Midic и соавт. при генотипировании здоровых добровольцев до 80 лет были обнаружены патогенетические варианты rs147001633 и rs377577594 [52]. Исследование N.M. Varela и соавт. продемонстрировало, что мутация rs147001633 наиболее часто встречается в популяциях африканцев и выходцев из Южной Азии [53]. При этом было показано, что у корейских пациентов с ОМЛ мутации rs147001633 и rs139293773 не влияют на клинические проявления и прогноз заболевания.

Полиморфизмы генов DNMT1, DNMT3a и DNMT3b весьма разнообразны, их ассоциация с повышением или понижением риска развития ЗНО может зависеть от этнической группы, популяции внутри нее или даже зоны проживания. Согласно G. Xiang и соавт., у представительниц популяции Хань, проживающих в провинции Хэйлунцзян (северо-восток Китая), при однонуклеотидном полиморфизме rs16999593 DNMT1 частота генотипа DNMT1–290 СТ отрицательно коррелирует с возникновением инфильтрирующей карциномы молочной железы [54]. Однако в другом исследовании было показано, что у женщин из популяции Хань, проживающих на юге Китая, генотип DNMT1–290 СТ (rs16999593) ассоциирован с повышенным риском развития рака молочной железы [55]. Также для китайской популяции Хань было

выявлено, что генотип DNMT3a–786 GG (rs1550117) ассоциирован с предрасположенностью к немелкоклеточному раку легкого [56].

Полиморфизм rs16999593 гена DNMT1, наряду с полиморфизмами rs11254413 гена DNMT2 и rs13420827 гена DNMT3a, ассоциирован с риском развития рака желудка у южно-китайской популяции [57]. В другом исследовании выявлена ассоциация гомозиготного варианта DNMT1 GG (rs2228612) с более низким риском развития рака молочной железы у женщин из центрально-европейской популяции [58]. Было показано, что однонуклеотидные полиморфизмы rs2424913 и rs1569686, приводящие к гомозиготным генотипам DNMT3b–149 TT и DNMT3b–579 TT соответственно, в популяции нелатиноамериканских мужчин, курящих и употребляющих алкоголь, ассоциированы с риском возникновения плоскоклеточного рака головы и шеи [59]. Также полиморфизм DNMT3b–579 G>T (rs1569686) ассоциирован с повышенным риском возникновения колоректального рака в азиатской популяции [60]. В свою очередь, результаты метаанализа S. Zhu и соавт. подтверждают положительную корреляцию между генотипом DNMT3b–579 TT и повышенным риском возникновения колоректального рака в азиатской популяции, а для генотипов DNMT3b–579 GG+GT (rs1569686) — отрицательную корреляцию [61]. Также было показано, что однонуклеотидный полиморфизм DNMT3b C>T (rs2424913) связан со значительным снижением риска развития рака у африканского населения [62]. Согласно метаанализу 2016 г., риск возникновения рака желудка увеличивается при однонуклеотидном полиморфизме rs16999593 в DNMT1 и rs1550117 в DNMT3a, но уменьшается при заменах rs1569686 в DNMT3b [63]. Такие разнонаправленные эффекты полиморфизмов предположительно объясняются тем, что определенные генотипы могут обуславливать большую или меньшую восприимчивость к определенному гистологическому типу рака.

Изменения в генах ДНК-метилтрансфераз, ассоциированные со злокачественными новообразованиями, представлены в табл. 1.

НАРУШЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ДНК- МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

Гиперэкспрессия ферментов ДНК-метилтрансфераз DNMT1, DNMT3a, DNMT3b как на транскрипционном, так и на трансляционном уровнях является характерным признаком для многих типов ЗНО. Наиболее важную роль сверхэкспрессия DNMTs играет в развитии опухолей кроветворной системы — лимфом и лейкозов. Исследования показывают, что все DNMTs значительно гиперэкспрессированы в большинстве случаев ОМЛ и в острой фазе хронического миелоидного лейкоза по сравнению с гемопоэтическими стволовыми клетками костного мозга у здоровых людей [65, 66]. Ключевым патогенетическим

Таблица 1. Изменения в генах ДНК-метилтрансфераз, ассоциированные со злокачественными новообразованиями

Table 1. The most common mutations in DNMT genes, that are associated with malignant neoplasms

Фермент Enzyme	Идентификатор мутации Mutation ID	Злокачественное новообразование Malignant tumor	Тип данных Data type	Источник Source
DNMT1	rs16999593 (T>C) rs2228611 (T>A/T>C)	Рак желудка Gastric cancer	Ex vivo (n = 3959)	[63]
	rs16999593 (T>C)		Ex vivo (n = 242)	[57]
	rs16999593 (T>C) rs2228611 (T>A/T>G)	Рак молочной железы Breast cancer	Ex vivo (n = 305)	[54]
	rs16999593 (T>C)		Ex vivo (n = 408)	[55]
	rs2228612 (T>G)		Ex vivo (n = 221)	[58]
DNMT3a	rs147001633 (C>T) rs147828672 (T>C) rs377577594 (G>A)	Миелодиспластический синдром Myelodysplastic syndrome	Ex vivo (n = 469)	[44]
	rs147001633 (C>A/C>G/C>T) rs377577594 (G>A/G>C/G>T)		Ex vivo (n = 14173)	[46]
	rs147001633 (C>T) rs149095705 (G>A) rs757823678 (C>A) rs367909007 (G>C)		Ex vivo (n = 150)	[48]
	rs147001633 (C>T) rs144689354 (G>A) rs377577594 (G>A) rs147828672 (T>C) rs771174392 (T>C) rs758845779 (G>A)	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukemia	Ex vivo (n = 142)	[45]
	rs147001633 (C>A/C>G/C>T) rs377577594 (G>A/G>C/G>T)		Ex vivo (n = 281)	[49]
	rs147001633 (C>T) rs139293773 (C>A)		Ex vivo (n = 67)	[64]
	rs147001633 (C>A/C>G/C>T)	Рак предстательной железы Prostate cancer	Ex vivo (n = 167)	[53]
	rs1550117 (A>G)	Рак желудка Gastric cancer	Ex vivo (n = 3959)	[63]
	rs13420827 (C>G)		Ex vivo (n = 242)	[57]
	rs1550117 (A>G)	Немелкоклеточный рак легкого Non-small cell lung cancer	Ex vivo (n = 600)	[56]
DNMT3b	rs2424913 (C>T) rs1569686 (G>T)	Плоскоклеточный рак головы и шеи Head and neck squamous cell carcinoma	Ex vivo (n = 832)	[59]
	rs1569686 (G>T) rs2424913 (C>T)	Рак желудка Gastric cancer	Ex vivo (n = 3959)	[63]
	rs1569686 (G>T)	Колоректальный рак Colorectal cancer	Ex vivo (n = 4620)	[60]
	rs1569686 (G>T)		Ex vivo (n = 15647)	[61]

Примечание. Жирным шрифтом выделены патогенетически значимые соматические мутации.

Note. Pathogenetically significant somatic mutations are shown in bold.

механизмом с участием DNMT1 при лейкозах является опосредованное DNMT1 подавление экспрессии ингибитора циклинзависимой киназы – белка p15. Потеря экспрессии p15 наблюдается в 80 % случаев ОМЛ, а гиперметилование его промотора часто ас-

социировано с более высокой степенью злокачественности. Было обнаружено, что 34 транскрипта DNMT1 активируются более чем в 5 раз в клетках костного мозга пациентов с ОМЛ, при этом у 72 % больных детектировано гиперметилование промотора гена *p15* [43].

Также отмечается ассоциация между высоким уровнем экспрессии DNMT3b и неблагоприятным исходом у пожилых пациентов (старше 60 лет) с ОМЛ [67]. В исследовании T.J. Zhang и соавт. было показано, что мутации и потеря экспрессии DNMT3a у больных с ОМЛ не являются независимыми событиями и ассоциированы с другими молекулярными патологическими изменениями (например, мутацией *NPM1*). В то же время низкая экспрессия DNMT3a служит независимым прогностическим маркером при ОМЛ и помогает в выборе лечения (применение химиотерапии или трансплатации гематopoэтических стволовых клеток) [66]. Показано, что повышенная экспрессия фермента DNMT1 у пациентов с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой ассоциирована с гиперэкспрессией генов, продукты которых играют ключевую роль в регуляции клеточного цикла и репликации ДНК (*CDK1*, *CCNA2*, *E2F2*, *PCNA*, *RFC5*, *POLD3* и др.) [68]. Также DNMT1 гиперэкспрессируется в опухолях немелкоклеточного рака легких, что, в свою очередь, приводит к гиперметилированию генов супрессоров опухолей *FHIT*, *p16INK4a* и *RARβ* [69].

По данным X. Chen и соавт., статус метилирования ДНК в различных подтипах рака молочной железы снижается в следующем порядке: HER2-положительный (HER2 — рецептор эпидермального фактора роста типа 2), трижды негативный и люминальный. При этом авторы заявляют об отсутствии статистически значимых различий между глобальным уровнем метилирования в опухолевых и нормальных клетках молочной железы из-за стохастического увеличения степени нарушений клеточных процессов, таких как старение на уровне популяции [70]. Полученные данные согласуются с результатами исследования K. Ennour-Idrissi и соавт., которые также не выявили корреляции между уровнем метилирования ДНК и раком молочной железы [71]. При этом биоинформатический анализ экспрессии ДНК-метилтрансфераз в опухолевой и нормальной тканях молочной железы показал ассоциацию уровня экспрессии DNMTs с развитием рака молочной железы. Транскрипты DNMT3b обнаружены в меньшем количестве, чем DNMT1 и DNMT3A, при различных типах и стадиях рака молочной железы. Однако именно гиперэкспрессия DNMT3b была ассоциирована с худшими показателями общей выживаемости. Самый высокий уровень экспрессии DNMT1 и DNMT3a наблюдался у пациентов с трижды негативным подтипом рака молочной железы. При этом уровни DNMT1 и DNMT3a были снижены у больных с раком молочной железы IV стадии, что может быть обусловлено глобальным гипометилированием, сопутствующим метастазированию [72].

В исследовании 2016 г. было показано, что экспрессия DNMT3a при аденокарциноме легкого характерна для опухолей с неинвазивным ростом и коррелирует с благоприятным прогнозом [73]. В то же время выявлена способность фермента DNMT3b усиливать

эффективность химически индуцированной трансформации иммортализованных hTERT и CDK4 клеток бронхоальвеолярного эпителия HBE2 [74]. Была установлена корреляция между гиперэкспрессией генов *DNMT3a* и *DNMT3b* и худшими показателями выживаемости пациентов с раком эндометрия. При этом наблюдалось снижение экспрессии генов рецепторов эстрогена (*ESR1*) и прогестерона (*PGR*) [75]. Было показано, что повышенный уровень экспрессии DNMT1 в тканях карциномы шейки матки статистически значимо коррелирует с худшим прогнозом течения заболевания [76]. Нарушение регуляции DNMT1, а также повышенная экспрессия генов *DNMT3a* и *DNMT3b* связаны с прогрессированием плоскоклеточного рака головы и шеи у пожилых пациентов [77, 78]. Согласно данным S.L. Zhao и соавт., при раке пищевода гиперэкспрессия DNMT1 обуславливает подавление активности генов супрессоров опухолей, а также коррелирует с метастазированием в лимфатические узлы [79]. Перстневидноклеточный рак желудка характеризуется гиперэкспрессией DNMT1 и снижением экспрессии DNMT3a при отсутствии изменений уровня ферментов DNMT2, DNMT3b и DNMT3L по сравнению со здоровой тканью [80]. D.-F. Peng и соавт. связывают aberrантные паттерны метилирования различных генов при раке поджелудочной железы с гиперэкспрессией DNMT1, при этом количество метилированных генов значительно коррелирует с более низкой дифференцировкой опухоли [81]. У пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой частота повышенной экспрессии DNMT1 коррелирует с низким уровнем дифференцировки клеток опухоли и поражением воротной вены, а также ассоциирована с худшими показателями безрецидивной и общей выживаемости [82].

Изменения уровней экспрессии генов ДНК-метилтрансфераз, ассоциированных со злокачественными новообразованиями, представлены в табл. 2.

Таким образом, нарушения в работе ферментов DNMTs играют наибольшую роль при опухолях кроветворной системы, таких как МДС, ОМЛ и диффузная В-крупноклеточная лимфома. Из-за гетерогенности клеточного состава солидных опухолей выявить четкую ассоциацию между ЗНО и уровнем метилирования ДНК довольно сложно. Однако частота мутаций и гиперэкспрессии генов *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b* демонстрирует роль этих ферментов в онкогенезе таких заболеваний, как рак молочной железы, простаты и легких.

НАРУШЕНИЯ СТРУКТУРЫ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА ТЕТ, ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

Белки семейства ТЕТ, опосредующие метаболические реакции гидроксирования, формилирования и карбоксилирования цитозина, как и ДНК-метилтрансферазы, играют большую роль в формировании фенотипа опухолевых клеток. Комплексный полногеномный анализ роли TET1, TET2 и TET3 в формировании

Таблица 2. Изменения уровней экспрессии генов ДНК-метилтрансфераз, ассоциированных со злокачественными новообразованиями

Table 2. Changes in expression levels of DNA methyltransferase genes associated with malignant tumors

Фермент Enzyme	Уровень экспрес- сии фермента в опухолях (↑↓) Enzyme expression level in tumor (↑↓)	Злокачественное новообразование Malignant tumor	Тип данных Data type	Источ- ник Source
DNMT1	↑	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukemia	<i>In silico, in vitro</i> (первичные культуры) <i>In silico, in vitro</i> (primary cultures)	[65]
	↑	Хронический миелоидный лейкоз Chronic myeloid leukemia	<i>In silico, in vitro</i> (первичные культуры) <i>In silico, in vitro</i> (primary cultures)	[65]
	↑	Диффузная В-крупноклеточная лимфома Diffuse large B-cell lymphoma	<i>In vitro</i> (DLBCL)	[68]
	↑	Рак легких Lung cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 100)	[69]
			<i>In vitro</i> (SCLC)	[83]
			<i>In vitro</i> (MCF-7)	[84]
			<i>In vitro</i> MDA-MB-231, SUM 149, MCF10A	[85]
	↑	Рак молочной железы Breast cancer	<i>In vivo</i> (мыши), <i>in vitro</i> (MCF7, T47D, ZR75.1, BT474, MDAMB361, MDA-MB-231, MDAMB453, MDAMB468, BT20) <i>In vivo</i> (mice), <i>in vitro</i> (MCF7, T47D, ZR75.1, BT474, MDAMB361, MDA-MB-231, MDAMB453, MDAMB468, BT20)	[86]
			<i>In vitro</i> (MCF-7, MDA-MB-231)	[87]
	↑	Рак шейки матки Cervical cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 76)	[76]
	↑	Рак головы и шеи Head and neck cancer	<i>In silico</i> (n = 501)	[78]
			<i>In silico</i> (n = 520)	[77]
	↑	Рак пищевода Esophageal cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 113), <i>in vitro</i> (EC109, EC9706, KYSE30, KYSE150, KYSE410, KYSE510, TE-1)	[79]
DNMT3a	↑	Рак поджелудочной железы Pancreatic cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 220)	[81]
	↑	Гепатоцеллюлярная карцинома Hepatocellular carcinoma	<i>Ex vivo</i> (n = 53), <i>in vitro</i> (HepG2, KYN2)	[82]
	↑	Рак мочевого пузыря Bladder cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 93)	[39]
	↑	Острый миелоидный лейкоз Lung cancer	<i>In silico</i> (n = 173)	[88]
	↓	Рак легких Lung cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 135), <i>in vitro</i> (A549, PL16T)	[73]
	↑	Рак молочной железы Breast cancer	<i>In silico</i>	[72]
	↑	Рак эндометрия Endometrial cancer	<i>In silico</i> (n = 544)	[75]
	↑	Меланома Melanoma	<i>In vitro</i> (B16), <i>in vivo</i> (мыши) <i>In vitro</i> (B16), <i>in vivo</i> (mice)	[89]
	↑	Рак головы и шеи Head and neck cancer	<i>In silico</i> (n = 501)	[78]

Окончание табл. 2

The end of table 2

Фермент Enzyme	Уровень экспрес- сии фермента в опухолях (↑↓) Enzyme expression level in tumor (↑↓)	Злокачественное новообразование Malignant tumor	Тип данных Data type	Источ- ник Source
DNMT3a	↓	Перстневидно-клеточный рак желудка Signet ring cell gastric cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 28)	[80]
	↑	Гепатоцеллюлярная карцинома Hepatocellular carcinoma	<i>In vitro</i> (QGY-7701, Bel-7402, Bel-7404, Bel-7405, SMMC-7721)	[90]
DNMT3b	↑	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukemia	<i>In silico</i> (n = 173)	[88]
			<i>Ex vivo</i> (n = 210)	[67]
	↑	Рак легких Lung cancer	<i>In vitro</i> (HBEC2, A549, Calu3, H2085, PC9, Calu6, SW900, H1975, H2023, H2228, H358, H1435, H1229, H2170, SKLU1, H226, H1993, H23, HCC827, SKMES, H125, H1568, H2009)	[74]
	↑	Рак молочной железы Breast cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 54)	[91]
			<i>In silico</i>	[72]
	↑	Рак эндометрия Endometrial cancer	<i>In silico</i> (n = 544)	[75]
	↑	Меланома Melanoma	<i>In vivo</i> (мыши) <i>In vivo</i> (mice)	[92]
	↑	Рак головы и шеи Head and neck cancer	<i>In silico</i> (n = 501)	[78]
	↑	Колоректальный рак Colorectal cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 765)	[93]
	↑	Рак предстательной железы Prostate cancer	<i>In vitro</i> (первичная культура E-PZ-231) <i>In vitro</i> (primary E-PZ-231 culture)	[38]

паттерна распределения 5mC и 5hmC в опухолевых клетках человека показал, что за появление модификации 5-hmC отвечает белок TET1, в меньшей степени — белки TET2, TET3, в то время как последующее удаление 5-hmC в каскаде деметилирования цитозина регулируется ферментами TET2 и TET3 [27]. Кроме того, была выявлена неожиданная ассоциация между гиперметилированием ДНК и высокой концентрацией меток 5-hmC. E.L. Putiri и соавт. показали, что обогащение 5-hmC в промоторах и/или телах генов способно создавать метастабильное транскрипционно перmissive состояние, в результате нарушения которого могут произойти гиперметилирование ДНК и репрессия транскрипции [94].

Мутации в генах *TET* являются распространенными событиями при ЗНО. По данным базы TCGA, наиболее часто (более чем в 15 % случаев) мутации в генах *TET1* и *TET3* встречаются у пациентов с меланомой и раком эндометрия [95–104]. Мутации в гене *TET2* в основном выявляются при раке эндометрия, ОМЛ и меланоме. При этом наблюдается статисти-

ческая значимая корреляция между наличием мутаций и худшим прогнозом выживаемости для всех 3 генов у пациентов с меланомой и раком эндометрия. По данным проекта Американской ассоциации исследований рака (American Association for Cancer Research, AACR) Project GENIE Consortium, мутация гена *TET2* встречается в 37,9 % случаев хронического миелоидного лейкоза, в 14,29 % — всех острых лимфобластных лейкозов, в 12,48 % — МДС, в 10 % — ОМЛ и меланомы [105]. Кроме того, мутации с участием *TET2* были описаны в исследованиях по возрастному клональному кроветворению [106].

Изменения в генах, кодирующих цитозиндиоксигеназы, ассоциированные со злокачественными новообразованиями, представлены в табл. 3.

НАРУШЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА ТЕТ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

Белки ТЕТ являются важным звеном в регуляции экспрессии генов, а также выполняют многомерные

Таблица 3. Изменения в генах, кодирующих цитозиндиоксигеназы, ассоциированные со злокачественными новообразованиями

Table 3. Changes in genes coding methylcytosine dioxygenases associated with malignant tumors

Фермент Enzyme	Идентификатор мутации Mutation ID			Злокачественное новообразование Malignant tumor	Тип данных Data type	Источник Source
TET1	rs139785845 (C>G)			Миелодиспластический синдром Myelodysplastic syndrome	Ex vivo (n = 83)	[106]
TET2	c.434G>A c.935A>G c.1379C>T c.1997A>G c.2821C>T c.3403G>A c.3575T>G c.3609A>T c.3639C>T c.3724A>T c.3733A>C c.3780C>T c.3781G>A	c.3862G>T c.4074C>T c.4080G>C c.4248G>T c.5151G>T c.5268C>G c.5283A>T c.5430T>C c.5617T>C c.5641A>G c.5698T>C c.5754C>T	c.5776G>A c.5780G>A c.5820C>T c.5896G>A c.5920C>T c.5998G>A c.100C>T c.520C>A c.2599T>C c.3418A>T c.3451A>C c.5166C>T	Миелодиспластический синдром Myelodysplastic syndrome	Ex vivo (n = 354)	[107]
	c.1623C>T Delc. 3022_3023 (CA) Ins4636 (GCTCA) c.2820C>T c. 4559C>A c.4500C>T c. 5850C>T c.6508C>T	c.5163C>T Insc. 2617 (T) c. 3869G>A c. 5469C>T c.4998C>T Delc. 3442 (A) Delc. 5521_5524 (CAGA) c.4435G>T	Insc. 2519 (G) c.6012G>T c.4753G>A Delc. 2653 (A) c.5109G>T	Хронический миелоидный лейкоз Chronic myeloid leukemia	Ex vivo (n = 30)	[108]
TET3	rs564392898 (c.5278_5280del) rs199849765 (G>A) rs768310475 (c.3980_3981insACTGAG) rs767538752 (T>C) rs745953793 (C>G) rs190925009 (G>T)			Миелодиспластический синдром Myelodysplastic syndrome	Ex vivo (n = 83)	[106]
	c.5243dupG			Рак желудка Gastric cancer	Ex vivo (n = 79)	[109]
	c.1052dupA c.1052delA c.5243dupG			Колоректальный рак Colorectal cancer	Ex vivo (n = 124)	[109]

функции в процессе метилирования ДНК. Аберрантная экспрессия белков семейства ТЕТ является характерным признаком для многих видов ЗНО. Известно, что белок ТЕТ1 является онкогеном, обуславливающим развитие лейкоза. В исследовании J. Wang и соавт. было продемонстрировано, что когорты пациентов с ОМЛ, у которых наблюдалась высокая экспрессия ТЕТ1, имели худшие показатели общей выживаемости. Кроме того, определены гиперэкспрессия кластеров генов, регулирующих клеточный цикл, метаболизм пуринов, пиримидинов, транспорт РНК и пути биогенеза рибосом, и сниженная экспрессия генов, вовлеченных в сигнальный путь МАРК [110]. При немелкоклеточном раке легкого также была выявлена корреляция между высоким уровнем экспрессии ТЕТ1 и низким уровнем выживаемости пациентов [111].

Было выявлено, что в тканях карциномы простаты повышенная экспрессия ТЕТ1 коррелирует с деметилированием промотора и усиленной экспрессией генов, кодирующих факторы транскрипции, что опосредует активацию сигнальных путей, регулирующих противовирусный ответ и плюрипотентность стволовых клеток [112].

Тем не менее пониженный уровень экспрессии ТЕТ1 в ряде нозологий связан с опухолевым ростом, повышенной клеточной инвазией и метастазированием. Q. Ке и соавт. показали, что высокий уровень экспрессии ТЕТ1 в опухолевой ткани тесно связан с лучшими показателями общей выживаемости у пациентов азиатской популяции с опухолями органов дыхания и молочной железы [113]. Снижение экспрессии ТЕТ1 характерно для карциномы эндометрия,

но не для предраковых заболеваний, таких как гиперплазия эндометрия. Отмечается, что высокий уровень экспрессии TET1 при раке эндометрия коррелирует с хорошими показателями выживаемости, что может быть использовано в качестве прогностического маркера [114]. Опухоли желудка также характеризуются пониженным уровнем экспрессии TET1. В норме TET1 связывается с промоторной областью гена-супрессора опухолей *PTEN* и активирует его транскрипцию посредством активного деметилирования CpG-островков. Репрессия гена *TET1* активирует пути AKT и FAK, подавляемые *PTEN*, что, в свою очередь, приводит к усилению процессов пролиферации, миграции и инвазии клеток [115]. На модели гепатоцеллюлярной карциномы *in vitro* была продемонстрирована реактивация экспрессии генов супрессоров опухолей *APC*, *p16*, *RASSF1A* и *SOC3* при гиперэкспрессии гена *TET1*. При этом процессы пролиферации, миграции и инвазии были подавлены [116]. TET1 играет большую роль в подавлении пролиферации опухолевых клеток кишечника за счет нарушения активности сигнального пути β -катенина. При этом уровень экспрессии TET1 при колоректальном раке значительно снижен по сравнению с нормальной тканью кишечника [117, 118].

Низкая экспрессия TET2 является прогностическим фактором для ряда ЗНО у взрослых пациентов и детей. Показано, что уровень экспрессии TET2 значительно снижен у пациентов с ОМЛ. При этом частота уменьшения уровня экспрессии TET2 была обратно пропорциональна степени дифференцировки клеток [119]. Низкий уровень экспрессии TET2 отмечается также у детей с острым лимфобластным лейкозом, причем наблюдается корреляция уровня экспрессии гена с более низкой 5-летней общей выживаемостью [120]. Исследование W. Zhang и соавт. показало, что экспрессия TET2 снижена у пациентов с МДС и коррелирует со стадией заболевания по шкале International Prostate Symptom Score (IPSS) [121]. Авторы продемонстрировали, что низкий уровень TET2 при эпителиальном раке яичников коррелирует с патологической стадией, классификацией опухоли, степенью метастазирования, сосудистым тромбозом и общей выживаемостью [122]. Согласно данным M.L. Nickerson и соавт., уменьшение экспрессии TET2 в опухолях предстательной железы также может быть информативным биомаркером для выявления пациентов с вероятностью прогрессирования метастатического заболевания и ухудшением показателей общей выживаемости [123].

Белок TET3 регулирует пролиферацию, метастазирование и инвазию опухолевых клеток [124–126]. Уровень экспрессии TET3 различается в зависимости от нозологии онкологического заболевания, в связи с чем нельзя дать однозначную оценку его роли в канцерогенезе. В исследовании H.Y. Mo и соавт. было показано, что экспрессия TET3 снижена в 30 % случаев рака желудка и колоректального рака по сравне-

нию с нормальными тканями [109]. При раке головы и шеи также наблюдалось уменьшение экспрессии TET3, при этом гиперметилирование островков CpG в промоторе TET3 было связано с агрессивным поведением опухоли при раке ротоглотки и полости рта [127]. Также продемонстрирована роль экспрессии TET3 в регуляции роста и самообновления стволовых клеток глиобластомы [128, 129]. Повышенная экспрессия TET3 отмечается при плоскоклеточном раке пищевода. При этом данный белок задействован в процессах пролиферации, миграции и химиорезистентности клеток, а также опосредует индуцирование стволовости клеток, в том числе через сигнальный путь LPS-TET3-HOXB2 [125]. Похожая картина наблюдается в клетках рака поджелудочной железы [130]. Также было показано, что повышенная экспрессия TET3 в клетках рака яичников и щитовидной железы коррелирует с неблагоприятными для этих заболеваний клинико-патологическими особенностями [126, 131]. Кроме того, сверхэкспрессия TET3 при ОМЛ расценивается как прогностический биомаркер данного заболевания и определяет стратегию его лечения [132].

Изменения уровней экспрессии генов белков семейства TET, ассоциированных со злокачественными новообразованиями, представлены в табл. 4.

Исследования мутационного профиля и паттернов экспрессии генов TET1, TET2, TET3 показали важность этих ферментов для прогрессии ЗНО. Повышенные уровни TET1 и TET3 при таких заболеваниях, как ОМЛ, немелкоклеточный рак легких и рак предстательной железы, позволяют рассматривать данные ферменты в качестве мишеней для эпигенетической противоопухолевой терапии. В свою очередь, белок TET2, экспрессия которого снижена во многих ЗНО, может выступать в роли прогностического маркера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизмы эпигенетической регуляции транскрипции играют большую роль в регуляции экспрессии генов и стабильности генома. Большинство ЗНО характеризуются изменением паттерна метилирования ДНК, которое сопровождается гиперметилированием промоторных областей и некодирующих последовательностей. Аберрантная активность или потеря функции ферментов, участвующих в метилировании и деметилировании ДНК (DNMTs и TETs), была обнаружена при таких заболеваниях, как ОМЛ, МДС, колоректальный рак, рак головы и шеи, желудка, немелкоклеточный рак легких, гепатоцеллюлярная карцинома и др. Анализ опубликованных данных продемонстрировал клиническую значимость некоторых мутаций, а также гипо- и гиперэкспрессии ферментов DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, TET1, TET2 и TET3 при целом ряде ЗНО. Имеющиеся сведения демонстрируют важность и необходимость исследований, направленных на изучение механизмов метилирования и деметилирования ДНК, а также на анализ

Таблица 4. Изменения уровней экспрессии генов белков семейства TET, ассоциированных со злокачественными новообразованиями

Table 4. Changes in TET family protein expression levels associated with malignant tumors

Фермент Enzyme	Уровень экспрес- сии фермента в опухолях (↑↓) Enzyme expression level in tumor (↑↓)	Злокачественное новообразование Malignant tumor	Тип данных Data type	Источ- ник Source
TET1	↑	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukemia	<i>Ex vivo</i> (n = 360)	[110]
	↓	Острый моноцитарный лейкоз Acute monocytic leukemia	<i>In vitro</i> (THP-1), <i>in vivo</i> (мыши), <i>in silico</i> <i>In vitro</i> (THP-1), <i>in vivo</i> (mice), <i>in silico</i>	[133]
	↓	Гистиоцитарная лимфома Histiocytic lymphoma	<i>In vitro</i> (U937), <i>in vivo</i> (мыши), <i>in silico</i> <i>In vitro</i> (U937), <i>in vivo</i> (mice), <i>in silico</i>	[133]
	↑	Рак легких Lung cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 96)	[111]
	↓		<i>In silico</i> (n = 3100)	[113]
		Рак молочной железы Breast cancer	<i>In silico</i> (n = 3100)	[113]
			<i>Ex vivo</i> (n = 50)	[134]
	↓		<i>In vitro</i> (MDA-MB-231, Hs 578T, BT-549, MCF-7, T47D, SKBR3), <i>in vivo</i> (мыши), <i>in silico</i> <i>In vitro</i> (MDA-MB-231, Hs 578T, BT-549, MCF-7, T47D, SKBR3), <i>in vivo</i> (mice), <i>in silico</i>	[133]
	↓		<i>Ex vivo</i> (n = 15)	[114]
	↓	Рак желудка Gastric cancer	<i>In vitro</i> (первичные культуры, NCI-N87, SGC-7901) <i>In vitro</i> (primary cultures, NCI-N87, SGC-7901)	[115]
		Колоректальный рак Colorectal cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 109)	[118]
	↓		<i>Ex vivo</i> (n = 9)	[117]
			<i>In vitro</i> (HT29), <i>in vivo</i> (мыши), <i>in silico</i> <i>In vitro</i> (HT29), <i>in vivo</i> (mice), <i>in silico</i>	[133]
	↓	Гепатоцеллюлярная карцинома Hepatocellular carcinoma	<i>In vitro</i> (LO2, SMMC-7721), <i>in vivo</i> (мыши) <i>In vitro</i> (LO2, SMMC-7721), <i>in vivo</i> (mice)	[116]
	↑	Рак предстательной железы Prostate cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 50)	[112]
	↓		<i>In vitro</i> (PC3), <i>in vivo</i> (мыши), <i>in silico</i> <i>In vitro</i> (PC3), <i>in vivo</i> (mice), <i>in silico</i>	[133]
	↓	Почечно-клеточный рак Renal cell carcinoma	<i>In vitro</i> (786-O), <i>in vivo</i> (мыши), <i>in silico</i> <i>In vitro</i> (786-O), <i>in vivo</i> (mice), <i>in silico</i>	[133]
	↓	Меланома Melanoma	<i>In vitro</i> (A375), <i>in vivo</i> (мыши), <i>in silico</i> <i>In vitro</i> (A375), <i>in vivo</i> (mice), <i>in silico</i>	[133]
	↓	Рак щитовидной железы Thyroid cancer	<i>In vitro</i> (TPC1), <i>in vivo</i> (мыши), <i>in silico</i> <i>In vitro</i> (TPC1), <i>in vivo</i> (mice), <i>in silico</i>	[133]
TET2	↓	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukemia	<i>Ex vivo</i> (n = 169)	[119]
	↓	Острый лимфобластный лейкоз Acute lymphoblastic leukemia	<i>Ex vivo</i> (n = 136)	[120]
	↓	Миелодиспластический синдром Myelodysplastic syndrome	<i>Ex vivo</i> (n = 32)	[121]

Окончание табл. 4
The end of table 4

Фермент Enzyme	Уровень экспрес- сии фермента в опухолях (↑↓) Enzyme expression level in tumor (↑↓)	Злокачественное новообразование Malignant tumor	Тип данных Data type	Источ- ник Source
TET2	↓	Рак эндометрия Endometrial cancer	<i>In silico</i> (n = 88)	[135]
	↓	Эпителиальный рак яичников Epithelial ovarian cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 130)	[122]
	↑	Рак предстательной железы Prostate cancer	<i>In vitro</i> (LNCaP)	[123]
TET3	↑	Плоскоклеточный рак пищевода Squamous cell esophageal cancer	<i>In vitro</i> (первичные культуры – 299 образцов <i>ex vivo</i>), <i>in vivo</i> (мыши); <i>in vitro</i> Eca109, KYSE510, KYSE150, TE-1, HEEC) <i>In vitro</i> (primary cultures, 299 <i>ex vivo</i> samples), <i>in vivo</i> (mice); <i>in vitro</i> Eca109, KYSE510, KYSE150, TE-1, HEEC)	[125]
	↑	Рак поджелудочной железы Pancreatic cancer	<i>In vitro</i> (первичные культуры – 8 образцов <i>ex vivo</i>), MIAPACA2, BXPC3, PANC1; <i>in vivo</i> (мыши) <i>In vitro</i> (primary cultures, 8 <i>ex vivo</i> samples), MIAPACA2, BXPC3, PANC1; <i>in vivo</i> (mice)	[130]
	↓	Рак желудка Gastric cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 203)	[109]
	↓	Колоректальный рак Colorectal cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 203)	[109]
	↓	Рак головы и шеи Head and neck cancer	<i>Ex vivo</i> (n = 233)	[127]
	↓	Глиобластома Glioblastoma	<i>Ex vivo</i> (n = 21), <i>in vitro</i> (LN229)	[128]
	↑	Рак щитовидной железы Thyroid cancer	<i>In vitro</i> (первичные культуры – 50 образцов <i>ex vivo</i>); <i>in</i> <i>vitro</i> (TPC-1, BCPAP) <i>In vitro</i> (primary cultures, 50 <i>ex vivo</i> samples); <i>in vitro</i> (TPC-1, BCPAP)	[126]

функций ДНК-метилтрансфераз и белков семейства TET, как для улучшения диагностики, так и для разра-
ботки подходов к совершенствованию противоопухо-
левой терапии.

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

1. Sharma S., Kelly T.K., Jones P.A. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis 2010;31(1):27–36. DOI: 10.1093/carcin/bgp220

2. Fujimura A., Pei H., Zhang H. et al. Editorial: the role of epigenetic modifications in cancer progression. Front Oncol 2021;10:617178. DOI: 10.3389/FONC.2020.617178

3. Cheng Y., He C., Wang M. et al. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. Signal Transduc Target Ther 2019;4(1):62. DOI: 10.1038/S41392-019-0095-0

4. Лихтенштейн А.В., Киселева Н.П. Метилирование ДНК и канцерогенез. Биохимия 2001;66(3):293–317. Lichtenstein A.V., Kiseleva N.P. DNA methylation and carcinogenesis. Biohimiya = Biochemistry 2001;66(3):293–317. (In Russ.).

5. Nishiyama A., Nakanishi M. Navigating the DNA methylation landscape of cancer. Trends Genetics 2021;37(11):1012–27. DOI: 10.1016/J.TIG.2021.05.002

6. Casalino L., Verde P. Multifaceted roles of DNA methylation in neoplastic transformation, from tumor suppressors to EMT and metastasis. Genes 2020;11(8):922. DOI: 10.3390/GENES11080922

7. Romero-Garcia S., Prado-Garcia H., Carlos-Reyes A. Role of DNA methylation in the resistance to therapy in solid tumors. Front Oncol 2020;10:1152. DOI: 10.3389/FONC.2020.01152/XML/NLM

8. Takeshima H., Niwa T., Yamashita S. et al. TET repression and increased DNMT activity synergistically induce aberrant DNA methylation. J Clin Invest 2020;130(10):5370–9. DOI: 10.1172/JCI124070

9. Kulis M., Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 2010;70(C):27–56. DOI: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2
10. Lu Y., Chan Y.T., Tan H.Y. et al. Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *Mol Cancer* 2020;19:1–16. DOI: 10.1186/S12943-020-01197-3
11. Suh D.H., Kim M.K., Kim H.S. et al. Epigenetic therapies as a promising strategy for overcoming chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *J Cancer Prev* 2013;18(3):227–34. DOI: 10.15430/JCP.2013.18.3.227
12. Tuorto F., Herbst F., Alerasool N. et al. The tRNA methyltransferase Dnmt2 is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis. *EMBO J* 2015;34(18):2350–62. DOI: 10.15252/EMBJ.201591382
13. Hervouet E., Peixoto P., Delage-Mourroux R. et al. Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma. *Clin Epigen* 2018;10:1–18. DOI: 10.1186/S13148-018-0450-Y
14. Zhang J., Yang C., Wu C. et al. DNA methyltransferases in cancer: biology, paradox, aberrations, and targeted therapy. *Cancers* 2020;12(8):2123. DOI: 10.3390/CANCERS12082123
15. Gao L., Emperle M., Guo Y. et al. Comprehensive structure-function characterization of DNMT3b and DNMT3a reveals distinctive de novo DNA methylation mechanisms. *Nat Commun* 2020;11(1). DOI: 10.1038/s41467-020-17109-4
16. Harrison J.S., Cornett E.M., Goldfarb D. et al. Hemi-methylated DNA regulates DNA methylation inheritance through allosteric activation of H3 ubiquitylation by UHRF1. *Elife* 2016:e17101. DOI: 10.7554/ELIFE.17101
17. Xue B., Zhao J., Feng P. et al. Epigenetic mechanism and target therapy of UHRF1 protein complex in malignancies. *Onco Targets Ther* 2019;12:549–59. DOI: 10.2147/OTT.S192234
18. Ge Y.Z., Pu M.T., Gowher H. et al. Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. *J Biol Chem* 2004;279(24):25447–54. DOI: 10.1074/JBC.M312296200
19. Patil V., Ward R.L., Hesson L.B. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigen* 2014;9(6):823–8. DOI: 10.4161/EPI.28741
20. Ma H., Morey R., O'Neil R.C. et al. Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature* 2014;511(7508):177–83. DOI: 10.1038/nature13551
21. Liao J., Karnik R., Gu H. et al. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3a and DNMT3b in human embryonic stem cells. *Nat Genet* 2015;47(5):469–78. DOI: 10.1038/NG.3258
22. Lister R., Pelizzola M., Dowen R.H. et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 2009;462(7271):315–22. DOI: 10.1038/NATURE08514
23. Shirane K., Toh H., Kobayashi H. et al. Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. *PLoS Genet* 2013;9(4):e1003439. DOI: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1003439
24. Hashimoto H., Liu Y., Upadhyay A.K. et al. Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res* 2012;40(11):4841–9. DOI: 10.1093/NAR/GKS155
25. Kohli R.M., Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 2013;502(7472):472–9. DOI: 10.1038/nature12750
26. Kantidze O.L., Razin S.V. 5-hydroxymethylcytosine in DNA repair: A new player or a red herring? *Cell Cycle* 2017;16(16):1499–501. DOI: 10.1080/15384101.2017.1346761
27. Breiling A., Lyko F. Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics Chromatin* 2015;8(1):1–9. DOI: 10.1186/S13072-015-0016-6/FIGURES/3
28. Chowdhury B., Cho I.H., Hahn N., Irudayaraj J. Quantification of 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine and 5-carboxymethylcytosine from the blood of cancer patients by an enzyme-based immunoassay. *Anal Chim Acta* 2014;852:212–7. DOI: 10.1016/J.ACA.2014.09.020
29. Rodger E.J., Chatterjee A., Morison I.M. 5-hydroxymethylcytosine: a potential therapeutic target in cancer. *Epigenetics* 2014;6(5):503–14. DOI: 10.10217/EPI.14.39
30. Wu H., D'Alessio A.C., Ito S. et al. Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev* 2011;25(7):679–84. DOI: 10.1101/GAD.2036011
31. Li W., Liu M. Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. *J Nucleic Acids* 2011;2011:870726. DOI: 10.4061/2011/870726
32. Esteller M., Herman J.G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002;196(1):1–7. DOI: 10.1002/PATH.1024
33. Wallwitz J., Aigner P., Stoiber D. Tumor suppressors in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2021;62(10):2320–30. DOI: 10.1080/10428194.2021.1907372
34. Ng J.M.K., Yu J. Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes as potential biomarkers in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2015;16(2):2472–96. DOI: 10.3390/IJMS16022472
35. De Almeida B.P., Apolônio J.D., Binnie A., Castelo-Branco P. Roadmap of DNA methylation in breast cancer identifies novel prognostic biomarkers. *BMC Cancer* 2019;19(1):219. DOI: 10.1186/S12885-019-5403-0
36. Park J.Y. Promoter hypermethylation in prostate cancer. *Cancer Control* 2010;17(4):245–55. DOI: 10.1177/107327481001700405
37. Zhang W., Flemington E.K., Deng H.W., Zhang K. Epigenetically silenced candidate tumor suppressor genes in prostate cancer: identified by modeling methylation stratification and applied to progression prediction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2019;28(1):198–207. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0491
38. Kobayashi Y., Absher D.M., Gulzar Z.G. et al. DNA methylation profiling reveals novel biomarkers and important roles for DNA methyltransferases in prostate cancer. *Genome Res* 2011;21(7):1017. DOI: 10.1101/GR.119487.110
39. Nakagawa T., Kanai Y., Ushijima S. et al. DNA hypermethylation on multiple CpG islands associated with increased DNA methyltransferase DNMT1 protein expression during multistage urothelial carcinogenesis. *J Urol* 2005;173(5):1767–71. DOI: 10.1097/01.JU.0000154632.11824.4D
40. Jin S.G., Jiang Y., Qiu R. et al. 5-hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations. *Cancer Res* 2011;71(24):7360–5. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2023
41. Ciesielski P., Jóźwiak P., Wójcik-Krowiranda K. et al. Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers. *Tumor Biology* 2017;39(3):1010428317695017. DOI: 10.1177/1010428317695017
42. Храброва Д.А., Якубовская М.Г., Громова Е.С. Мутации в ДНК-метилтрансферазе DNMT3a при остром миелоидном лейкозе. *Биохимия* 2021;86(3):360–73. DOI: 10.31857/S0320972521030064
43. Khrabrova D.A., Yakubovskaya M.G., Gromova E.C. Mutations in DNA methyltransferase DNMT3a in acute myeloid leukemia. *Biohimiya = Biochemistry* 2021;86(3):360–73. (In Russ.). DOI: 10.31857/S0320972521030064
44. Wong K.K., Lawrie C.H., Green T.M. Oncogenic roles and inhibitors of DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b in acute myeloid leukaemia. *Biomark Insights* 2019;14:1177271919846454. DOI: 10.1177/1177271919846454
45. Lin M.E., Hou H.A., Tsai C.H. et al. Dynamics of DNMT3a mutation and prognostic relevance in patients with primary myelodysplastic syndrome. *Clin Epigenetics* 2018;10(1):42. DOI: 10.1186/s13148-018-0476-1
46. Park D.J., Kwon A., Cho B.S. et al. Characteristics of DNMT3a mutations in acute myeloid leukemia. *Blood Res* 2020;55(1):17–26. DOI: 10.5045/BR.2020.55.1.17
47. Jawad M., Afkhami M., Ding Y. et al. DNMT3a R882 mutations confer unique clinicopathologic features in MDS including a high risk of AML transformation. *Front Oncol* 2022;12:12:849376. DOI: 10.3389/FONC.2022.849376
48. Liang S., Zhou X., Pan H. et al. Prognostic value of DNMT3a mutations in myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. *Hematology* 2019;24(1):613–22. DOI: 10.1080/16078454.2019.1657613
49. Walter M.J., Ding L., Shen D. et al. Recurrent DNMT3a mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2011;25(7):1153–8. DOI: 10.1038/leu.2011.44
50. Tripon F., Iancu M., Trifa A. et al. Modelling the effects of MCM7 variants, somatic mutations, and clinical features on acute myeloid

- leukemia susceptibility and prognosis. *J Clin Med* 2020;9(1):158. DOI: 10.3390/JCM9010158
50. Yuan X.Q., Chen P., Du Y.X. et al. Influence of DNMT3a R882 mutations on AML prognosis determined by the allele ratio in Chinese patients. *J Transl Med* 2019;17(1):220. DOI: 10.1186/S12967-019-1959-3
 51. Shlush L.I., Zandi S., Mitchell A. et al. Identification of pre-leukemic hematopoietic stem cells in acute leukemia. *Nature* 2014;506(7488):328–33. DOI: 10.1038/NATURE13038
 52. Midic D., Rinke J., Perner F. et al. Prevalence and dynamics of clonal hematopoiesis caused by leukemia-associated mutations in elderly individuals without hematologic disorders. *Leukemia* 2020;34(8):2198–205. DOI: 10.1038/S41375-020-0869-Y
 53. Varela N.M., Guevara-Ramírez P., Acevedo C. et al. A new insight for the identification of oncogenic variants in breast and prostate cancers in diverse human populations, with a focus on Latinos. *Front Pharmacol* 2021;12:630658. DOI: 10.3389/FPHAR.2021.630658/FULL
 54. Xiang G., Zhenkun F., Shuang C. et al. Association of DNMT1 gene polymorphisms in exons with sporadic infiltrating ductal breast carcinoma among Chinese Han women in the Heilongjiang Province. *Clin Breast Cancer* 2010;10(5):373–7. DOI: 10.3816/CBC.2010.N.049
 55. Sun M.Y., Yang X.X., Xu W.W. et al. Association of DNMT1 and DNMT3b polymorphisms with breast cancer risk in Han Chinese women from South China. *Genet Mol Res* 2012;11(4):4330–41. DOI: 10.4238/2012.SEPTEMBER.26.1
 56. Wang J., Li C., Wan F. et al. The rs1550117 A>G variant in DNMT3a gene promoter significantly increases non-small cell lung cancer susceptibility in a Han Chinese population. *Oncotarget* 2017;8(14):23470–8. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.15625
 57. Yang X.X., He X.Q., Li F.X. et al. Risk-association of DNA methyltransferases polymorphisms with gastric cancer in the Southern Chinese population. *Int J Mol Sci* 2012;13(7):8364–78. DOI: 10.3390/IJMS13078364
 58. Kullmann K., Deryal M., Ong M.F. et al. DNMT1 genetic polymorphisms affect breast cancer risk in the central European Caucasian population. *Clin Epigenetics* 2013;5(1):7. DOI: 10.1186/1868-7083-5-7
 59. Liu Z., Wang L., Wang L.E. et al. Polymorphisms of the DNMT3b gene and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Lett* 2008;268(1):158–65. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.03.034
 60. Xia Z., Duan F., Jing C. et al. Quantitative assessment of the association between DNMT3b-579G>T polymorphism and cancer risk. *Cancer Biomark* 2015;15(5):707–16. DOI: 10.3233/CBM-150512
 61. Zhu S., Zhang H., Tang Y. et al. DNMT3b polymorphisms and cancer risk: a meta analysis of 24 case-control studies. *Mol Biol Rep* 2012;39(4):4429–37. DOI: 10.1007/S11033-011-1231-2
 62. Duan F., Cui S., Song C. et al. Systematic evaluation of cancer risk associated with DNMT3b polymorphisms. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015;141(7):1205–20. DOI: 10.1007/s00432-014-1894-x
 63. Li H., Li W., Liu S. et al. DNMT1, DNMT3a and DNMT3b polymorphisms associated with gastric cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *EBioMedicine* 2016;13:125–31. DOI: 10.1016/J.EBIO.2016.10.028
 64. Park S.H., Choi J.C., Kim S.Y. et al. Incidence and prognostic impact of DNMT3a mutations in Korean normal karyotype acute myeloid leukemia patients. *BioMed Res Int* 2015;2015:723682. DOI: 10.1155/2015/723682
 65. Mizuno S.I., Chiijiwa T., Okamura T. et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2001;97(5):1172–9. DOI: 10.1182/BLOOD.V97.5.1172
 66. Zhang T.J., Zhang L.C., Xu Z.J., Zhou J.D. Expression and prognosis analysis of DNMT family in acute myeloid leukemia. *Aging (Albany NY)* 2020;12(14):14677–90. DOI: 10.18632/AGING.103520
 67. Niederwieser C., Kohlschmidt J., Volinia S. et al. Prognostic and biologic significance of DNMT3b expression in older patients with cytogenetically normal primary acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2015;29(3):567–75. DOI: 10.1038/LEU.2014.267
 68. Loo S.K., Suzina S.S., Musa M., Wong K.K. DNMT1 is associated with cell cycle and DNA replication gene sets in diffuse large B-cell lymphoma. *Pathol Res Pract* 2018;214(1):134–43. DOI: 10.1016/J.PRP.2017.10.005
 69. Lin R.K., Hsu H.S., Chang J.W. et al. Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5' CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung Cancer* 2007;55(2):205–13. DOI: 10.1016/j.lungcan.2006.10.022
 70. Chen X., Zhang J., Dai X. DNA methylation profiles capturing breast cancer heterogeneity. *BMC Genomics* 2019;20(1):823. DOI: 10.1186/s12864-019-6142-y
 71. Ennouar-Idrissi K., Dragic D., Issa E. et al. DNA methylation and breast cancer risk: an epigenome-wide study of normal breast tissue and blood. *Cancers* 2020;12(11):3088. DOI: 10.3390/cancers12113088
 72. Hegde M., Joshi M.B. Comprehensive analysis of regulation of DNA methyltransferase isoforms in human breast tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 2021;147(4):937–71. DOI: 10.1007/S00432-021-03519-4
 73. Husni R.E., Shiba-Ishii A., Iiyama S. et al. DNMT3a expression pattern and its prognostic value in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2016;97:59–65. DOI: 10.1016/j.lungcan.2016.04.018
 74. Teneng I., Tellez C.S., Picchi M.A. et al. Global identification of genes targeted by DNMT3b for epigenetic silencing in lung cancer. *Oncogene* 2015;34(5):621–30. DOI: 10.1038/onc.2013.580
 75. He D., Wang X., Zhang Y. et al. DNMT3a/3B overexpression might be correlated with poor patient survival, hypermethylation and low expression of ESR1/PGR in endometrioid carcinoma: an analysis of The Cancer Genome Atlas. *Chin Med J* 2019;132(2):161–70. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000054
 76. Piyathilake C.J., Badiga S., Borak S.G. et al. A higher degree of expression of DNA methyltransferase 1 in cervical cancer is associated with poor survival outcome. *Int J Women's Health* 2017;9:413–20. DOI: 10.2147/IJWH.S133441
 77. Cui J., Zheng L., Zhang Y., Xue M. Bioinformatics analysis of DNMT1 expression and its role in head and neck squamous cell carcinoma prognosis. *Sci Rep* 2021;11(1):2267. DOI: 10.1038/s41598-021-81971-5
 78. Han Z., Yang B., Wang Y. et al. Identification of expression patterns and potential prognostic significance of m5C-related regulators in head and neck squamous cell carcinoma. *Front Oncol* 2021;11:592107. DOI: 10.3389/FONC.2021.592107/FULL
 79. Zhao S.L., Zhu S.T., Hao X. et al. Effects of DNA methyltransferase 1 inhibition on esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2011;24(8):601–10. DOI: 10.1111/J.1442-2050.2011.01199.X
 80. He M., Fan J., Jiang R. et al. Expression of DNMTs and genomic DNA methylation in gastric signet ring cell carcinoma. *Mol Med Rep* 2013;8(3):942–8. DOI: 10.3892/MMR.2013.1566
 81. Peng D.F., Kanai Y., Sawada M. et al. DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis* 2006;27(6):1160–8. DOI: 10.1093/CARCIN/BGI361
 82. Saito Y., Kanai Y., Nakagawa T. et al. Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* 2003;105(4):527–32. DOI: 10.1002/IJC.11127
 83. Taylor K.M., Wheeler R., Singh N. et al. The tobacco carcinogen NNK drives accumulation of DNMT1 at the GR promoter thereby reducing GR expression in untransformed lung fibroblasts. *Sci Rep* 2018;8(1):4903. DOI: 10.1038/s41598-018-23309-2
 84. Wang P., Chu W., Zhang X. et al. Kindlin-2 interacts with and stabilizes DNMT1 to promote breast cancer development. *Int J Biochem Cell Biol* 2018;105:41–51. DOI: 10.1016/j.biocel.2018.09.022
 85. Zhu X., Lv L., Wang M. et al. DNMT1 facilitates growth of breast cancer by inducing MEG3 hyper-methylation. *Cancer Cell Int* 2022;22(1):56. DOI: 10.1186/s12935-022-02463-8
 86. Pathania R., Ramachandran S., Elangovan S. et al. DNMT1 is essential for mammary and cancer stem cell maintenance and tumorigenesis. *Nat Commun* 2015;6:6910. DOI: 10.1038/NCOMMS7910

87. Fu Y., Zhang X., Liu X. et al. The DNMT1-PAS1-PH20 axis drives breast cancer growth and metastasis. *Signal Transduct Target Ther* 2022;7(1):81. DOI: 10.1038/s41392-022-00896-1
88. Zhang T.J., Zhang L.C., Xu Z.J., Zhou J.D. Expression and prognosis analysis of DNMT family in acute myeloid leukemia. *Aging* 2020;12(14):14677–90. DOI: 10.18632/AGING.103520
89. Deng T., Kuang Y., Wang L. et al. An essential role for DNA methyltransferase 3a in melanoma tumorigenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;387(3):611–6. DOI: 10.1016/J.BBRC.2009.07.093
90. Zhao Z., Wu Q., Cheng J. et al. Depletion of DNMT3a suppressed cell proliferation and restored PTEN in hepatocellular carcinoma cell. *J Biom Biotechnol* 2010;2010:737535. DOI: 10.1155/2010/737535
91. Butcher D.T., Rodenhiser D.I. Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3b) in some sporadic breast tumours. *Eur J Cancer* 2007;43(1):210–9. DOI: 10.1016/J.EJCA.2006.09.002
92. Micevic G., Muthusamy V., Damsky W. et al. DNMT3b modulates melanoma growth by controlling levels of mTORC2 component RICTOR. *Cell Rep* 2016;14(9):2180–92. DOI: 10.1016/J.CELREP.2016.02.010
93. Noshio K., Shima K., Ihara N. et al. DNMT3b expression might contribute to CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15(11):3663–71. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2383
94. Putiri E.L., Tiedemann R.L., Thompson J.J. et al. Distinct and overlapping control of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine by the TET proteins in human cancer cells. *Genome Biology* 2014;15(6):R81. DOI: 10.1186/gb-2014-15-6-r81.
95. Ellrott K., Bailey M.H., Saksena G. et al. Scalable open science approach for mutation calling of tumor exomes using multiple genomic pipelines. *Cell Syst* 2018;6(3):271–81.e7. DOI: 10.1016/J.CELS.2018.03.002
96. Taylor A.M., Shih J., Ha G. et al. Genomic and functional approaches to understanding cancer aneuploidy. *Cancer Cell* 2018;33(4):676–89.e3. DOI: 10.1016/J.CCELL.2018.03.007
97. 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.e11. DOI: 10.1016/J.CELL.2018.02.052
98. Sanchez-Vega F., Mina M., Armenia J. et al. Oncogenic signaling pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* 2018;173(2):321–37. e10. DOI: 10.1016/J.CELL.2018.03.035
99. Gao Q., Liang W.W., Foltz S.M. et al. Driver fusions and their implications in the development and treatment of human cancers. *Cell Rep* 2018;23(1):227–38.e3. DOI: 10.1016/J.CELREP.2018.03.050
100. Bhandari V., Hoey C., Liu L.Y. et al. Molecular landmarks of tumor hypoxia across cancer types. *Nat Genet* 2019;51(2):308–18. DOI: 10.1038/s41588-018-0318-2
101. Poore G.D., Kopylova E., Zhu Q. et al. Microbiome analyses of blood and tissues suggest cancer diagnostic approach. *Nature* 2020;579(7800):567–74. DOI: 10.1038/s41586-020-2095-1
102. Ding L., Bailey M.H., Porta-Pardo E. et al. Perspective on oncogenic processes at the end of the beginning of cancer genomics. *Cell* 2018;173(2):305–20.e10. DOI: 10.1016/J.CELL.2018.03.033
103. Bonneville R., Krook M.A., Kautto E.A. et al. Landscape of microsatellite instability across 39 cancer types. *JCO Precis Oncol* 2017(1):1–15. DOI: 10.1200/PO.17.00073
104. Hoadley K.A., Yau C., Hinoue T. et al. Cell-of-origin patterns dominate the molecular classification of 10,000 tumors from 33 types of cancer. *Cell* 2018;173(2):291–304.e6. DOI: 10.1016/J.CELL.2018.03.022
105. Sweeney S.M., Cerami E., Baras A. et al. AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discovery* 2017;7(8):818–31. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0151
106. Lasho T.L., Vallapureddy R., Finke C.M. et al. Infrequent occurrence of TET1, TET3, and ASXL2 mutations in myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood Cancer J* 2018;8(3):32. DOI: 10.1038/s41408-018-0057-8
107. Abdel-Wahab O., Mullally A., Hedvat C. et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* 2009;114(1):144–7. DOI: 10.1182/BLOOD-2009-03-210039
108. Yamazaki J., Tabby R., Vasanthakumar A. et al. Effects of TET2 mutations on DNA methylation in chronic myelomonocytic leukemia. *Epigenetics* 2012;7(2):201–7. DOI: 10.4161/EPI.7.2.19015
109. Mo H.Y., An C.H., Choi E.J. et al. Somatic mutation and loss of expression of a candidate tumor suppressor gene TET3 in gastric and colorectal cancers. *Pathol Res Pract* 2020;216(3):152759. DOI: 10.1016/J.PR.2019.152759
110. Wang J., Li F., Ma Z. et al. High expression of TET1 predicts poor survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia from two cohorts. *EBioMedicine* 2018;28:90–6. DOI: 10.1016/J.EBIOM.2018.01.031
111. Ahn H., Lee H.J., Lee J.H. et al. Clinicopathological correlation of PD-L1 and TET1 expression with tumor-infiltrating lymphocytes in non-small cell lung cancer. *Pathol Res Pract* 2020;216(11):153188. DOI: 10.1016/J.PR.2020.153188
112. Schagdarsurengin U., Luo C., Slanina H. et al. Tracing TET1 expression in prostate cancer: discovery of malignant cells with a distinct oncogenic signature. *Clinic Epigenetics* 2021;13(1):1–17. DOI: 10.1186/S13148-021-01201-7/FIGURES/7
113. Ke Q., Wang K., Fan M. et al. Prognostic role of high TET1 expression in patients with solid tumors: a meta-analysis. *Medicine* 2020;99(44):e22863. DOI: 10.1097/MD.00000000000022863
114. Liu N.T., Perng C.L., Chou Y.C. et al. Loss of ten-eleven translocation 1 (TET1) expression as a diagnostic and prognostic biomarker of endometrial carcinoma. *PLoS One* 2021;16(11):e0259330. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0259330
115. Pei Y.F., Tao R., Li J.F. et al. TET1 inhibits gastric cancer growth and metastasis by PTEN demethylation and re-expression. *Oncotarget* 2016;7(21):31322–35. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.8900
116. Liu Y., Zhu H., Zhang Z. et al. Effects of a single transient transfection of Ten-eleven translocation 1 catalytic domain on hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2018;13(12):e0207139. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0207139
117. Guo H., Zhu H., Zhang J. et al. TET1 suppresses colon cancer proliferation by impairing β -catenin signal pathway. *J Cell Biochem* 2019;120(8):12559–65. DOI: 10.1002/JCB.28522
118. Tian Y., Pan F., Sun X. et al. Association of TET1 expression with colorectal cancer progression. *Scand J Gastroenterol* 2017;52(3):312–20. DOI: 10.1080/00365521.2016.1253767
119. Zhang T.J., Zhou J.D., Yang D.Q. et al. TET2 expression is a potential prognostic and predictive biomarker in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J Cell Physiol* 2018;233(8):5838–46. DOI: 10.1002/JCP.26373
120. Zhang P., Weng W.W., Chen P. et al. Low expression of TET2 gene in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with poor clinical outcome. *Int J Lab Hematol* 2019;41(5):702–9. DOI: 10.1111/IJLH.13099
121. Zhang W., Shao Z.H., Fu R. et al. TET2 Expression in bone marrow mononuclear cells of patients with myelodysplastic syndromes and its clinical significances. *Cancer Biol Med* 2012;9(1):34–7. DOI: 10.3969/J.ISSN.2095-3941.2012.01.006
122. Zhang L.-Y., Li P.-Y., Wang T.Z., Zhang X.-C. Prognostic values of 5-hmC, 5-mC and TET2 in epithelial ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2015;292(4):891–7. DOI: 10.1007/S00404-015-3704-3
123. Nickerson M.L., Das S., Im K.M. et al. TET2 binds the androgen receptor and loss is associated with prostate cancer. *Oncogene* 2017;36(15):2172–83. DOI: 10.1038/onc.2016.376
124. Zhong X., Liu D., Hao Y. et al. The expression of TET3 regulated cell proliferation in HepG2 cells. *Gene* 2019;698:113–9. DOI: 10.1016/J.GENE.2019.02.040
125. Xu F., Liu Z., Liu R. et al. Epigenetic induction of tumor stemness via the lipopolysaccharide-TET3-HOXB2 signaling axis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cell Commun Signal* 2020;18(1):17. DOI: 10.1186/S12964-020-0510-8
126. Chi J., Zhang W., Li Y. et al. TET3 mediates 5hmC level and promotes tumorigenesis by activating AMPK pathway in papillary thyroid cancer. *Int J Endocrinol* 2022;2022:2658727. DOI: 10.1155/2022/2658727
127. Misawa K., Imai A., Mochizuki D. et al. Association of TET3 epigenetic inactivation with head and neck cancer. *Oncotarget* 2018;9(36):24480–93. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.25333

128. Carella A., Tejedor J.R., García M.G. et al. Epigenetic downregulation of TET3 reduces genome-wide 5hmC levels and promotes glioblastoma tumorigenesis. *Int J Cancer* 2020;146(2):373–87. DOI: 10.1002/IJC.32520
129. Cui Q., Yang S., Ye P. et al. Downregulation of TLX induces TET3 expression and inhibits glioblastoma stem cell self-renewal and tumorigenesis. *Nat Commun* 2016;7(1):106307. DOI: 10.1038/ncomms10637
130. Bhattacharyya S., Pradhan K., Campbell N. et al. Altered hydroxymethylation is seen at regulatory regions in pancreatic cancer and regulates oncogenic pathways. *Genome Res* 2017;27(11):1830–42. DOI: 10.1101/GR.222794.117/-/DC1
131. Cao T., Pan W., Sun X., Shen H. Increased expression of TET3 predicts unfavorable prognosis in patients with ovarian cancer – a bioinformatics integrative analysis. *J Ovarian Res* 2019;12(1):101. DOI: 10.1186/S13048-019-0575-4/FIGURES/4
132. Zhang T., Zhao Y., Zhao J. Expression and prognosis analysis of TET family in acute myeloid leukemia. *Aging* 2020;12(6):5031–47. DOI: 10.18632/AGING.102928
133. Alzahayqa M., Jamous A., Khatib A.A.H., Salah Z. TET1 isoforms have distinct expression pattern, localization and regulation in breast cancer. *Front Oncol* 2022;12:848544. DOI: 10.3389/FONC.2022.848544
134. Collignon E., Canale A., Wardi C. et al. Immunity drives TET1 regulation in cancer through NF- κ B. *Sci Adv* 2018;4(6):eaap7309. DOI: 10.1126/SCIADV.AAP7309
135. Zhang J., Kuang L., Li Y. et al. Metformin regulates TET2 expression to inhibit endometrial carcinoma proliferation: a new mechanism. *Front Oncol* 2022;12:856707. DOI: 10.3389/FONC.2022.856707

Вклад авторов

В.П. Максимова: определение структуры обзора, проведение системного анализа, работа с базами данных, оформление иллюстративного материала, анализ данных, написание текста статьи;
 О.Г. Усалка: обзор литературы по теме статьи, подготовка раздела «Метилирование ДНК при различных злокачественных новообразованиях», составление таблиц;
 Ю.В. Макусъ: обзор литературы по теме статьи, подготовка раздела «Механизм метилирования ДНК», оформление иллюстративного материала;
 В.Г. Попова: обзор литературы по теме статьи, работа над разделом «Механизм метилирования ДНК»;
 Е.С. Трапезникова: анализ литературных данных по экспрессии ДНК-метилтрансфераз в ЗНО;
 Г.И. Хайриева: анализ литературных данных по мутационному профилю генов, кодирующих ДНК-метилтрансферазы и белки семейства ТЕТ в ЗНО;
 Г.Р. Сагитова: анализ литературных данных по экспрессии белков семейства ТЕТ в ЗНО;
 Е.М. Жидкова: обзор литературы по теме статьи, подготовка таблицы 1;
 А.Ю. Прус: обзор литературы по теме статьи, подготовка таблицы 4;
 М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов: определение структуры обзора, проведение системного анализа и обобщение данных.

Authors' contribution

V.P. Maksimova: determining the structure of the review, system analysis, working with databases, working with figure, summarizing data and preparing the text of the review;
 O.G. Usalka: literature review, preparation of the section “DNA methylation in various malignant neoplasms”, preparation of tables;
 Yu.V. Makus: literature review, preparation of the section “Mechanism of DNA methylation”, figure preparation;
 V.G. Popova: literature review, preparation of the section “Mechanism of DNA methylation”;
 E.S. Trapeznikova: analysis of literature data on the expression of DNA methyltransferases in malignant neoplasms;
 G.I. Khayrieva: analysis of literature data on the mutational profile of DNMT and TET genes in malignant neoplasms;
 G.R. Sagitova: analysis of literature data on the expression of TET family proteins in malignant neoplasms;
 E.M. Zhidkova: literature review, preparation of table 1;
 A.Yu. Prus: literature review, preparation of table 4;
 M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov: determining the structure of the review, system analysis and summarizing the data.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.П. Максимова / V.P. Maksimova: <https://orcid.org/0000-0003-0896-2952>
 О.Г. Усалка / O.G. Usalka: 0000-0001-9525-0771
 Ю.В. Макусъ / J.V. Makus: 0000-0001-6820-4198
 В.Г. Попова / V.G. Popova: 0000-0002-7301-605X
 Е.С. Трапезникова / E.S. Trapeznikova: 0000-0003-1274-4667
 Г.И. Хайриева / G.I. Khayrieva: 0000-0001-5545-1157
 Г.Р. Сагитова / G.R. Sagitova: 0000-0003-3940-0661
 Е.М. Жидкова / E.M. Zhidkova: <https://orcid.org/0000-0003-3318-9391>
 А.Ю. Прус / A.Y. Prus: 0000-0002-0963-3432
 М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>
 К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>

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 (проект № 21-75-10163).
Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 21-75-10163).

Статья поступила: 22.05.2022. **Принята к публикации:** 17.11.2022.
Article submitted: 22.05.2022. **Accepted for publication:** 17.11.2022.

Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов, рецепторов стероидных гормонов, LC3B в ткани папиллярного рака щитовидной железы и связь с прогнозом заболевания и риском рецидивирования

Л.В. Спирина^{1,2}, И.В. Ковалева^{1,2}, С.Ю. Чижевская^{1,2}, И.В. Кондакова², Е.Л. Чойнзонов^{1,2}

¹ФГБУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2;

²Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук; Россия, 634009 Томск, переулок Кооперативный, 5

Контакты: Людмила Викторовна Спирина spirinalvl@mail.ru

Введение. В процессе канцерогенеза в опухолевых клетках возникают различные генетические и эпигенетические нарушения, выявление которых позволяет прогнозировать дальнейшее развитие заболевания и предсказывать развитие химиорезистентности опухоли. В настоящее время использование молекулярных маркеров в решении проблем клинической онкологии (в том числе опухолей щитовидной железы) приобретает все большее значение. На сегодняшний день накоплены противоречивые данные о роли генетических и биологических параметров опухоли в прогнозировании исхода заболевания.

Цель исследования – изучение прогностической значимости транскрипционных, ростовых факторов, компонентов сигнального каскада AKT/mTOR и белка аутофагии LC3B у больных с папиллярным раком щитовидной железы в отношении риска развития рецидивов заболевания и общей выживаемости.

Материалы и методы. В исследование включены 65 пациентов с папиллярным раком щитовидной железы T1–4N0–1M0. Согласно критериям Американской тиреоидологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA) (2015), пациенты были разделены на группы с высоким, низким и промежуточным риском развития рецидивов. В группу с низким риском вошли 30 больных, с промежуточным – 23, с высоким – 12. Для выявления мутации *BRAF*^{V600} был использован метод аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР). Экспрессия транскрипционных факторов (субъединиц p65 и p50 ядерного фактора каппа би (NF-κB p65, NF-κB p50), фактора, индуцируемого гипоксией 1 (HIF-1), фактора, индуцируемого гипоксией 2 (HIF-2)), ростовых факторов (фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), рецептора фактора роста VEGF (VEGFR-2), карбоангидразы 9 типа (CA-IX)), компонентов сигнального пути киназ AKT, c-RAF, GSK-3β, p70S6, мишени рапамицина млекопитающих (m-TOR), PDK, PTEN, 4E-BP1 в опухоли были оценены методом ПЦР в реальном времени. Мутацию *BRAF*^{V600} исследовали с помощью аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени. Содержание белка LC3B определяли методом Вестерн-блоттинга.

Результаты. Согласно полученным данным отмечено повышение экспрессии c-RAF с увеличением риска с низкого до высокого, что сопровождалось снижением экспрессии 4E-BP1. Уровень матричной РНК c-RAF был увеличен в 3,0 и 2,8 раза в группах промежуточного и высокого риска соответственно по сравнению с группой низкого риска. Выявлено изменение экспрессии *Bcl-2* в зависимости от риска развития рецидивов. Максимальные уровни матричной РНК обнаружены у пациентов с промежуточным риском: этот показатель у них был в 4,3 и 6,2 раза выше по сравнению с пациентами с низким и высоким риском соответственно. Показано увеличение экспрессии LC3B в 56,0 и 28,0 раз в ткани опухоли больных с промежуточным риском по сравнению с больными с низким и высоким риском. Выявленный факт сочетался с ростом содержания самого белка, который был выше у пациентов с промежуточным риском.

Пациенты с негативным статусом гена *BRAF* имели промежуточный и высокий риск развития рецидивов опухоли. Выявлена прогностическая значимость уровня экспрессии рецептора эстрогена β (ER-β) и NF-κB p50 в отношении безрецидивной и общей выживаемости больных с папиллярным раком щитовидной железы.

Заключение. В результате проведенного исследования обнаружены дополнительные молекулярные маркеры, свидетельствующие о повышении риска развития рецидивов опухоли после проведенного лечения. Показана значимость уровня экспрессии ER-β и NF-κB p50 для прогнозирования исходов заболевания.

Ключевые слова: папиллярный рак щитовидной железы, транскрипционные факторы, ростовые факторы, компоненты сигнального пути AKT/mTOR, рецепторы стероидных гормонов

Для цитирования: Спирина Л.В., Ковалева И.В., Чижевская С.Ю. и др. Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов, рецепторов стероидных гормонов, LC3B в ткани папиллярного рака щитовидной железы и связь с прогнозом заболевания и риском рецидивирования. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(4):41–9. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-41-49

Expression of transcription, growth factors, steroid hormone receptors, LC3B in papillary thyroid cancer tissue, association with prognosis and risk of recurrence

L. V. Spirina^{1,2}, I. V. Kovaleva^{1,2}, S. Yu. Chizhevskaya^{1,2}, I. V. Kondakova², E. L. Choyznzonov^{1,2}

¹Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moskovsky Tract, Tomsk 634050, Russia;

²Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; 5 Cooperative Lane, Tomsk 634009, Russia

Contacts: Lyudmila Viktorovna Spirina spirinalvl@mail.ru

Introduction. Biological characteristics of the tumor play a major role in its development and progression. Currently, using the molecular markers aimed at resolving the problems in clinical oncology is becoming more important, including thyroid carcinomas. Heterogeneous contradictory data had been accumulated to date showing the ability of tumors genetic and biological parameters to predict the diseases outcome.

Aim. To investigate prognostic value of transcription, growth factors, components of AKT/mTOR signaling pathway and autophagy protein LC3B in patients with papillary thyroid cancer in relation to recurrences and overall survival.

Materials and methods. The study included 65 patients with T1–4N0–1M0 papillary thyroid cancer. According to the criteria of the American Thyroid Association (ATA) (2015), patients were divided into groups of patients with high, low and intermediate risk. 30 patients were classified as low risk, 23 as intermediate risk, and 12 as high risk. The *BRAF*^{V600} mutation was identified in 18 samples. The expression of transcription factors (p65 and p50 subunits of nuclear factor kappa B (NF-κB p65, NF-κB p50), hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), hypoxia-inducible factor 2 (HIF-2), growth factors (vascular endothelial growth factor (VEGF), receptor VEGF (VEGF-2), carbonic anhydrases of type 9 (CAIX)), AKT, c-RAF, GSK-3β, p70S6, mammalian target of rapamycin (m-TOR), PDK, PTEN, 4E-BP1 in the tumor was assessed by real-time polymerase chain reaction (PCR). The *BRAF*^{V600} mutation was investigated using real-time allele-specific PCR. The content of the LC3B protein was examined using the Western Blot method.

Results. As a result of the study, there is an increase in c-RAF expression with an increase in risk from low to high, which was accompanied by a decrease in 4E-BP1 expression. c-RAF mRNA levels were increased 3.0- and 2.8-fold in the intermediate and high-risk groups, respectively, compared to low risk patients. There is a change in the expression of Brn-3α depending on the relapse risk. The maximum mRNA levels were found in patients with intermediate risk, where the figure was 4.3 and 6.2 times higher than in patients with low and high risk, respectively. An increase in LC3B expression by 56.0 and 28.0 times was shown in the tumor tissue of patients with intermediate risk compared with patients with low and high risk. This fact corresponds with an increasing content of the protein itself, which was higher in patients with intermediate risk. Patients with a negative *BRAF* gene status had an intermediate and high risk of tumor recurrence. The prognostic significance of the estrogen receptor β (ER-β) and NF-κB p50 expression level had been revealed in relation with relapse-free and overall survival of patients with papillary thyroid cancer.

Conclusion. As a result of the study, additional molecular markers were found in order to for predict the tumors recurrence risk. The study showed the significance of ERβ and NF-κB p50 expression levels for predicting disease outcomes.

Keywords: papillary thyroid cancer, transcription and growth factors, AKT/mTOR signaling pathway components, steroid hormone receptors

For citation: Spirina L.V., Kovaleva I.V., Chizhevskaya S.Yu. et al. Expression of transcription, growth factors, steroid hormone receptors, LC3B in papillary thyroid cancer tissue, association with prognosis and risk of recurrence. Uspexhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2022;9(4):41–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-41-49

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярные маркеры и лабораторные параметры значимы в предсказании исхода заболевания, в том числе в отношении риска развития рецидивов опухолей щитовидной железы [1]. В настоящее время наблюдается недостаток точных и эффективных средств оценки дальнейшего развития заболевания. Общепринятым является прогнозирование развития рецидивов и прогрессирования заболевания с учетом клинических

и морфологических параметров новообразования [2]. В отношении рака щитовидной железы (РЩЖ) выделяют такие факторы прогноза заболевания, как морфологические особенности и размер опухоли, метастазирование в регионарные лимфатические узлы, прорастание капсулы, что связано с инвазивным ростом и появлением экстрагистеидных очагов роста опухоли [3, 4]. Прогнозирование риска развития рецидивов папиллярного РЩЖ в настоящее время осуществляется на основе

рекомендаций Американской тиреоидологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA). С учетом клинических параметров опухоли выделяют группы низкого, промежуточного и высокого риска [5].

При этом сложилось четкое представление о необходимости модификации существующих клинических и морфологических подходов, применении молекулярных и генетических маркеров для планирования лечения больных [5, 6]. В настоящее время рассматриваются большое количество генетических и молекулярных маркеров, ассоциированных с исходом заболевания, к которым относят особенности сайтов альтернативного сплайсинга [7], мутации генов *PDZK1IP1*, *TMC3*, *LRP2* и *KCNJ13* [8], а также генов программируемой гибели *AC008063.2*, *APOE*, *BCL3*, *ACAP3*, *ALOX5AP*, *ATXN2L*, *B2M* [9], белков и генов иммунной системы [10–12]. Формируются подходы для оценки 5-, 6-, 7-генных сигнатур для оценки прогноза заболевания [11].

Разнородный характер генетических маркеров, связанных с развитием и прогрессированием папиллярного РЩЖ, отражает противоречивые данные, связанные с оценкой их прогностической значимости [13]. Наиболее значимым генетическим маркером опухоли является мутация *BRAF^{V600E}*, которая связана с активацией сигнального каскада MAPK, приводящего к пролиферации опухолевых клеток [6]. Однако у этих же пациентов возможны дополнительные мутации сигнального пути АКТ/mTOR [14] — одного из основных биохимических каскадов, лежащих в основе канцерогенеза. В настоящее время большое внимание уделяется особенностям гормональной рецепции, влияющей на особенности биологического поведения опухоли [15], а также аутофагии, которая связана с развитием и прогрессированием опухолей различного происхождения [16], влияет на эффективность противоопухолевой терапии и опосредует выживаемость больных [17, 18]. Кроме того, в случае наличия мутации *BRAF^{V600E}* у больных с неблагоприятным прогнозом заболевания наблюдается увеличение содержания белка LC3B [18–20].

Цель исследования — изучение прогностической значимости транскрипционных, ростовых факторов, компонентов сигнального каскада АКТ/mTOR и белка аутофагии LC3B у больных с папиллярным РЩЖ в отношении риска развития рецидивов заболевания и общей выживаемости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 65 пациентов с папиллярным РЩЖ T1–4N0–1M0. Согласно критериям ATA (2015), пациенты были распределены на группы с высоким, низким и промежуточным риском (табл. 1). В группу с низким риском вошли 30 больных, с промежуточным — 23, с высоким — 12 [21].

Мутация *BRAF^{V600}* выявлена у 18 человек. После проведенного лечения и динамического наблюдения

Таблица 1. Критерии оценки риска развития рецидива, по данным Американской тиреоидологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA) (2015)

Table 1. Criteria of evaluation of recurrence risk per the American Thyroid Association (ATA) (2015)

Риск Risk	Критерии Criteria
Низкий Low	Отсутствуют отдаленные и регионарные метастазы. No local or distant metastases. Вся макроскопическая опухоль резецирована. All macroscopic tumor has been resected. Отсутствует опухолевая инвазия в ближайшие ткани и структуры. No invasion of locoregional tissues. Опухоль неагрессивного гистологического типа. Tumor does not have aggressive histology. После радиойодтерапии не обнаружены очаги активности I ¹³¹ вне щитовидной железы. No ¹³¹ I uptake outside the thyroid bed on the post-treatment scan. Отсутствует васкулярная инвазия. No vascular invasion. Стадия N0 или N1 и <5 микрометастазов (их максимальный размер <0,2 см) Stages N0 or N1 and < 5 micrometastases (with maximal size <0.2 cm)
Промежуточный Intermediate	Микроскопическая инвазия опухоли в окружающие железу ткани. Microscopic invasion into the perithyroidal soft tissues. Активные микрометастатические очаги в мягких тканях шеи после радиойодтерапии. Active micrometastatic lesions in the perithyroidal soft tissues after radioactive iodine therapy. Опухоль агрессивного гистологического типа. Tumor with aggressive histology. Стадия N1 или N1 с вовлечением >5 лимфатических узлов (максимальный размер <3 см) Stage N1 or N1 with involvement of > 5 lymph nodes (maximal size <3 cm)
Высокий High	Макроскопическая инвазия в мягкие ткани шеи. Macroscopic tumor invasion into perithyroidal soft tissues. Незавершенная резекция опухоли. Incomplete tumor resection. Отдаленные метастазы. Distant metastases. Фолликулярный вариант папиллярного рака с обширной васкулярной инвазией (>4 очагов) Follicular type of papillary cancer with gross vascular invasion (>4 lesions)

в течение 5 лет рецидивы заболевания отмечены в 5 случаях, смертельные исходы — в 3.

Все процедуры с вовлечением больных выполнены в соответствии с протоколом Хельсинкской декларации по правам человека (1964).

Материалом исследования являлись образцы опухолевой и неизменной ткани, полученные при проведении оперативного лечения и находящиеся на расстоянии не менее 1 см от границы опухоли. После забора их замораживали и хранили при температуре -80°C .

Выделение ДНК. ДНК выделяли с помощью набора FFPET DNA – Extraction Kit («Биолинк», Россия).

Определение мутации *BRAF*^{V600}. Мутацию *BRAF*^{V600} определяли с помощью набора реагентов Real-time-PCR-BRAF-V600E («Биолинк», Россия), предназначенного для выявления точечной мутации GTG→GGG в 600-м кодоне гена *BRAF*. Анализ проводится методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

Выделение РНК. РНК выделяли с помощью набора RNeasy mini Kit, содержащего ДНКазу I (Qiagen, Германия).

Количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени. Уровень экспрессии генов оценивали с помощью количественной ПЦР с обратной транскриптазой в реальном времени с использованием красителя SYBR Green на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, США). Ниже приведены последовательности праймеров исследуемых генов. *HIF1A*: F 5'-CAAGAACCTACTGCTAATGCCA-3', R'-TTTGGTGAGGCTGTCCGA-3'; *EPAS1*: F 5'-TGGAGTATGAAGAGCAAGCCT-3', R 5'-GGG AACCTGCTCTTGCTGT-3'; *NFKB1*: F'-CGTGTAACCAAAGCCCTAAA-3', R'-AACCAAGAAAGGAAGCCAAGT-3'; *RELA*: F'-GGAGCACAGATACCACCAAGA-3', R 5'-GGGTTGTTGTTGGTCTGGAT-3'; *VEGFA*: F 5'-AGGGCAGAATCATCACGAA-3', R 5'-TCTTGCTCTATCTTTCTTTGGTCT-3'; *KDR*: F 5'-AACACAGCAGGAATCAGTCA-3', R 5'-GTGGTGTCTGTGT-CATCGGA-3'; *4-BPI*: F 5'-CAGCCCTTTCTCCCTCACT-3', R 5'-TTCCCAAGCACATCAACCT-3'; *AKT1*: F 5'-CGAGGACGCCAAGGAGA-3', R 5'-GTCATCTTGGTCAGGTGGTGT-3'; *C-RAF*: F 5'-TGGTGTGTCCTGCTCCCT-3', R 5'-ACTGCCTGCTACCTTACTTCT-3'; *GSK3b*: F 5'-AGACAAGGACGGCAGCAA-3', R 5'-TGGAGTAGAAGAAATAACGCAAT-3'; 70S киназа α: F'-CAGCACAGCAAATCCTCAGA-3', R 5'-ACATCTCCCTCTCCACCTT-3'; *MTOR*: F 5'-CCAAAGGCAACAAGCGAT-3', R'-TTCACCAAACCGTCTCAA-3'; *PDK1*: F'-TCACCAGGACAGCCAATACA-3', R'-CTCCTCGGTCACTCATCTTCA-3'; *POU4F1*: F'-CA CGCTCTCGCACAACAA-3', R'-ATCCGCTTCTGCTTC TGTCT-3'; *AR*: F'-GAGGGACAGCAGGCAGA-3', R'-GCTATCAGAACACACACACACT-3'; *ERS*: F'-TC CTGATGATTGGTCTCGTCT-3', R'-GATGTGGGAGAGGATGAGGA-3'; *ESR2*: F'-GGTCCATCGCCAGTTATCAC-3', R'-GCCTTACATCCTTTCACACGA-3', *TRIM16*: F'-CAATGGAACGGGAAGGAG-3', R'-GGA CGGTGCTGGCTTCT-3'; *LC3B*: F'-CCCAAACCGCAGACACAT-3', R'-ATCCCACCAGCCAGCAC-3'; *GAPDH*: F'-GGAAGTCAGGTGGAGCGA-3',

R'-GCAACAATATCCACTTTACCAGA-3'. Праймеры были подобраны с помощью программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

В качестве референсного гена использовали ген «домашнего хозяйства» фермента GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Уровень экспрессии представлен в условных единицах экспрессии (у. е.) и рассчитан с использованием $\Delta\Delta\text{Ct}$ -метода.

Получение гомогенатов. Замороженную ткань (100 мг) измельчали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 mM трис-HCl буфера (pH 7,5), содержащего 2 mM аденозинтрифосфата (АТФ), 5 mM хлорида магния, 1 mM дитиотреитола, 1 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и 100 mM хлорида натрия. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10 000 г и 4°C .

Электрофорез. Электрофорез проводили по Laemmli в 13 % полиакриламидном геле.

Вестерн-блоттинг. После электрофореза полипептиды переносили на PVDF-мембрану (Immobilon, Millipore, США). Иммунодетекцию выполняли с антителами к LC3B (Affinity Biosciences, США). Стандартизация проводилась относительно β-актина. Результаты выражали в процентах от содержания показателей в неизменной ткани.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 12.0. Нормальность проверяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Результаты определения экспрессии генов представлены как медиана (Me) (Q_1 ; Q_3). Значимость различий независимых параметров в 2 группах оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Критерий Краскела–Уоллиса применяли при оценке значимости различий более чем в 2 группах. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Критерий Пирсона был использован при исследовании различий частот качественных признаков. Показатели выживаемости оценивали с помощью построения кривых выживаемости по методу Каплана–Майера, значимость – с использованием критерия Гехана–Уилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования выявлено, что транскрипционные и ростовые факторы практически не изменялись в группах с разным риском развития рецидивов опухоли после лечения (табл. 2). При этом отмечалось повышение экспрессии c-RAF с увеличением риска с низкого до высокого, что сопровождалось снижением экспрессии 4E-BP1 (табл. 3). Уровень матричной РНК (мРНК) c-RAF был выше в 3,0 и 2,8 раза в группах промежуточного и высокого риска соответственно по сравнению с группой низкого риска. При этом минимальная экспрессия 4E-BP1 была зафиксирована у пациентов с высоким риском развития рецидивов опухоли.

Таблица 2. Экспрессия транскрипционных и ростовых факторов в ткани папиллярного рака щитовидной железы в зависимости от группы риска развития рецидивов по критериям Американской тиреоидологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA), Me (Q_1 ; Q_3)

Table 2. Transcription and growth factor expression in papillary thyroid cancer tissue depending on American Thyroid Association (ATA) Risk of Recurrence Classification, Me (Q_1 ; Q_3)

Показатель Parameter	Низкий риск Low risk	Промежуточный риск Intermediate risk	Высокий риск High risk
NF-κB p65	1,48 (0,44; 7,30)	1,85 (0,18; 12,76)	1,62 (0,16; 10,37)
NF-κB p50	0,51 (0,07; 2,94)	1,16 (0,41; 70,31)	3,72 (0,50; 12,18)
HIF-2	1,45 (0,52; 48,38)	0,55 (0,16; 3,28)	1,00 (0,20; 6,50)
HIF-1	1,36 (0,21; 10,18)	0,85 (0,06; 5,35)	1,48 (0,03; 4,00)
VEGFR2	0,94 (0,40; 6,45)	0,45 (0,03; 8,51)	0,33 (0,00; 8,00)
VEGF	0,34 (0,08; 0,06)	0,16 (0,01; 1,97)	2,33 (0,05; 29,86)
CAIX	0,52 (0,03; 1,55)	1,50 (0,25; 23,51)	1,50 (0,13; 4,00)

Примечание. HIF-1 – фактор, индуцируемый гипоксией 1; HIF-2 – фактор, индуцируемый гипоксией 2; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; VEGFR2 – рецептор VEGF2.

Note. HIF-1 – hypoxia-induced factor 1; HIF-2 – hypoxia-induced factor 2; VEGF – vascular endothelial growth factor; VEGFR2 – VEGF2 receptor.

Таблица 3. Экспрессия компонентов сигнального пути АКТ/м-TOR в ткани папиллярного рака щитовидной железы в зависимости от группы риска развития рецидивов по критериям Американской тиреоидологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA), Me (Q_1 ; Q_3)

Table 3. Expression of AKT/m-TOR signaling pathway components in papillary thyroid cancer tissue depending on American Thyroid Association (ATA) Risk of Recurrence Classification, Me (Q_1 ; Q_3)

Показатель Parameter	Низкий риск Low risk	Промежуточный риск Intermediate risk	Высокий риск High risk
АКТ	0,49 (0,08; 5,89)	3,31 (0,25; 8,68)	1,43 (0,35; 4,00)
c-RAF	0,32 (0,05; 2,18)	0,97 (0,06; 6,24)*	0,91 (0,01; 3,40)*.#
GSK-3β	1,03 (0,59; 6,37)	0,30 (0,02; 2,00)	0,50 (0,13; 0,80)
Киназа p70 S6 p70 S6 kinase	0,67 (0,07; 2,50)	2,12 (0,22; 7,34)	0,23 (0,00; 1,47)
m-TOR	1,83 (0,16; 17,00)	1,94 (0,08; 69,87)	0,50 (0,25; 8,40)
PDK	0,72 (0,14; 2,87)	0,80 (0,13; 7,65)	2,80 (0,13; 100,00)
PTEN	0,72 (0,27; 3,30)	0,71 (0,20; 2,00)	0,50 (0,00; 6,50)
4E-BP1	2,19 (0,69; 31,35)	0,43 (0,01; 2,52)*	0,15 (0,03; 1,41)*.#

*Значимость различий по сравнению с пациентами с низким риском развития рецидивов ($p < 0,05$) (парное сравнение с использованием критерия Манна–Уитни). #Значимость различий по критерию Краскела–Уоллиса ($p < 0,05$).

Примечание. GSK-3β – киназа-3 β гликогенсинтазы; m-TOR – мишень рапамицина млекопитающих.

*Significant differences compared to patients with low recurrence risk ($p < 0.05$) (pairwise comparison using in Mann–Whitney test). #Significant differences per the Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$).

Note. GSK-3β – glycogen synthase kinase 3 β; m-TOR – mammalian target of rapamycin.

В табл. 4 представлены данные об экспрессии рецепторов половых гормонов и транскрипционных факторов Vpn-3α, TRIM16 у пациентов в зависимости от риска развития рецидивов опухоли. Отмечается связь изменения экспрессии Vpn-3α с риском развития рецидивов. Максимальные уровни мРНК отмечались у больных с промежуточным риском: в 4,3 и 6,2 раза

выше по сравнению с этим показателем у пациентов с низким и высоким риском соответственно.

Стоит отметить, что экспрессия РНК и содержание белка LC3B также были связаны с риском развития рецидивов опухоли (табл. 5). Выявлено увеличение экспрессии изучаемого показателя в 56,0 и 28,0 раз в ткани опухоли пациентов с промежуточным риском по

сравнению с больными с низким и высоким риском. Выявленный факт сочетался с ростом содержания самого белка, который был выше у пациентов с промежуточным риском.

Маркером агрессивного поведения опухоли является мутация *BRAF^{V600}*. В ранее проведенных исследованиях была отмечена активация ростовых и транскрипционных факторов при наличии данной мутации [15]. Однако это не было связано с изменением интенсивности процессов аутофагии. В ходе анализа распределения пациентов в зависимости от наличия мутации *BRAF^{V600}* отмечена связь наличия мутации с распределением пациентов на группы в зависимости от риска развития

рецидива ($p = 0,02$) (табл. 6). Ее присутствие отмечалось у пациентов с низким риском по критериям АТА. При этом в случае отсутствия мутации выявленные клинические и морфологические параметры опухоли свидетельствовали о наличии промежуточного и высокого риска развития рецидивов опухоли.

Прогнозирование исходов онкологических заболеваний и оценка безрецидивной и общей выживаемости больных является важной задачей в практической онкологии. Наибольшую информативную ценность для безрецидивной выживаемости имела экспрессия *ER-β* (1,09 у. е.), а для общей выживаемости — экспрессия *NF-κB p50* (1,07 у. е.). Следует отметить,

Таблица 4. Экспрессия рецепторов половых гормонов и регулирующих их факторов в ткани папиллярного рака щитовидной железы в зависимости от группы риска развития рецидивов по критериям Американской тиреологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA), Me (Q_1 ; Q_3)

Table 4. Expression of sex hormones and their regulating factors in papillary thyroid cancer tissue depending on American Thyroid Association (ATA) Risk of Recurrence Classification, Me (Q_1 ; Q_3)

Показатель Parameter	Низкий риск Low risk	Промежуточный риск Intermediate risk	Высокий риск High risk
Brn-3α	0,55 (0,13; 1,63)*	2,35 (0,85; 4,00)*	0,38 (0,10; 5,66)**.#
AR	2,00 (0,67; 4,19)	1,12 (0,10; 2,65)	0,41 (0,03; 2,83)
ER-α	1,20 (0,45; 5,68)	1,64 (0,09; 5,92)	0,77 (0,06; 1,32)
ER-β	1,59 (0,07; 15,45)	1,24 (0,50; 6,70)	1,00 (0,13; 16,67)
TRIM16	0,97 (0,24; 22,24)	0,45 (0,04; 2,29)	1,73 (0,04; 12,97)

*Значимость различий по сравнению с пациентами с низким риском развития рецидивов, ($p < 0,05$) (парное сравнение с использованием критерия Манна—Уитни). **Значимость различий по сравнению с пациентами с промежуточным риском развития рецидивов ($p < 0,05$) (парное сравнение с использованием критерия Манна—Уитни). #Значимые различия, выявленные непараметрическим дисперсионным анализом с применением критерия Краскела—Уоллиса ($p < 0,05$).

Примечание. ER-α — рецептор эстрогена α; ER-β — рецептор эстрогена β.

*Significant differences compared to patients with low recurrence risk ($p < 0.05$) (pairwise comparison using the Mann—Whitney test). **Significant differences compared to patients with intermediate recurrence risk ($p < 0.05$) (pairwise comparison using the Mann—Whitney test). #Significant differences per non-parametric test of dispersion using the Kruskal—Wallis test ($p < 0.05$).

Note. ER-α — estrogen receptor α; ER-β — estrogen receptor β.

Таблица 5. Экспрессия РНК и содержание белка LC3B в ткани папиллярного рака щитовидной железы в зависимости от группы риска развития рецидивов по критериям Американской тиреологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA), Me (Q_1 ; Q_3)

Table 5. Expression RNA and levels of LC3B protein in papillary thyroid cancer tissue depending on American Thyroid Association (ATA) Risk of Recurrence Classification, Me (Q_1 ; Q_3)

Показатель Parameter	Низкий риск Low risk	Промежуточный риск Intermediate risk	Высокий риск High risk
Экспрессия LC3B, у. е. LC3B expression, arbitrary units	0,00 (0,00; 0,16)	0,56 (0,03; 11,45)*	0,02 (0,02; 0,03)**
Белок LC3B, % неизмененной ткани LC3B protein, % healthy tissue	137,57 (78,27; 152,30)	151,00 (132,04; 185,00)*	147,50 (141,00; 154,00)#

*Значимость различий по сравнению с пациентами с низким риском развития рецидивов ($p < 0,05$) (парное сравнение с использованием критерия Манна—Уитни). **Значимость различий по сравнению с пациентами с промежуточным риском развития рецидивов ($p < 0,05$) (парное сравнение с использованием критерия Манна—Уитни). #Значимые различия, выявленные непараметрическим дисперсионным анализом с применением критерия Краскела—Уоллиса ($p < 0,05$).

*Significant differences compared to patients with low recurrence risk ($p < 0.05$) (pairwise comparison using the Mann—Whitney test). **Significant differences compared to patients with intermediate recurrence risk ($p < 0.05$) (pairwise comparison using the Mann—Whitney test). #Significant differences per non-parametric test of dispersion using the Kruskal—Wallis test ($p < 0.05$).

что пороговый уровень вышеуказанных показателей сопоставим со стадиями онкологического процесса. Выявленные различия в группах статистически незначимы, что позволило проанализировать выживаемость больных с учетом выбранного уровня показателей в ткани опухоли (рис. 1, 2).

Таблица 6. Распределение пациентов с разным риском развития рецидивов в зависимости от наличия мутации $BRAF^{V600}$ в опухоли, согласно данным Американской тиреоидологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA)

Table 6. Distribution of patients with different recurrence risk per presence of $BRAF^{V600}$ mutation in tumor per American Thyroid Association (ATA) data

Риск Risk	Дикий тип гена, абс. (%) Wild type gene, abs. (%)	Мутация $BRAF^{V600}$, абс. (%) $BRAF^{V600}$ mutation, abs. (%)
Низкий Low	8 (17,4)	18 (45)
Промежуточный Intermediate	20 (43,5)	12 (30)
Высокий High	18 (39,1)	10 (25)

ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярные особенности опухоли играют большую роль в механизмах прогрессирования заболевания. Особенности сигнального пути АКТ/mTOR связаны с распространением заболевания и риском развития рецидивов, что наиболее выражено у пациентов с мутацией $BRAF^{V600}$ [15]. Выявлено увеличение экспрессии c-RF и снижение уровня мРНК 4EBP1 при промежуточном и высоком рисках развития рецидивов по шкале ATA, что, вероятно, обусловлено ролью сигнального каскада MAPK в прогрессировании папиллярного РЩЖ [22]. Гиперэкспрессия данного сигнального пути отмечена в тканях опухолей с мутацией $BRAF^{V600E}$ [14], являющейся маркером агрессивного роста опухоли. Стоит отметить, что данная мутация выявлена у пациентов с низким риском развития рецидивов заболевания. Данное расхождение, вероятно, связано с активацией других универсальных процессов онкогенеза, детерминированных иными значимыми мутациями [2], однако способных влиять на биологическое поведение опухоли, в частности на аутофагию [17]. Так, у пациентов с высоким и промежуточным риском возникновения рецидивов отмечались высокие уровни мРНК и белкового продукта LC3B, что может быть ассоциировано с агрессивностью заболевания.

Следовательно, клинические и морфологические маркеры не всегда достоверно позволяют оценить риск развития рецидивов заболевания, что особенно выражено у пациентов с промежуточным прогнозом. Биологические особенности опухоли у больных с промежуточным и высоким риском развития рецидивов

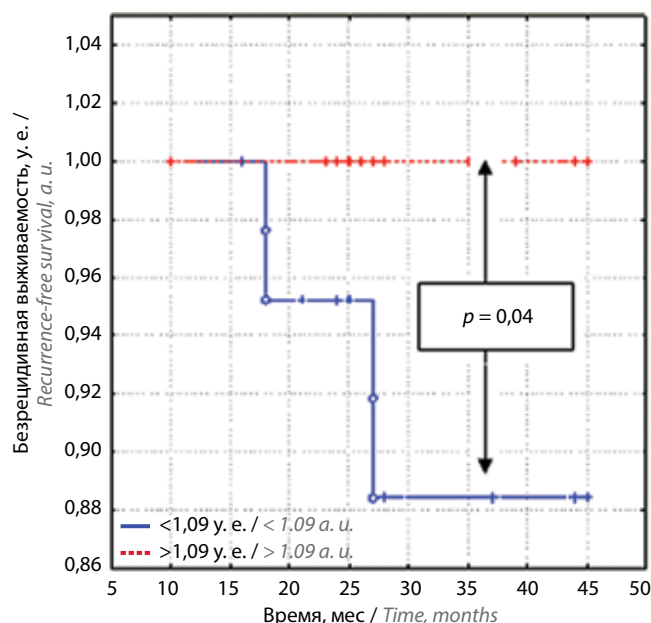


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость больных папиллярным раком щитовидной железы в зависимости от порогового уровня экспрессии рецептора эстрогена β , равного 1,09 у. е.

Fig. 1. Recurrence-free survival of patients with papillary thyroid cancer depending on the threshold level of estrogen receptor β expression of 1.09 a. u.

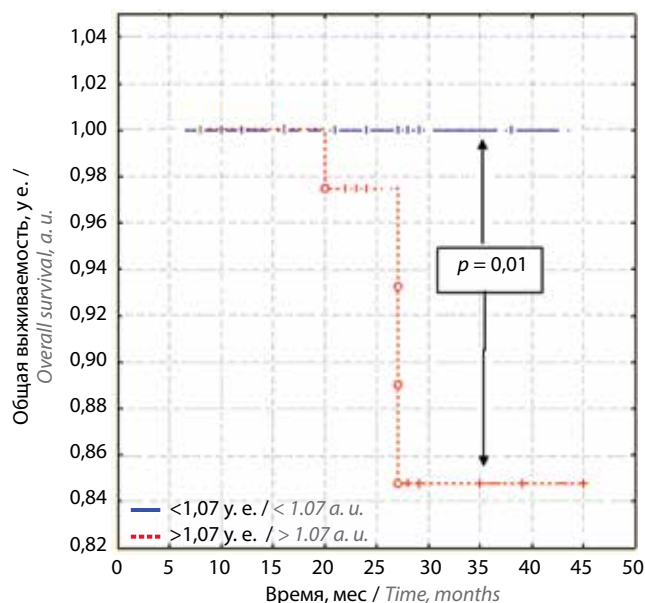


Рис. 2. Общая выживаемость больных папиллярным раком щитовидной железы в зависимости от порогового уровня экспрессии NF- κ B p50, равного 1,07 у. е.

Fig. 2. Overall survival of patients with papillary thyroid cancer depending on the threshold level of NF- κ B p50 expression of 1.07 a. u.

в отсутствие мутации, вероятно, связаны с активацией аутофагии.

Знание особенностей гормональной рецепции и экспрессии транскрипционных факторов способно стать ключевым в прогнозировании исхода заболевания. Это подтверждается при оценке прогностической способности изучаемых молекулярных маркеров в отношении безрецидивной и общей выживаемости. Так,

высокие уровни экспрессии ER- β ($>1,09$ у. е.) были отмечены у пациентов без рецидивов опухоли в течение 3 лет после хирургического лечения. Известно, что ER- β относится к онкосупрессорам. Он снижает пролиферативную активность опухоли в отличие от рецептора эстрогена α (ER- α) [23] и обеспечивает лучшие показатели безрецидивной выживаемости.

При этом высокая экспрессия NF- κ B p50 ($>1,07$ у. е.) была ассоциирована с низкими показателями общей выживаемости, что объясняется ролью белка в многочисленных процессах онкогенеза. В работе С. Giuliani и соавт. (2018) обоснована роль NF- κ B p50 в развитии более агрессивных форм опухолей щитовидной

железы [24], что согласуется с результатами проведенного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выявлены дополнительные молекулярные маркеры, ассоциированные с повышенным риском развития рецидивов опухоли. Изучение экспрессии c-RAF и 4EBP1 при условии отсутствия мутантного белка b-RAF совместно с клиническими и морфологическими параметрами опухоли позволяет оценить риск развития рецидивов. Экспрессия ER- β и NF- κ B p50 ассоциирована с безрецидивной и общей выживаемостью больных с папиллярным РЩЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Shrestha B.L., Kc A.K., Rajbhandari P. et al. Does the preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio associate with clinic-pathological characteristics in papillary carcinoma of thyroid. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* 2021;19(74):225–9. DOI: 10.1097/MD.0000000000005079
- Lewiński A., Adamczewski Z. Papillary thyroid carcinoma: a cancer with an extremely diverse genetic background and prognosis. *Pol Arch Intern Med* 2017;127(6):388–9. DOI: 10.20452/pamw.4058
- Haugen B.R., Alexander E.K., Bible K.C. et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26(1): 1–133. DOI: 10.1089/thy.2015.0020
- Lindfors H., Ihre Lundgren C., Zedenius J. et al. The clinical significance of lymph node ratio and Ki-67 expression in papillary thyroid cancer. *World J Surg* 2021;45(7):2155–64. DOI: 10.1007/s00268-021-06070-y
- Täieb D., Baumstarck-Barrau K., Sebag F. et al. Health-related quality of life in thyroid cancer patients following radioiodine ablation. *Health Qual Life Outcomes* 2015;9:33. DOI: 10.1186/1477-7525-9-33
- Araque K.A., Gubbi S., Klubo-Gwiedzinska J. Updates on the management of thyroid cancer. *Horm Metab Res* 2020;52(8): 562–77. DOI: 10.1055/a-1089-7870
- Liu M., Khushbu R.A., Chen P. et al. Comprehensive analysis of prognostic alternative splicing signature reveals recurrence predictor for papillary thyroid cancer. *Front Oncol* 2021;11:705929. DOI: 10.3389/fonc.2021.705929
- Wen S., Luo Y.I., Wu W. et al. Identification of lipid metabolism-related genes as prognostic indicators in papillary thyroid cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2021;53(12):1579–89. DOI: 10.1093/abbs/gmab145
- Lin R., Fogarty C.E., Ma B. et al. Identification of ferroptosis genes in immune infiltration and prognosis in thyroid papillary carcinoma using network analysis. *BMC Genomics* 2021;22(1):576. DOI: 10.1186/s12864-021-07895-6
- Qin R., Li C., Wang X. et al. Identification and validation of an immune-related prognostic signature and key gene in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Cell Int* 2021;21(1):378. DOI: 10.1186/s12935-021-02066-9
- Ruchong P., Haiping T., Xiang W. et al. A five-gene prognostic nomogram predicting disease-free survival of differentiated thyroid cancer. *Dis Markers* 2021;2021:5510780. DOI: 10.1155/2021/5510780
- Wan B., Deng P., Dai W. et al. Association between programmed cell death ligand 1 expression and thyroid cancer: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2021;100(14):e25315. DOI: 10.1097/MD.00000000000025315
- Póvoa A.A., Teixeira E., Bella-Cueto M.R. et al. Genetic determinants for prediction of outcome of patients with papillary thyroid carcinoma. *Cancers (Basel)* 2021;13(9):2048. DOI: 10.3390/cancers13092048
- Pappa T., Ahmadi S., Marqusee E. et al. Oncogenic mutations in PI3K/AKT/mTOR pathway effectors associate with worse prognosis in *BRAFV600E*-driven papillary thyroid cancer patients. *Clin Cancer Res* 2021;27(15):4256–64. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-0874
- Spirina L.V., Chizhevskaya S.Y., Kovaleva I.V. et al. The association of the *BRAF-V600E* mutation with the expression of the molecular markers in the primary tumor and metastatic tissue in papillary thyroid cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2021;22(7):2017–24. DOI: 10.31557/APJCP.2021.22.7.2017
- Satyavarapu E.M., Das R., Mandal C. et al. Autophagy-independent induction of LC3B through oxidative stress reveals its non-canonical role in anoikis of ovarian cancer cells. *Cell Death Dis* 2018;9(10):934. DOI: 10.1038/s41419-018-0989-8
- Gao P., Hao F., Dong X. et al. The role of autophagy and Beclin-1 in radiotherapy-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2019;12(3):885–92.
- Kim H.M., Kim E.S., Koo J.S. Expression of autophagy-related proteins in different types of thyroid cancer. *Int J Mol Sci* 2017;18(3):540. DOI: 10.3390/ijms18030540
- Schwertheim S., Theurer S., Jastrow H. et al. New insights into intranuclear inclusions in thyroid carcinoma: Association with autophagy and with *BRAFV600E* mutation. *PLoS One* 2019;14(12):e0226199. DOI: 10.1371/journal.pone.0226199
- Xu Q., Gao S., Miao J. The relationship between autophagy-related genes and the staging and prognosis of thyroid cancer: a bioinformatics analysis. *Gland Surg* 2021;10(8):2511–27. DOI: 10.21037/gs-21-480
- Haugen B.R., Alexander E.K., Bible K.C. et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26(1):1–133. DOI: 10.1089/thy.2015.0020
- Abdullah M.I., Junit S.M., Ng K.L. et al. Papillary thyroid cancer: genetic alterations and molecular biomarker investigations. *Int J Med Sci* 2019;16(3):450–60. DOI: 10.7150/ijms.29935
- Božović A., Mandušić V., Todorović L. et al. Estrogen receptor beta: the promising biomarker and potential target in metastases. *Int J Mol Sci* 2021;22(4):1656. DOI: 10.3390/ijms22041656
- Giuliani C., Bucci I., Napolitano G. The role of the transcription factor nuclear factor-kappa b in thyroid autoimmunity and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9:471. DOI: 10.3389/fendo.2018.00471

Вклад авторов

Л.В. Спирина: написание текста статьи, обзор публикаций по теме статьи;
И.В. Ковалева: редактирование статьи и составление списка литературы;
С.Ю. Чижевская: получение данных для анализа, анализ полученных данных;
И.В. Кондакова: редактирование;
Е.Л. Чойнзонов: разработка концепции, утверждение окончательного варианта статьи.

Authors' contribution

L.V. Spirina: article writing, review of publications on the topic of the article;
I.V. Kovaleva: article editing and compiling a list of references;
S.Yu. Chizhevskaya: obtaining data for analysis, analysis of the data obtained;
I.V. Kondakova: editing;
E.L. Choynzonov: development of the concept, approval of the final version of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Л.В. Спирина / L.V. Spirina: <https://orcid.org/0000-0002-5269-736X>
И.В. Ковалева / I.V. Kovaleva: <https://orcid.org/0000-0003-2964-9041>
С.Ю. Чижевская / S.Yu. Chizhevskaya: <https://orcid.org/0000-0003-2974-4778>
И.В. Кондакова / I.V. Kondakova: <https://orcid.org/0000-0003-0907-4615>
Е.Л. Чойнзонов / E.L. Choynzonov: <https://orcid.org/0000-0002-3651-0665>

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 локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук».

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 Scientific Research Institute of Oncology of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences.

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

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-50-60



Диагностическое и прогностическое значение экспрессии длинной некодирующей РНК PROX1-AS1 и микроРНК miR-647 при раке желудка

Е.А. Ветчинкина¹, А.И. Калинин², Е.Б. Кузнецова^{1,2}, А.Э. Киселева¹, Е.А. Алексеева^{1,2},
М.В. Немцова^{1,2}, И.В. Буре¹

¹ФГАОУ 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, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1

Контакты: Екатерина Александровна Ветчинкина katevetchinkina@ya.ru

Введение. Рак желудка входит в число наиболее распространенных злокачественных новообразований и занимает одно из лидирующих мест в структуре смертности от онкологических заболеваний во всем мире. Эпигенетические изменения с участием некодирующих РНК (нкРНК), включая микроРНК и длинные нкРНК, вовлечены в его патогенез и прогрессию и могут являться потенциальными диагностическими и прогностическими биомаркерами.

Цель исследования – оценить экспрессию PROX1-AS1 и miR-647 при раке желудка и изучить ее клиническое значение.

Материалы и методы. В исследование включены 62 парных образца опухоли и неопухолевой ткани желудка, а также 5 секционных образцов ткани желудка без патологии. Анализ экспрессии проведен с помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. Обнаружены достоверные различия экспрессии PROX1-AS1 в опухолевых ($p = 0,002$) и неопухолевых тканях ($p < 0,001$), полученных от пациентов с раком желудка, относительно секционных тканей желудка без патологии. С помощью коэффициента корреляции Пирсона выявлена отрицательная корреляция между экспрессией PROX1-AS1 и miR-647 в опухолевых ($p < 0,001$) и неопухолевых ($p < 0,001$) тканях пациентов с раком желудка. Показано, что экспрессия PROX1-AS1 и miR-647 связана с распространенностью первичной опухоли.

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить потенциальную прогностическую значимость PROX1-AS1 и miR-647 при раке желудка.

Ключевые слова: некодирующая РНК, длинная некодирующая РНК, микроРНК, рак желудка, эпигенетика, биомаркер

Для цитирования: Ветчинкина Е.А., Калинин А.И., Кузнецова Е.Б. и др. Диагностическое и прогностическое значение экспрессии длинной некодирующей РНК PROX1-AS1 и микроРНК miR-647 при раке желудка. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(4):50–60. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-50-60

Diagnostic and prognostic value of long non-coding RNA PROX1-AS1 and miR-647 expression in gastric cancer

E.A. Vetchinkina¹, A.I. Kalinkin², E.B. Kuznetsova^{1,2}, A.E. Kiseleva¹, E.A. Alekseeva^{1,2}, M.V. Nemtsova^{1,2}, I.V. Bure¹

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 28 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

²N.P. Bochkov Medical and Genetic Research Center; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia

Contacts: Ekaterina Alexandrovna Vetchinkina katevetchinkina@ya.ru

Introduction. Gastric cancer remains one of the most common cancers and has a high mortality rate worldwide. Epigenetic alternations of non-coding RNAs (ncRNAs), including microRNAs and long ncRNAs can contribute to its pathogenesis and progression, and could be potent diagnostic and prognostic biomarkers.

Aim. Estimation of PROX1-AS1 and miR-647 expression in gastric cancer and investigation of its clinical significance.

Materials and methods. Tumor and adjacent normal tissues ($n = 62$), and sectional normal tissue samples ($n = 5$) were included in the study. The expression of the ncRNAs was quantified by reverse transcription-polymerase chain reaction assay.

Results. We have revealed the significant difference in the PROX1-AS1 expression in tumor ($p = 0.002$) and non-tumor tissues ($p < 0.001$) obtained from gastric cancer patients in comparison with sectional gastric tissues without pathology.

Pearson correlation analysis confirmed a negative correlation between PROX1-AS1 and miR-647 in gastric cancer both in tumor ($p < 0.001$) and adjacent normal tissues ($p < 0.001$). Besides, expression of PROX1-AS1 and miR-647 was associated with the size and extent of the primary tumor.

Conclusion. The obtained results allow to suggest a potential prognostic value of PROX1-AS1 and miR-647 in gastric cancer.

Keywords: non-coding RNAs, long noncoding RNA, microRNA, gastric cancer, epigenetics, biomarker

For citation: Vetchinkina E.A., Kalinkin A.I., Kuznetsova E.B. et al. Diagnostic and prognostic value of long non-coding RNA PROX1-AS1 and miR-647 expression in gastric cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(4):50–60. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-50-60

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ) входит в число наиболее распространенных злокачественных новообразований. Данная патология занимает 5-е место по распространенности среди диагностируемых онкологических заболеваний и 3-е место в структуре смертности от рака во всем мире [1]. Высокая смертность от РЖ обусловлена несвоевременной диагностикой вследствие поздних клинических проявлений, слабой выраженностью и неспецифичностью симптомов, а также недостаточной эффективностью современных методов терапии данной патологии [2].

В настоящее время известно, что к инициации и прогрессированию опухоли могут приводить не только структурные изменения в ДНК, но и эпигенетические факторы [3]. В последние годы показано, что нарушения эпигенетических механизмов, в том числе изменение экспрессии некодирующих РНК (нкРНК), играют значимую роль в канцерогенезе, а также могут служить молекулярными маркерами для ранней диагностики и прогнозирования течения заболевания [4].

Длинные некодирующие РНК (днРНК) и микроРНК представляют собой функциональные транскрипты, которые регулируют экспрессию генов, связываясь с ними напрямую или воздействуя на другие эпигенетические механизмы, такие как метилирование/деметиличивание ДНК, химические модификации гистоновых белков и ремоделирование хроматина [5, 6]. В результате они участвуют в многочисленных физиологических процессах в норме и при патологии, включая опухолеобразование. Роль днРНК в канцерогенезе определяется их способностью воздействовать на клеточный цикл, блокировать апоптоз, подавлять экспрессию генов-супрессоров и стимулировать онкогены, таким образом способствуя прогрессии опухолей и развитию метастазов [7, 8]. На данный момент участие нкРНК в регуляции генов, ассоциированных с развитием и клиническим течением РЖ, подтверждено рядом работ и продолжает активно изучаться [9–11].

Длинная некодирующая РНК PROX1-AS1 локализуется на хромосоме 1q32.3, транскрибируется с антисмысловой цепи гена *PROX1* и регулирует его экспрессию *in cis*. В нескольких исследованиях было показано, что PROX1-AS1 действует как онкоген, способствуя пролиферации и миграции клеток при РЖ

[12], а также ассоциирован с появлением метастазов и агрессивностью почечноклеточного рака [13].

Изменение экспрессии микроРНК miR-647 было обнаружено во многих опухолях, включая карциному носоглотки [14], гепатоцеллюлярную карциному [15], колоректальный рак [16] и РЖ [17]. Снижение экспрессии miR-647 в сыворотке крови пациентов с РЖ коррелирует с неблагоприятным прогнозом [18].

Возможная взаимосвязь PROX1-AS1 и miR-647 описана в научной литературе [19]. Мы исследовали экспрессию днРНК PROX1-AS1 и miR-647 в опухолевой и неопухолевой тканях пациентов с РЖ и в секционных образцах ткани желудка без патологии, а также определили ее связь с клиническими показателями опухолевого роста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследовании приняли участие 62 пациента с РЖ (35 мужчин и 27 женщин; средний возраст 62 года (от 36 лет до 81 года)), находившихся на лечении в Клинике факультативной хирургии им. Н.Н. Бурденко Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Всем больным проведено оперативное лечение. Рак желудка был подтвержден при морфологическом исследовании операционного материала.

Образцы тканей. В исследование включены 62 парных образца опухолевого материала РЖ и морфологически нормальной ткани, а также 5 секционных образцов ткани желудка без патологии. Материал аннотирован с указанием локализации, клинической стадии, гистологического типа по классификации Лорена, наличия/отсутствия перстневидных клеток, метастазов в регионарные лимфатические узлы и отдаленных метастазов, а также стадии по классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TNM). Свежие образцы замораживали и хранили при температуре -80°C .

Экстракция РНК и полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией. Суммарную РНК, включая микроРНК и днРНК, выделяли из образцов с использованием Trizol (Life Technologies, США) и набора miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) по протоколу производителей с небольшими модификациями. Концентрацию и чистоту полученной РНК оценивали на микрообъемном спектрофотометре NanoDrop 2000

(Thermo Fisher Scientific, США). Процесс выделения повторялся для каждого образца до тех пор, пока не было получено достаточное количество РНК для следующих этапов.

Обратная транскрипция проводилась с использованием набора MiScript II RT Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с рекомендованным протоколом. Для получения комплементарной ДНК (кДНК) использовали 300 нг суммарной РНК, выделенной из каждого образца.

Для количественной оценки уровня экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 в тканях применяли метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, которую выполняли на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, США) в тройной повторности для каждого транскрипта и контролей с использованием набора MiScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Ген домашнего хозяйства *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) и малая ядерная РНК RNU6B (RNA, U6 small nuclear 6) были использованы в качестве контролей для PROX1-AS1 и miR-647 соответственно. Последовательности праймеров для анализа экспрессии представлены в табл. 1. Полученные значения C_t были нормализованы относительно контролей и проанализированы с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Таблица 1. Последовательности праймеров

Table 1. Primer sequences

Праймер Primer	Последовательность Sequence
PROX1-AS1_F	5'-CTAGTTAGCAGGGGCAGCAC-3'
PROX1-AS1_R	5'-AACAGAGAGGCGTGGAAGAA-3'
GAPDH_F	5'-CACCCACTCCTCCACCTTTG-3'
GAPDH_R	5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'
miR-647	5'-TGGCTGCACTCACTTCCTTC-3'
RNU6B	5'-TGCGCAAGGATGACACGCAA-3'

Статистический анализ. Статистический анализ был выполнен с использованием платформы Statistical3.1 (StatSoft, США). Количественные показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка. Сравнение 2 групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, выполнялось с помощью t-критерия Стьюдента, 3 и более групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, — с помощью однофакторного дисперсионного анализа, 2 групп по количественному

показателю, распределение которого отличалось от нормального, — с помощью U-критерия Манна–Уитни. Для сравнения 3 и более групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, использовали критерий Краскела–Уоллиса.

Направление и тесноту корреляционной связи между 2 количественными показателями оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона (при нормальном распределении сопоставляемых показателей). Прогностическая модель, характеризующая зависимость количественной переменной от факторов, разрабатывалась с использованием метода линейной регрессии. Для анализа общей выживаемости (ОВ) применяли метод Каплана–Майера. Связь между PROX1-AS1 и miR-647 оценивали с помощью программы RNAhybrid 2.2. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия днРНК PROX1-AS1 и miR-647 в в опухоли и неопухолевой тканях, полученных от пациентов с раком желудка, и в секционных образцах ткани желудка без патологии. Средний уровень экспрессии PROX1-AS1 в опухоли составил 2,24; в морфологически нормальной ткани пациентов — 2,54; в секционных образцах желудка — 0,06, а средний уровень экспрессии miR-647 — 3,47; 3,64 и 4,16 соответственно.

Обнаружены статистически значимые различия в экспрессии PROX1-AS1 в опухолевых ($p = 0,002$) и неопухолевых ($p < 0,001$) тканях (рис. 1, а) относительно секционных образцов ткани желудка без патологии (контрольная группа). Для miR-647 результаты оказались статистически незначимыми (рис. 1, б).

Экспрессия днРНК PROX1-AS1 и miR-647 в опухоли и неопухолевой тканях, полученных от пациентов с раком желудка. При исследовании экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 в 62 парных образцах опухолевой и прилегающей неопухолевой тканях пациентов с РЖ показано повышение экспрессии PROX1-AS1 в 17 (27 %) и понижение в 32 (52 %) опухолевых образцах. В остальных 13 (21 %) образцах соотношение уровней экспрессии между опухолью и прилегающей неопухолевой тканью находилось в пределах (–1; 1), что говорит об отсутствии значимого изменения экспрессии PROX1-AS1 в этих пробах. Анализ показал, что средний уровень экспрессии PROX1-AS1 в тканях РЖ по сравнению с морфологически нормальными прилежащими тканями статистически не различается ($p = 0,156$) (см. рис. 1, а).

Экспрессия miR-647 была повышена в 25 (40 %) и понижена в 20 (32 %) образцах опухолевой ткани. В 17 (28 %) образцах не выявлено значимого изменения экспрессии. Таким образом, статистически значимого различия среднего уровня экспрессии miR-647 в опухолевых тканях РЖ и прилежащих морфологически нормальных тканях обнаружено не было ($p = 0,692$) (см. рис. 1, б).

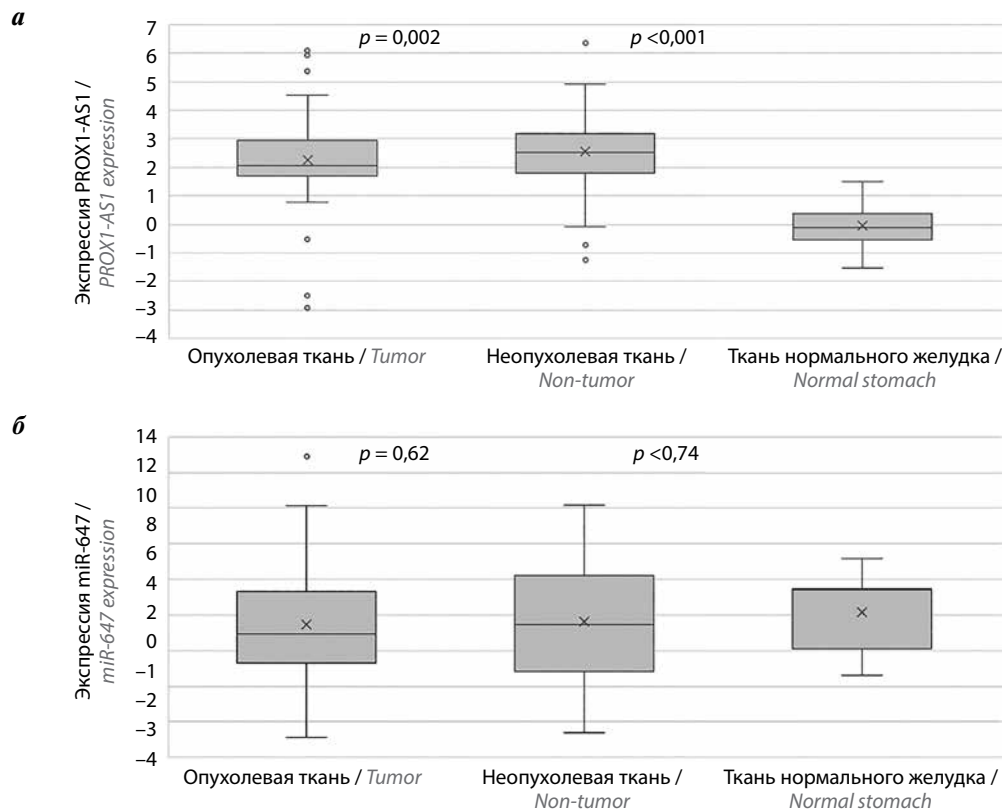


Рис. 1. Уровень экспрессии PROX1-AS1 (а) и miR-647 (б) в опухолевой и прилегающей неопухолевой тканях пациентов с раком желудка относительно секционных образцов ткани желудка без патологии (контрольная группа)

Fig. 1. The expression level of PROX1-AS1 (a) and miR-647 (b) in tumor and non-tumor adjacent tissues of gastric cancer patients to the stomach tissue of a healthy control group

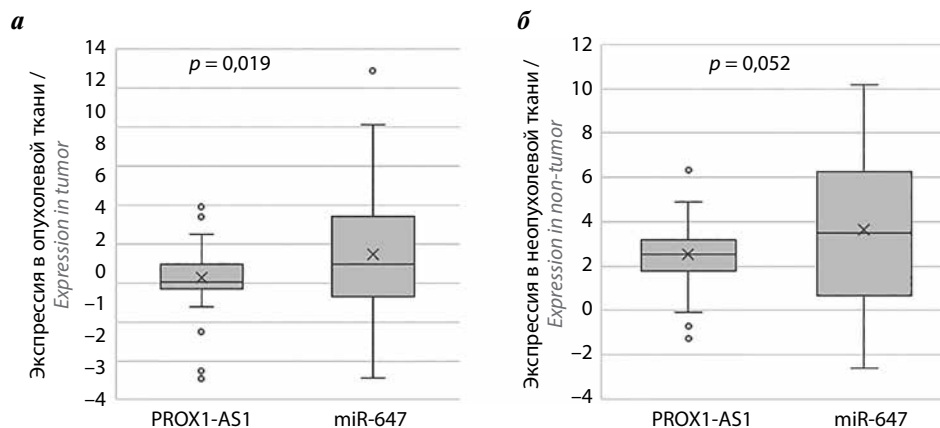


Рис. 2. Уровни экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 в опухолевой (а) и неопухолевой (б) тканях пациентов с раком желудка

Fig. 2. Expression levels of PROX1-AS1 and miR-647 in tumor tissues (a) and in the non-tumor (b) tissues of gastric cancer patients

Взаимосвязь уровней экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 в опухолевой и неопухолевой тканях пациентов с раком желудка. При сравнении средних уровней экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 в тканях пациентов с РЖ обнаружены статистически значимые различия в опухолевой ткани РЖ ($p = 0,019$) (рис. 2, а). Однако при исследовании прилегающей неопухолевой ткани статистически значимые различия в средних уровнях экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 не выявлены ($p = 0,052$) (рис. 2, б).

При сравнении экспрессии по образцам можно проследить общую тенденцию: с возрастанием экспрессии PROX1-AS1 у пациентов отмечается снижение экспрессии miR-647, что также соответствует обратной зависимости (рис. 3).

При проведении корреляционного анализа с использованием коэффициента корреляции Пирсона мы обнаружили заметную отрицательную линейную связь по шкале Чеддока между уровнем экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 в опухоли $r = -0,526$ ($p < 0,001$)



Рис. 3. Корреляция относительной экспрессии miR-647 и PROX1-AS1 у 62 пациентов с раком желудка

Fig. 3. Correlations between the relative expression of miR-647 and PROX1-AS1 in 62 of gastric cancer patients

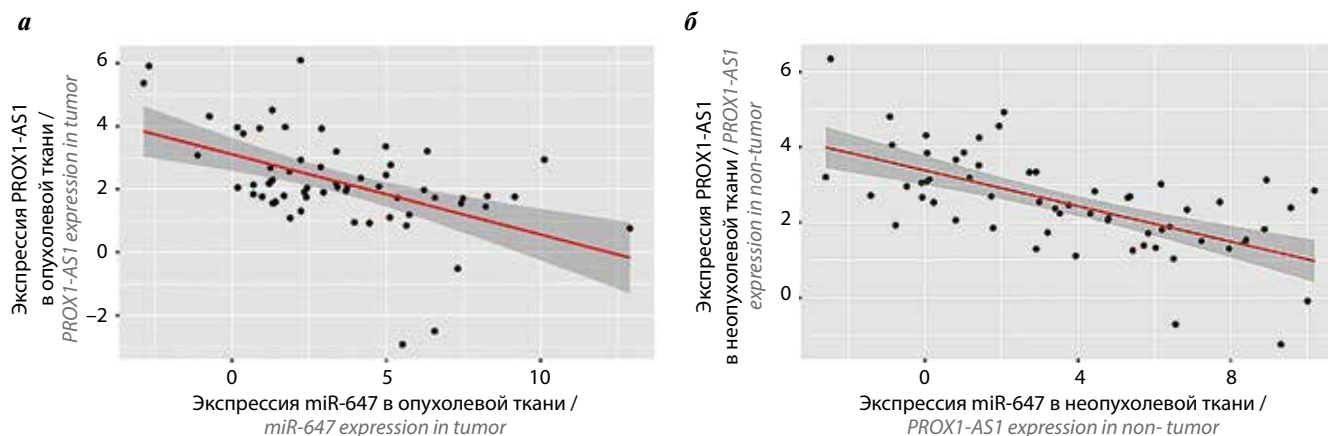


Рис. 4. График регрессионной функции, характеризующий отрицательную зависимость уровня экспрессии PROX1-AS1 от уровня экспрессии miR-647 в опухолевой (а) и прилегающей неопухолевой (б) тканях пациентов с раком желудка

Fig. 4. Linear regression showing the negative correlation between the expression of PROX1-AS1 and miR-647 in tumor (a) and adjacent non-tumor (b) tissue of gastric cancer patients

(рис. 4, а) и прилежащих неопухолевых тканях $r = -0,628$ ($p < 0,001$) (рис. 4, б). Полученные данные подтверждают зависимость экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 как в опухолевой, так и в неопухолевой тканях пациентов с РЖ.

Ассоциация экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 в опухолевой ткани с клинико-патологическими характеристиками пациентов. Для поиска значимых факторов, связанных с клиническим течением РЖ, мы провели анализ ассоциаций между изменением экспрессии miR-647 и PROX1-AS1 и клиническими характеристиками опухолевого роста. При сравнении уровня экспрессии PROX1-AS1 в опухолевой ткани в зависимости от распространенности первичной опухоли (Т) были выявлены статистически значимые различия ($p = 0,014$); в группе Т4 экспрессия PROX1-AS1 была достоверно выше, чем в группе Т1–3 ($p = 0,001$) (рис. 5, а).

При сравнении уровня экспрессии miR-647 в опухолевой ткани в зависимости от распространенности первичной опухоли также были определены статистически значимые различия ($p = 0,012$); экспрессия в группе Т4 оказалась достоверно ниже, чем в группе Т1–3 ($p = 0,011$) (рис. 5, б).

При сравнении других показателей (пола, 5-летней выживаемости, клинической стадии, гистологического типа опухоли по классификации Лорена, наличия/от-

сутствия перстневидных клеток и отдаленных метастазов) установить статистически значимых различий не удалось. Результаты оценки корреляций представлены в табл. 2. В ходе анализа связи клинических характеристик пациентов с экспрессией PROX1-AS1 и miR-647 в морфологически нормальных тканях значимых ассоциаций выявлено не было.

Ассоциации уровней экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 с выживаемостью пациентов с раком желудка. Для оценки связи между уровнем экспрессии PROX1-AS1 и ОБ пациентов с РЖ мы использовали метод Каплана–Майера (рис. 6, а). В ходе исследования не было выявлено различий в показателях выживаемости у пациентов с разным уровнем экспрессии транскриптов. На рис. 6 показано, что пациенты с повышенной экспрессией PROX1-AS1 ($T > N$) в опухолевой ткани по сравнению с неопухолевой тканью имеют тенденцию к лучшему прогнозу, чем пациенты с низкой экспрессией PROX1-AS1 ($T < N$) в опухолевой ткани по сравнению с неопухолевой тканью. Анализ ассоциации уровня экспрессии miR-647 с выживаемостью больных РЖ также не показал статистически значимых результатов (рис. 6, б).

Ассоциации уровней экспрессии PROX1-AS1 с выживаемостью пациентов с раком желудка (по открытым источникам данных). Мы также проанализировали ОБ пациентов с РЖ с помощью метода Каплана–Майера,

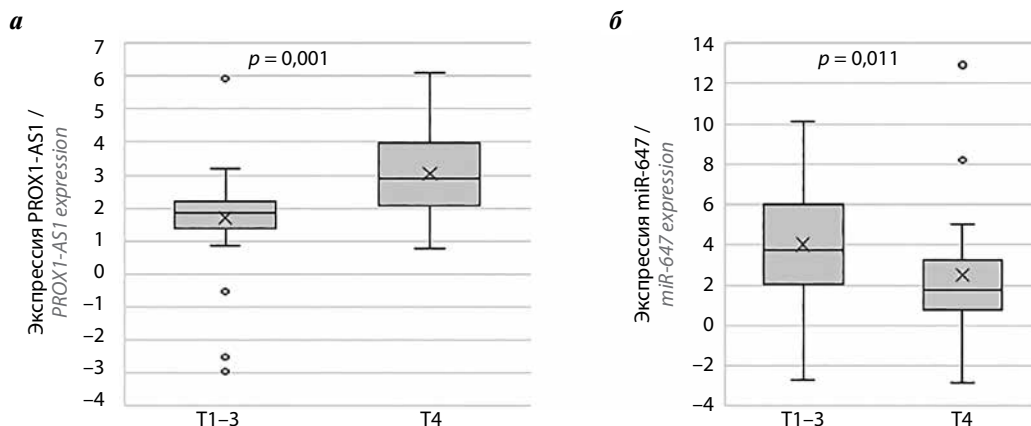


Рис. 5. Экспрессия *PROX1-AS1* (а) и *miR-647* (б) в опухолевой ткани в зависимости от распространенности первичной опухоли у пациентов с раком желудка в группах T1–3 и T4

Fig. 5. Expression of *PROX1-AS1* (a) and *miR-647* (b) in the tumor tissues, depending on the prevalence of the primary tumor in the T1–3 and T4 groups of gastric cancer patients

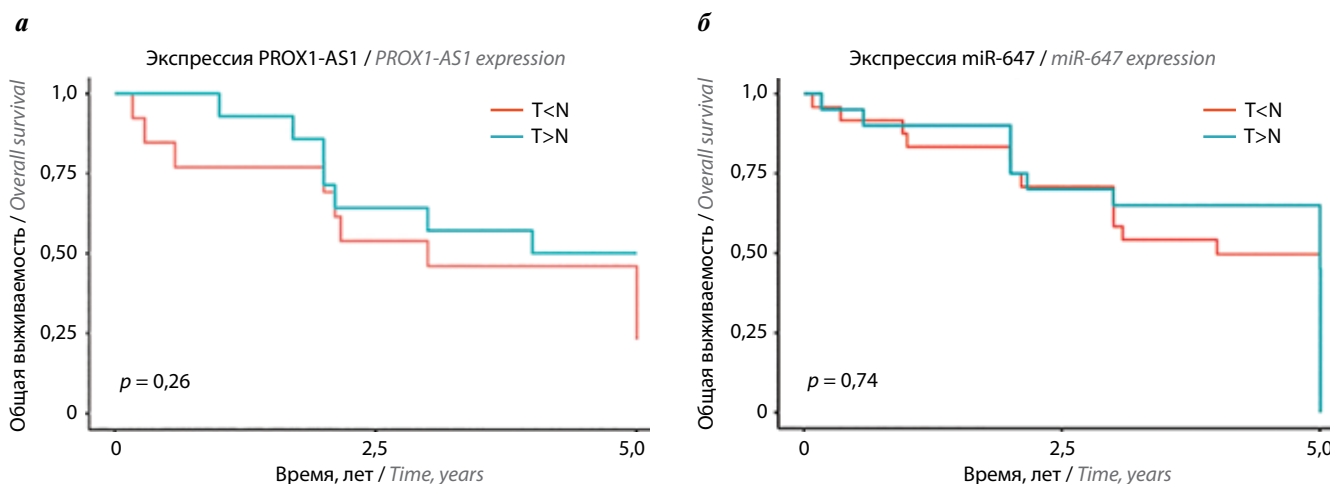


Рис. 6. Кривые Каплана–Мейера, отражающие общую выживаемость пациентов с раком желудка в зависимости от уровня экспрессии *PROX1-AS1* (а) и *miR-647* (б). Т – экспрессия в опухолевой ткани, N – экспрессия в неопухолевой ткани

Fig. 6. Kaplan–Meyer overall survival curves of the gastric cancer patients, depending on *PROX1-AS1* (a) and *miR-647* (b) expression. T – expression in tumor, N – expression in non-tumor

используя базы данных LOGpс [20], GEO (gene expression omnibus) [21] и данные под номером GSE57303 [22, 23]. Согласно полученным результатам, пациенты с гиперэкспрессией *PROX1-AS1* в опухоли имеют лучшие показатели выживаемости ($p = 0,002$), чем пациенты с гипоекспрессией и те, у кого не было показано изменения экспрессии *PROX1-AS1* (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее время появляется все больше доказательств того, что нкРНК играет большую роль в патогенезе РЖ, а изменение их экспрессии рассматривается как одно из ранних событий онкогенеза. Специфичность и стабильность в биологических жидкостях организма делают нкРНК важными маркерами для неинвазивной диагностики [24]. Для исследования клинического значения нкРНК мы провели количественную оценку уровня экспрессии *PROX1-AS1*

и *miR-647* в опухолевых и прилегающих неопухолевых тканях пациентов с РЖ.

С целью изучения потенциальных молекулярных механизмов, объясняющих роль днРНК *PROX1-AS1* при РЖ, мы оценили ее вклад в развитие ключевых признаков рака с помощью базы данных LncACTdb [25]. Было выявлено, что *PROX1-AS1* участвует в поддержании пролиферативного сигналинга, активации инвазии и метастазирования, блокировании апоптоза, индукции ангиогенеза, а также в уклонении от онко-супрессии (рис. 8).

Предыдущие исследования показали, что *PROX1-AS1* имеет отношение к канцерогенезу и дифференциально экспрессируется во многих типах опухолей. *PROX1-AS1* гиперэкспрессируется и проявляет свою канцерогенную активность при папиллярной карциноме щитовидной железы и почечно-клеточной карциноме [13, 26]. Обнаружено также, что нокдаун *PROX1-AS1*

Таблица 2. Ассоциация экспрессии *PROX1-AS1* и *miR-647* в опухолевой ткани с клинико-патологическими характеристиками пациентов с раком желудка

Table 2. Association of *PROX1-AS1* and *miR-647* expression in gastric cancer tumors with clinical and pathological characteristics of patients

Показатель Parameter	Число пациентов (n = 62) Number of patients (n = 62)	Экспрессия <i>PROX1-AS1</i> <i>PROX1-AS1</i> expression			Экспрессия <i>miR-647</i> <i>miR-647</i> expression		
		Среднее значение Mean	Стандартное отклонение Standard deviation	p	Среднее значение Mean	Стандартное отклонение Standard deviation	p
Пол: Gender:							
мужской male	35	2,32	1,42	0,755	3,50	2,86	0,809
женский female	27	2,14	1,62		3,43	3,27	
Возраст, лет: Age, years:							
<49	9	2,65	1,18	0,436	3,07	3,97	0,562
>50	53	2,17	1,56		3,53	2,87	
T-стадия T-stage:							
T1	13	1,86	0,58	0,014*	3,29	1,82	0,012*
T2	12	1,49	1,41		4,25	2,48	
T3	13	1,73	1,87		4,52	3,47	
T4	24	3,03	1,31		2,53	3,37	
N-стадия: N-stage:							
N0	32	1,83	1,52	0,326	3,73	2,51	0,682
N1	16	2,67	1,40		2,70	3,35	
N2	12	2,91	1,34		3,08	2,84	
N3	2	1,41	0,64		7,66	7,39	
M-стадия: M-stage:							
M0	51	2,13	1,44	0,768	3,73	2,51	0,328
M1	11	2,76	1,73		3,18	3,50	
Стадия: Stage:							
I	19	1,70	1,27	0,246	4,07	2,21	0,566
II	14	1,87	1,66		2,95	2,43	
III	21	2,76	1,14		2,76	2,93	
IV	8	2,80	1,94		4,80	5,13	
Выживаемость: Survival status:							
умер dead	35	2,02	0,86	0,281	3,46	2,51	0,966
жив alive	27	2,41	1,85		3,47	3,39	
Пятилетняя выживаемость Five-year survival rate:							
не достигнута no	29	2,32	1,87	0,693	3,38	2,45	0,832
достигнута yes	33	2,15	0,96		3,54	3,48	
Гистологический тип по классификации Лорена: Histological type according to Loren's classification:							
диффузный diffuse	27	2,39	1,53	0,717	3,41	2,69	0,373
интестинальный intestinal	30	2,19	1,28		3,43	3,53	
недифференцированный not classified	5	1,60	2,25		4,00	2,23	

Окончание табл. 2

The end of table 2

Показатель Parameter	Число пациентов (n = 62) Number of patients (n = 62)	Экспрессия PROX1-AS1 PROX1-AS1 expression			Экспрессия miR-647 miR-647 expression		
		Среднее значение Mean	Стандартное отклонение Standard deviation	p	Среднее значение Mean	Стандартное отклонение Standard deviation	p
Наличие перстневидных клеток: Signet ring cells:							
да yes	24	2,27	1,61	0,715	3,59	2,78	0,818
нет no	38	2,23	1,37		3,42	3,22	
Локализация опухоли: Tumor localization:							
антральный отдел antral region	15	1,26	1,75	0,335	2,81	2,69	0,564
кардия cardia	7	2,61	1,35		2,90	2,39	
культи желудка stomach stump	1	3,20	0		3,69	0,00	
тело желудка stomach body	39	2,16	0,84		3,07	4,21	

*Статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Примечание. Сравнение 2 групп по количественному показателю выполнялось с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни, сравнение 3 и более групп — с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса.

*Statistically significant differences ($p < 0.05$).

Note. The Mann–Whitney non-parametric test was used for comparison of two groups variables, the Kruskal–Wallis non-parametric test was used when comparing three or more groups of variables.

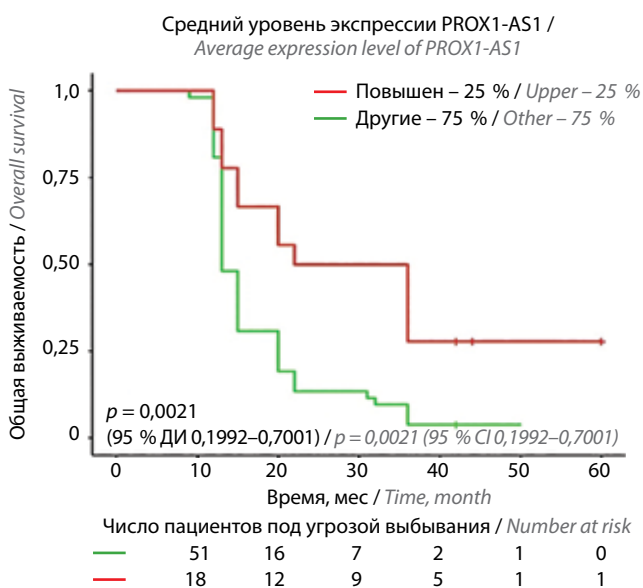


Рис. 7. Кривые Каплана–Мейера, отражающие общую выживаемость пациентов с раком желудка в зависимости от уровня экспрессии PROX1-AS1 (на основе анализа данных под номером GSE57303). ДИ — доверительный интервал

Fig. 7. Kaplan–Meyer curves for the overall survival analysis of gastric cancer patients, according to the PROX1-AS1 expression (data from the GSE57303). CI — confidence interval

активирует сигнальные пути, повышая химиочувствительность клеток ретинобластомы [27].



Рис. 8. Вклад PROX1-AS1 в развитие ключевых признаков рака
Fig. 8. Role of PROX1-AS1 in the hallmarks of cancer

В нашем исследовании не удалось выявить достоверной ассоциации между уровнем экспрессии PROX1-AS1 в опухолевой и неопухолевой тканях пациентов с РЖ ($p = 0,156$), хотя некоторые авторы ее обнаружили [28]. Однако были определены статистически

значимые различия в экспрессии днРНК PROX1-AS1 в опухолевых ($p = 0,002$) и прилежающих неопухолевых ($p < 0,001$) тканях относительно секционных образцов ткани желудка без патологии, что позволяет предположить ее потенциальную диагностическую роль при РЖ. Интересно, что различия выявлены не только для опухолевой, но и для прилежащей неопухолевой ткани. Это может быть связано с вовлечением прилежающей ткани в опухолевый процесс и формированием поля канцеризации.

При исследовании связи экспрессии PROX1-AS1 с клиническими характеристиками пациентов мы обнаружили достоверную ассоциацию уровня экспрессии PROX1-AS1 в опухолевой ткани с распространенностью первичной опухоли (Т). Экспрессия PROX1-AS1 в опухолях Т4 была достоверно выше по сравнению с опухолями Т1–3 ($p = 0,001$), что указывает на возможное влияние PROX1-AS1 на прогрессию РЖ. Аналогичные результаты были получены Т. Guo и соавт., которые показали, что активация PROX1-AS1 коррелирует с прогрессирующей патологической стадией РЖ [28]. Однако мы не обнаружили корреляции экспрессии PROX1-AS1 с другими клиническими характеристиками пациентов (полом, возрастом, показателями N и M классификации злокачественных опухолей TNM, клинической стадией, 5-летней выживаемостью, гистологическим типом по классификации Лорена, анатомической локализацией опухоли).

При оценке ОВ с помощью метода Каплана–Мейера не было выявлено достоверных различий выживаемости у пациентов с разным уровнем экспрессии PROX1-AS1 (см. рис. 6). Однако на основе сведений, представленных в открытом источнике данных GEO и базе данных LOGsc, мы показали, что пациенты с гиперэкспрессией PROX1-AS1 в опухоли имеют лучшие показатели выживаемости (см. рис. 7). Отсутствие достоверных различий в показателях выживаемости в нашем исследовании может быть связано с небольшой выборкой, включающей всего 62 пациента с РЖ. Ее увеличение, вероятно, позволит получить статистически значимые результаты.

В ряде исследований miR-647 была описана как супрессорная микроРНК. Повышение ее экспрессии ассоциировано с ингибированием пролиферации, образованием колоний и блокированием инвазии клеток глиомы [29]. При немелкоклеточном раке легкого miR-647 подавляет пролиферацию клеток за счет остановки клеточного цикла и задержки перехода G1/S [30]. Пациенты с раком мочевого пузыря, имеющие высокий уровень экспрессии miR-647, демонстрировали лучшую выживаемость по сравнению с пациентами с низкой экспрессией микроРНК [31]. Однако в других типах опухолей miR-647 может, напротив, способствовать канцерогенезу. Ее гиперэкспрессия при колоректальном раке стимулирует пролиферацию и миграцию клеток [16]. Таким образом, свойства miR-647 могут меняться в зависимости от типа ткани

и опухоли, что требует более тщательного изучения этой микроРНК. В нашем исследовании показано достоверное снижение уровня экспрессии miR-647 в опухолевой ткани РЖ в группе опухолей Т4 по сравнению с группой опухолей Т1–Т3 ($p = 0,012$), что согласуется с данными о корреляции сниженного уровня экспрессии miR-647 при РЖ с большим размером опухоли и наличием метастазирования [32]. Мы не обнаружили достоверной статистической связи экспрессии miR-647 с другими клиническими характеристиками пациентов, хотя в некоторых исследованиях экспрессия miR-647 значительно изменяется при метастазах РЖ в лимфатических узлах [33]. У пациентов с РЖ при агрессивном клиническом течении заболевания и низких показателях выживаемости экспрессия miR-647 в сыворотке была значительно ниже, чем у пациентов с благоприятным прогнозом [18].

В последнее время широко исследуется взаимодействие PROX1-AS1 и различных микроРНК, которые могут регулироваться этой днРНК. Так, например, было показано, что PROX1-AS1 регулирует miR-1305 при раке легких. Нокдаун PROX1-AS1 приводит к гиперэкспрессии miR-1305, в результате миграция и способность к инвазии клеток рака легкого значительно снижаются [34].

Мы обнаружили отрицательную связь между уровнем экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 как в опухоли, так и в прилежащих морфологически нормальных тканях. Эти данные подтверждают предположение, что PROX1-AS1 связывает miR-647 и играет роль молекулярной губки, способствуя прогрессированию опухоли и повышению ее агрессивности [19]. Мы оценили связь между уровнем экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 через их последовательности с использованием программы RNAhybrid 2.2. Была определена отрицательная энергия Гиббса ($-25,3$ ккал/моль), что может свидетельствовать об обратной взаиморегуляции PROX1-AS1 и miR-647.

Полученные нами данные позволяют прояснить роль PROX1-AS1 и miR-647 в канцерогенезе желудка. Хотя остается много неясного, исследование экспрессии этих нкРНК дает возможность определить их связь с клиническим течением РЖ и рассматривать как потенциальные прогностические маркеры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании показана обратная корреляция между днРНК PROX1-AS1 и микроРНК miR-647 как в опухолевой ткани, так и в прилежащих неопухолевых тканях пациентов с РЖ. Обнаружены статистически значимые различия экспрессии PROX1-AS1 в этих тканях по сравнению с экспрессией в секционных образцах ткани желудка без патологии, что позволяет предположить ее связь с развитием опухоли. При распространении первичной опухоли уровень экспрессии PROX1-AS1 повышается в тканях РЖ достоверно, в то время как уровень

экспрессии miR-647 заметно снижается. Полученные данные позволяют предположить потенциальную про-

гностическую значимость PROX1-AS1 и miR-647 при РЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- 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
- Necula L., Matei L., Dragu D. et al. Recent advances in gastric cancer early diagnosis. *World J Gastroenterol* 2019;25(17):2029–44. DOI: 10.3748/WJG.V25.I17.2029
- Fattani S., Nikbakhsh N., Taheri H. et al. Prevalence of multiple infections and the risk of gastric adenocarcinoma development at earlier age. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;92(1):62–8. DOI: 10.1016/J.DIAGMICROBIO.2018.04.015
- Zhou Z., Lin Z., Pang X. et al. Epigenetic regulation of long non-coding rnas in gastric cancer. *Oncotarget* 2018;9(27):19443. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.23821
- Shi X., Sun M., Liu H. et al. Long non-coding rnas: a new frontier in the study of human diseases. *Cancer Lett* 2013;339(2):159–66. DOI: 10.1016/J.CANLET.2013.06.013
- Ling H., Fabbri M., Calin G.A. MicroRNAs and other non-coding rnas as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(11):847–65. DOI: 10.1038/NRD4140
- Rafiee A., Riazi-Rad F., Havaskary M. et al. Long noncoding RNAs: regulation, function and cancer. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2018;34(2):153–80. DOI: 10.1080/02648725.2018.1471566
- Rawlings-Goss R.A., Campbell M.C., Tishkoff S.A. Global population-specific variation in MiRNA associated with cancer risk and clinical biomarkers. *BMC Med Genomics* 2014;7(1):53. DOI: 10.1186/1755-8794-7-53
- Xie S.S., Jin J., Xu X. et al. Emerging roles of non-coding RNAs in gastric cancer: pathogenesis and clinical implications. *World J Gastroenterol* 2016;22(3):1213–23. DOI: 10.3748/WJG.V22.I3.1213
- Yang F., Bi J., Xue X. et al. Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells. *FEBS J* 2012;279(17):3159–65. DOI: 10.1111/J.1742-4658.2012.08694.X
- Sun M., Xia R., Jin F. et al. Downregulated long noncoding RNA MEG3 is associated with poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer. *Tumour Biol* 2014;35(2):1065–73. DOI: 10.1007/S13277-013-1142-Z
- Jiang W., Meng K., Yang T. Long non-coding RNA PROX1-AS1 promotes the proliferation and migration in gastric cancer by epigenetically activating FGFR1. *Panminerva Med* 2019. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31355614/>
- Rudzinska M., Czarnecka-Chrebelska K.H., Kuznetsova E.B. et al. Long non-coding PROX1-AS1 expression correlates with renal cell carcinoma metastasis and aggressiveness. *Non-Coding RNA* 2021;7(2):25. DOI: 10.3390/NCRNA7020025
- Tu B., Ye L., Cao Q. et al. Identification of a five-MiRNA signature as a novel potential prognostic biomarker in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Hereditas* 2022;159(1):3. DOI: 10.1186/S41065-021-00214-9
- Ye X., Qiu R., He X. et al. MiR-647 Inhibits hepatocellular carcinoma cell progression by targeting protein tyrosine phosphatase receptor type F. *Bioengineered* 2022;13(1):1090–102. DOI: 10.1080/21655979.2021.2017628
- Liu S., Qu D., Li W. et al. MiR-647 and MiR-1914 promote cancer progression equivalently by downregulating nuclear factor IX in colorectal cancer. *Mol Med Rep* 2017;16(6):8189–99. DOI: 10.3892/MMR.2017.7675/HTML
- Zhang X., Zhang M., Wang G. et al. Tumor promoter role of MiR-647 in gastric cancer via repression of TP73. *Mol Med Rep* 2018;18(4):3744–50. DOI: 10.3892/MMR.2018.9358
- Ma H., Wang P., Li Y. et al. Decreased expression of serum MiR-647 is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2019;12(7):2552–8.
- Song X., Bi Y., Guo W. Long noncoding RNA PROX1-AS1 promotes tumor progression and aggressiveness by sponging MiR-647 in gastric cancer. *Minerva Med* 2021;112(3):421–3. DOI: 10.23736/S0026-4806.19.06223-2
- Biomedical Informatics Institute. Available at: <https://bioinfo.henu.edu.cn/DatabaseList.jsp>.
- Barrett T., Wilhite S.E., Ledoux P. et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update. *Nucleic Acids Res* 2013;41(D1):D991–5. DOI: 10.1093/NAR/GKS1193
- Qian Z., Zhu G., Tang L. et al. Whole genome gene copy number profiling of gastric cancer identifies PAK1 and KRAS gene amplification as therapy targets. *Genes Chromosom Cancer* 2014;53(11):883–94. DOI: 10.1002/GCC.22196
- GEO Accession viewer. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE57303>.
- Bure I.V., Nemtsova M.V. Methylation and noncoding RNAs in gastric cancer: everything is connected. *Int J Mol Sci* 2021;22(11):5683. DOI: 10.3390/IJMS22115683
- LncACTdb 3.0: Home. Available at: <http://bio-bigdata.hrbmu.edu.cn/LncACTdb/>.
- Shen Y., Xia E., Bhandari A. et al. LncRNA PROX1-AS1 promotes proliferation, invasion, and migration in papillary thyroid carcinoma. *Biosci Rep* 2018;38(5):BSR20180862. DOI: 10.1042/BSR20180862
- Chen Y., Lu B., Liu L. et al. Long non-coding RNA PROX1-AS1 knockdown upregulates microRNA-519d-3p to promote chemosensitivity of retinoblastoma cells via targeting SOX2. *Cell Cycle* 2021;20(20):2149–59. DOI: 10.1080/15384101.2021.1971352
- Guo T., Wang W., Ji Y. et al. LncRNA PROX1-AS1 facilitates gastric cancer progression via miR-877-5p/PD-L1 Axis. *Cancer Manag Res* 2021;13:2669. DOI: 10.2147/CMAR.S275352
- Qin K., Tian G., Chen G. et al. MiR-647 inhibits glioma cell proliferation, colony formation and invasion by regulating HOXA9. *J Gene Med* 2020;22(3):e3153. DOI: 10.1002/JGM.3153
- Zhang Y.S., Chen T., Cai Y.J. et al. MicroRNA-647 promotes the therapeutic effectiveness of argon-helium cryoablation and inhibits cell proliferation through targeting TRAF2 via the NF-KB signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Oncotargets Ther* 2018;11:6777–84. DOI: 10.2147/OTT.S159337
- Du L., Wang X., Yin Y. et al. Identification of a potentially functional circRNA-miRNA-mRNA ceRNA regulatory network in bladder cancer by analysis of microarray data. *Transl Androl Urol* 2021;10(1):24–36. DOI: 10.21037/TAU-20-660
- Cao W., Wei W., Zhan Z. et al. Role of miR-647 in human gastric cancer suppression. *Oncol Rep* 2017;37(3):1401–11. DOI: 10.3892/OR.2017.5383
- Yang B., Jing C., Wang J. et al. Identification of microRNAs associated with lymphangiogenesis in human gastric cancer. *Clin Transl Oncol* 2014;16(4):374–9. DOI: 10.1007/S12094-013-1081-6
- Zhao Q., Zhang B., Li Z. et al. Effects of lncRNA PROX1-AS1 on proliferation, migration, invasion and apoptosis of lung cancer cells by regulating miR-1305. *J Healthc Eng* 2022;2022:9570900. DOI: 10.1155/2022/9570900

Вклад авторов

Е.А. Ветчинкина: проведение экспериментов, анализ результатов, написание текста статьи;
 А.И. Калинин: биоинформационный анализ, анализ результатов и баз данных;
 Е.Б. Кузнецова, Е.А. Алексеева: проведение экспериментов, анализ результатов;
 А.Э. Киселева: сбор и анализ клинического материала;
 М.В. Немцова: разработка дизайна исследования, написание текста статьи, редактирование;
 И.В. Буре: курирование эксперимента, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contributions

E.A. Vetchinkina: conducting experiments, analyzing the results, article writing;
 A.I. Kalinkin: bioinformatic analysis, analysis of results and databases;
 E.B. Kuznetsova, E.A. Alekseeva: conducting experiments, analyzing the results;
 A.E. Kiseleva: collection and analysis of clinical material;
 M.V. Nemtsova: development of research design, article writing, editing;
 I.V. Bure: curating the experiment, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Ветчинкина / E.A. Vetchinkina: <https://orcid.org/0000-0001-8069-5540>
 А.И. Калинин / A.I. Kalinkin: <https://orcid.org/0000-0001-9215-4581>
 Е.Б. Кузнецова / E.B. Kuznetsova: <https://orcid.org/0000-0001-5825-0430>
 А.Э. Киселева / A.E. Kiseleva: <https://orcid.org/0000-0002-6930-1261>
 Е.А. Алексеева / E.A. Alekseeva: <https://orcid.org/0000-0002-7035-1362>,
 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 (grant No. 20-75-10117).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (протокол № 04-19 от 06.03.2019).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (protocol № 04-19 от 06.03.2019).

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

Статья поступила: 18.08.2022. **Принята к публикации:** 28.10.2022.

Article submitted: 18.08.2022. **Accepted for publication:** 28.10.2022.

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-61-70



Autophagy activation in breast cancer cells *in vitro* after the treatment with PI3K/AKT/mTOR inhibitors

D.D. Grigoreva¹, E.M. Zhidkova¹, E.S. Lylova¹, A.D. Enikeev¹, K.I. Kirsanov^{1,2}, G.A. Belitsky¹,
M.G. Yakubovskaya¹, E.A. Lesovaya^{1,3}

¹N.N. Blokhin National Medical Russian Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia;

²Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

³I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 9 Vysokovol'tnaya St., Ryazan 390026, Russia

Contacts: Diana Dmitrievna Grigoreva grigodidmit@gmail.com

Introduction. Current chemotherapy of breast cancer has a wide range of disadvantages, in particular, the development of therapy-related infections and hormonal imbalance. Combination of main cytostatic with glucocorticoids allows to broaden its therapeutic interval and to decrease the total toxicity of the treatment. However, long-term treatment with glucocorticoids leads to the development of severe side effects via activation of multiple molecular mechanisms. Thus, glucocorticoids activate prosurvival mTOR-dependent autophagy. Therefore, the evaluation of PI3K (phosphoinositide 3-kinases) / Akt (protein kinase B) / mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitors as adjuvants for breast cancer therapy is important for optimization of treatment protocol.

Aim. Analysis of the effects of PI3K/Akt/mTOR inhibitors, rapamycin, wortmannin and LY-294002 in combination with glucocorticoids in breast cancer cell lines of different subtypes.

Materials and methods. We demonstrated the inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling and the autophagy induction after the treatment of breast cancer cells with rapamycin, wortmannin and LY-294002 by Western blotting analysis of Beclin-1, phospho-Beclin-1 (Ser93 and Ser30).

Conclusion. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in combination with Dexamethasone cooperatively inhibited mTOR signaling and activated autophagy in breast cancer cells *in vitro*.

Keywords: breast cancer, autophagy, glucocorticoid, mTOR, rapamycin, wortmannin, LY-294002, phosphoinositide 3-kinases, protein kinase B

For citation: Grigoreva D.D., Zhidkova E.M., Lylova E.S. et al. Autophagy activation in breast cancer cells *in vitro* after the treatment with PI3K/AKT/mTOR inhibitors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(4):61–70. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-61-70

Активация аутофагии в клетках рака молочной железы *in vitro* после воздействия ингибиторами PI3K/AKT/mTOR

Д.Д. Григорьева¹, Е.М. Жидкова¹, Е.С. Лылова¹, А.Д. Еникеев¹, К.И. Кирсанов^{1,2}, Г.А. Белицкий¹, М.Г. Якубовская¹,
Е.А. Лесовая^{1,3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;

³ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 390026 Рязань, ул. Высоковольная, 9

Контакты: Диана Дмитриевна Григорьева grigodidmit@gmail.com

Введение. Химиотерапия рака молочной железы имеет широкий спектр недостатков, в частности развитие сопутствующих инфекций и гормональных нарушений. Комбинация с синтетическими глюкокортикоидами позволяет расширить терапевтический интервал и снизить общую токсичность препаратов основной линии терапии. Однако длительное применение глюкокортикоидов способствует развитию ряда побочных эффектов, которые могут реализовываться за счет различных молекулярных механизмов. Так, глюкокортикоиды могут инициировать индукцию аутофагии, ведущую к выживанию опухолевых клеток. Запуск механизма аутофагии является mTOR-зависимым, в связи с чем актуальной является оценка возможности введения в качестве адъювантов в терапию рака молочной

железы ингибиторов сигнального пути PI3K (фосфоинозитид-3-киназа)/Akt (протеинкиназа B)/mTOR (мишень рапамицина млекопитающих).

Цель работы – анализ действия ингибиторов PI3K/Akt/mTOR рапамицина, вортманнина и LY-294002 в комбинации с глюкокортикоидами на запуск аутофагии в клеточных линиях рака молочной железы различного гистогенеза.

Материалы и методы. Методом Вестерн-блоттинга было показано, что рапамицин, вортманнин и LY-294002 ингибируют активность сигнального пути PI3K/Akt/mTOR и индуцируют аутофагию в клетках рака молочной железы, о чем судили по повышению уровня ключевого белка макроаутофагии, Beclin-1, и его фосфорилированных форм phospho-Beclin-1 по остаткам серина Ser93 и Ser30.

Заключение. В ходе работы было показано, что ингибиторы сигнального пути PI3K/Akt/mTOR в комбинации с дексаметазоном кооперативно подавляют сигнальный путь mTOR и активируют аутофагию в клетках РМЖ *in vitro*.

Ключевые слова: рак молочной железы, аутофагия, глюкокортикоид, мишень рапамицина млекопитающих, рапамицин, вортманнин, LY-294002, фосфоинозитид-3-киназа, протеинкиназа B

Для цитирования: Григорьева Д.Д., Жидкова Е.М., Лылова Е.С. и др. Активация аутофагии в клетках рака молочной железы *in vitro* после воздействия ингибиторами PI3K/AKT/mTOR. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(4):61–70. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-61-70. (На англ.).

INTRODUCTION

Incidence of breast cancer (BC) in 2020 is about 2.26 million new cases. It is the first common cancer accounting for approximately 12 % of all cancer worldwide [1]. Breast cancer subtypes are characterized by high heterogeneity in histogenesis, genetic abnormalities, clinical progression of disease and prognosis. Molecular classification of BC is based on the presence/absence of the expression of estrogen and progesterone receptors (ER, PR) as well as epidermal growth factor 2 (HER2). Hormone-dependent BC, characterized by the ER, PR and HER2 expression, is well curable [2]. The treatment usually includes ER antagonists and selective modulators tamoxifen, raloxifen and some others. Long-term therapy course requires the combination of the main anti-cancer drug with glucocorticoids (GC) [3]. ER-negative BC subdivides to triple negative BC (TNBC) and HER2-positive BC. There BC subtypes are associated with poor prognosis compared to luminal BC. HER2 amplification and hyperexpression in BC allows to apply targeted anti-HER2 therapy with the high efficacy [4, 5]. Triple negative BC accounts for 15 % of all BC cases and is characterized by higher aggressiveness and the percentage of relapses as well as poor prognosis. Triple negative BC treatment is the combination of surgery, radio- and chemotherapy with platina derivatives, paclitaxel and doxorubicin.

Therefore, therapy of hormone-resistant BC consists of cytostatic drugs associated with high systemic toxicity and severe adverse effects. Also modern BC treatment is characterized by the fast development of drug resistance.

Long-term treatment of BC includes GC. Their application allows to broaden the therapeutic range of main cytostatic drug, to diminish its side effects: nausea, vomits, inflammation [6–10]. Glucocorticoids also reveal antiproliferative effects on the cancer cells of various subtypes [6–10]. Synthetic GC are usually used in the therapy of solid tumors including BC because of immunosuppressive, anti-inflammatory and anti-vomiting effects as well as anti-proliferative action on cancer cells [6–10]. However, chronic treatment with GC lead to the different metabolic

complications associated with the induction of the expression of a number GC-dependent genes: *REDD1* [11, 12], *FKBP51* [13], *KLF5* [14], *SGK1* [15], *MKP-1* [16, 17], *ROR1* [18], *YAP* [19] and others. Additionally to direct regulation of gene expression by glucocorticoid receptor (GR) binding with GR-responsive elements in gene promoters and enhancers, GR could also regulate cell viability by the protein-protein interaction with key molecules of pro-proliferative and anti-apoptotic signaling pathways. Thus, GR suppresses the activity of NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), AP-1, Wnt, mTORC (mammalian target of rapamycin) [20–22]. In our previous studies we demonstrated the efficacy of the combined application of GC and PI3K (phosphoinositide 3-kinases)/Akt (protein kinase B)/mTOR modulators with the ability to inhibit the expression of GC-dependent gene *REDD1*, to attenuate the viability of leukemia and lymphoma cells [7, 23, 24]. Moreover, we showed that side effects of GC are realized via multiple mechanisms including pro-survival autophagy activation [25].

Autophagy is the cell process of catabolism of cytoplasmic macromolecules and organelles. Autophagy is divided to macroautophagy associated with the autophagosome assemble and degradation of organelles and genetic material, microautophagy, which is realized via endosome and lysosome formation, and shaperon-related autophagy associated with the activation of heat shock proteins [26]. Macroautophagy induction promotes the shifts in the expression of oncogenes and tumor suppressor genes, the elimination of damaged organelles and the decrease of chromosomal instability [26, 27]. At the same time macroautophagy leads to cell death in tumors associated with the resistance to apoptosis induction [26–32]. Macroautophagy is activated in cells in conditions of hypoxia, stress and nutrient deficiency [26], and allows cells to resist the metabolic stress and the loss of sensitivity to treatment [28]. Autophagy activation is regulated by PI3K/Akt/mTOR signaling [29, 30] via the activation of Beclin-1, key component of PI3K III complex [31, 32]. It was demonstrated that Beclin-1 expression in BC cell line MCF-7 is lower

compared to the normal cells [33]. Along with this observation, Beclin-1 stimulation leads to the induction of autophagy, inhibition of proliferation *in vitro* and suppression of malignant transformation in xenograft model *in vivo* [33]. Mice with the loss of heterozygosity of *BECN1* gene demonstrated higher frequency of spontaneous tumor development [14, 34, 35]. Low *BECN1* expression in HER2-positive BC is associated with HER2 amplification and poor prognosis [36].

Role of autophagy in the pathogenesis of BC is complicated due to difficulties in separation of microautophagy from macroautophagy in different tumors and in evaluation of the contribution of both processes in cell death and survival. Glucocorticoid-dependent autophagy via increase in REDD1 (regulated in development and DNA damage response 1) and FKBP51 expression was demonstrated in non-transformed cells of epidermis [12] and muscle [37]. It is known that GC-dependent kinase SGK1 (serum and glucocorticoid-inducible kinase 1) affects the activation of autophagy via PI3K/Akt/mTOR signaling [15]. Up-regulation of SGK1 is detected in many tumors including BC and is associated with metastasis and chemoresistance [15, 38, 39]. As GC-induced autophagy belongs to prosurvival autophagy type, we propose that GC induce microautophagy associated with the development of the drug resistance. Thus, GC activate the prosurvival autophagy in glioma and blood cancer cells [25, 40–42]. At the same time, the treatment of cancer cells with the combination of GC with PI3K inhibitors 3-methyladenine and chloroquine leads to the apoptosis induction [40].

Role of the autophagy in GC-induced resistance to chemotherapeutics remains unclear. Phosphoinositide 3-kinases inhibitors 3-methyladenine and hydroxychloroquine restore the sensitivity of lapatinib-resistance HER2-positive BC to lapatinib *in vitro* [43], PI3K inhibitor LY-294002 decrease the ER-related resistance of ovarian cancer to paclitaxel [44], and rapamycin (Rapa) restore the

sensitivity of the cancer cells of various subtypes to chemotherapeutics [45–47]. Based of these data we assume that targeted regulation of autophagy by PI3K/Akt/mTOR inhibitors is promising for the optimization of GC-based combined BC therapy (fig. 1) [48, 49].

Therefore, targeted regulation of autophagy could be the option to restore the sensitivity of cancer cells to chemotherapeutics. The application of PI3K/Akt/mTOR inhibitors in combined anti-cancer therapy is promising for autophagy induction [48, 49].

The **aim of the study** – the present study is devoted to evaluation of autophagy activation by PI3K/Akt/mTOR modulators rapamycin (Rapa), wortmannin (WM) and LY-294002 (LY) individually and in combination with Dexamethasone (Dex) in BC cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures. Breast cancer cells were cultured in DMEM (MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines) or RPMI-1640 (HCC-1954 cell line) with 10 % fetal embryonic serum, penicillin (50 ME/ml) and streptomycin (50 ME/ml) (“Paneco”, Russia) at 37 °C and 5 % CO₂.

Cell treatment. Cells were pretreated with solvent, Rapa, WM, LY (10 nM, “LC Labs”, USA) for 4 h and then were treated with Dex (10 mM, “KRKA”, Czech Republic) for 24 h as described [39].

Western blotting. Western blot analysis was performed as following: after the incubation cells were washed with PBS (phosphate buffered saline), then were lysed in RIPA (radioimmunoprecipitation assay) buffer with protease and phosphatase inhibitors (“Sigma-Aldrich”, USA). Protein concentration was evaluated as described in [50]. Proteins were resolved in 10 % PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) in Tris-glycin buffer with 1 % SDS (sodium dodecyl sulfate) and transferred on PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane (pore diameter 0,22 μm). Membranes were blocked with 5 % non-fat milk in TBS

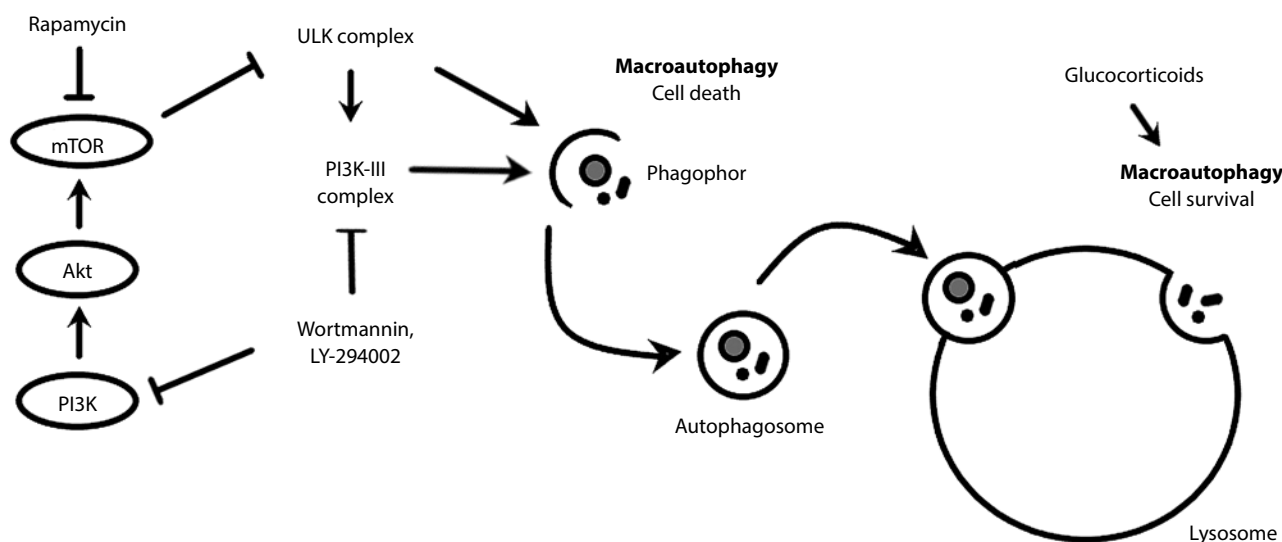


Fig. 1. Regulation of autophagy (adapted from [25, 26, 29]). PI3K – phosphoinositide 3-kinases; mTOR – mammalian target of rapamycin complex; Akt – protein kinase B; ULK – uncoordinated 51-like kinase

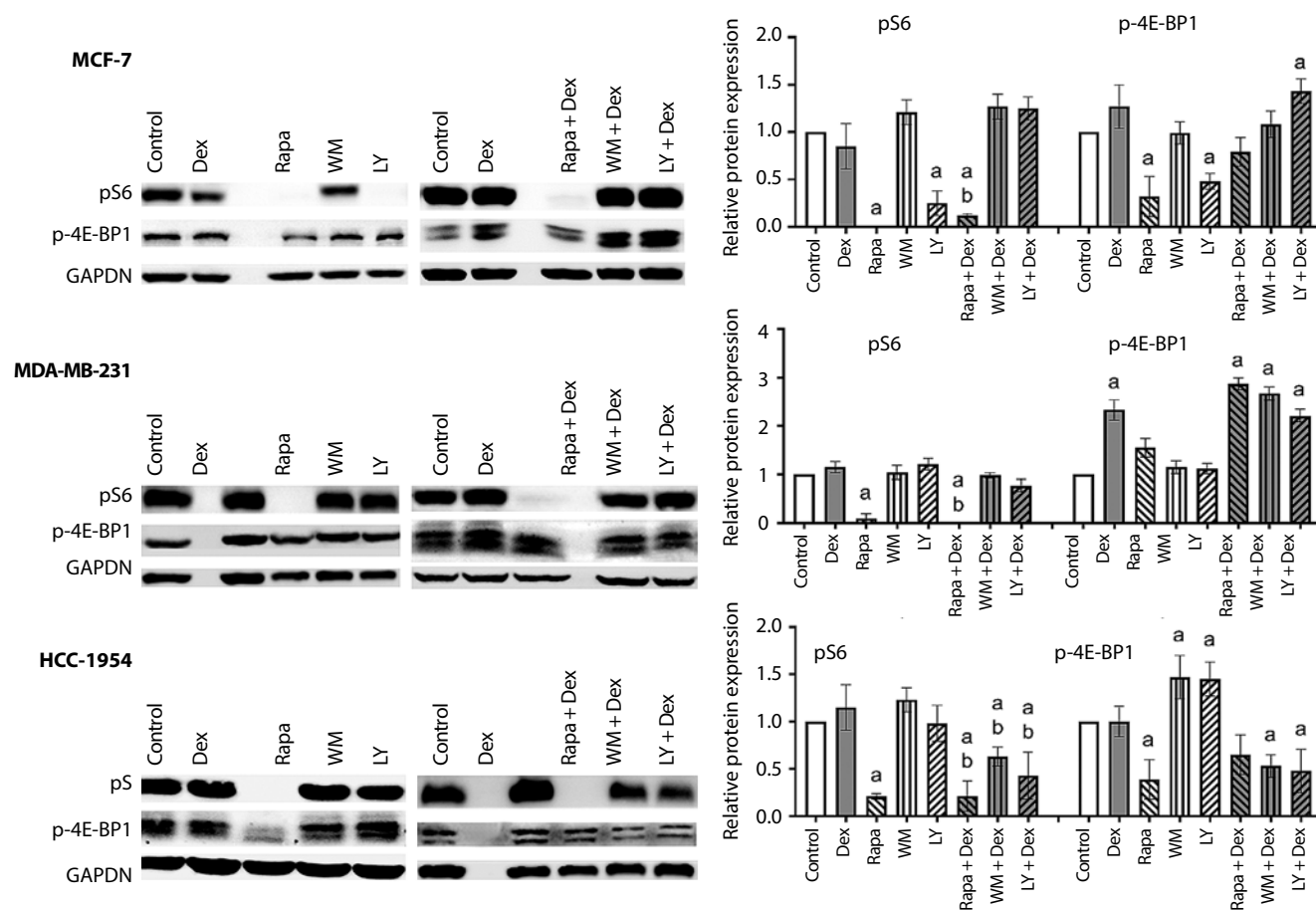


Fig. 2. The effects of PI3K (phosphoinositide 3-kinases)/Akt (protein kinase B)/mTOR (mammalian target of rapamycin complex) inhibitors on the level of p-4E-BP1 and pS6 in breast cancer cells individually and in the combination with Dexamethasone (Dex). The Beclin-1 level was evaluated by Western blotting with the specific antibodies. Densitometry results were normalized by glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression. The treatment effects were compared by one-way ANOVA: a – statistically significant difference from the control; b – statistically significant difference from the samples treated with Dex ($p < 0.05$). Rapa – rapamycin; WM – wortmannin; LY – LY-294002; pS6 – phospho-S6 ribosomal protein

(TBS) and incubated with primary antibody overnight at 4 °C. The following antibodies (“Cell Signaling Technology”, USA) were used: p-Beclin-1 (Ser30), #54101, p-Beclin-1 (Ser93), #14717, Beclin-1, #4122, pS6 (phospho-S6 ribosomal protein), #5364, p-4E-BP1, #2855. Then membranes were incubated with anti-rabbit/anti-mouse IgG secondary antibodies (“Abcam”, UK). To verify equal protein loading and adequate transfer, the membranes were probed with anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, ab181602, “Abcam”, UK). Protein bands were visualized by Clarity™ Western ECL Substrate (“Bio-Rad”, USA) on ImageQuant™ LAS 4000 (“General Electric”, USA). Quantitative analysis were performed by ImageJ software.

Antiproliferative activity. Cells were cultured in 24-well plates (25 000 cell/well) and treated as described above. Antiproliferative effects were evaluated by trypan blue staining using cell counter (“Bio-Rad”, USA).

Induction of apoptosis. Cells were cultured in 24-well plates (50 000 cells/well) and treated as described above. For PI (propidium iodide) staining cells were resuspended in 70 % ethanol, fixed for 2 h at –20 °C, placed in PBS

containing 5 μ L PI, 0,1 % sodium citrate and 0,3 % Triton-X100 and incubated for 30 min at room temperature. Analysis by FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) was carried out to discriminate between live and apoptotic cells.

Statistical analysis. Mean and standard deviation values were calculated using Microsoft Excel software. The treatment effects in each experiment were compared by one-way ANOVA or *t*-test.

RESULTS

Effects of combined application of Dexamethasone and PI3K/Akt/mTOR modulators on mTOR activity. Effects of Rapa, WM, LY and Dex on mTOR inhibition on BC cells were evaluated by the phosphorylation level of key down-stream targets of mTOR: 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) binding protein-1 (Thr37/46), p-4E-BP1) and S6 (phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser240/244), pS6) using Western blotting. It has to be mentioned that MCF-7 and HCC-1954 expressed the mutant *PIK3CA* leading to hyperactivation of PI3K/Akt mTOR signaling.

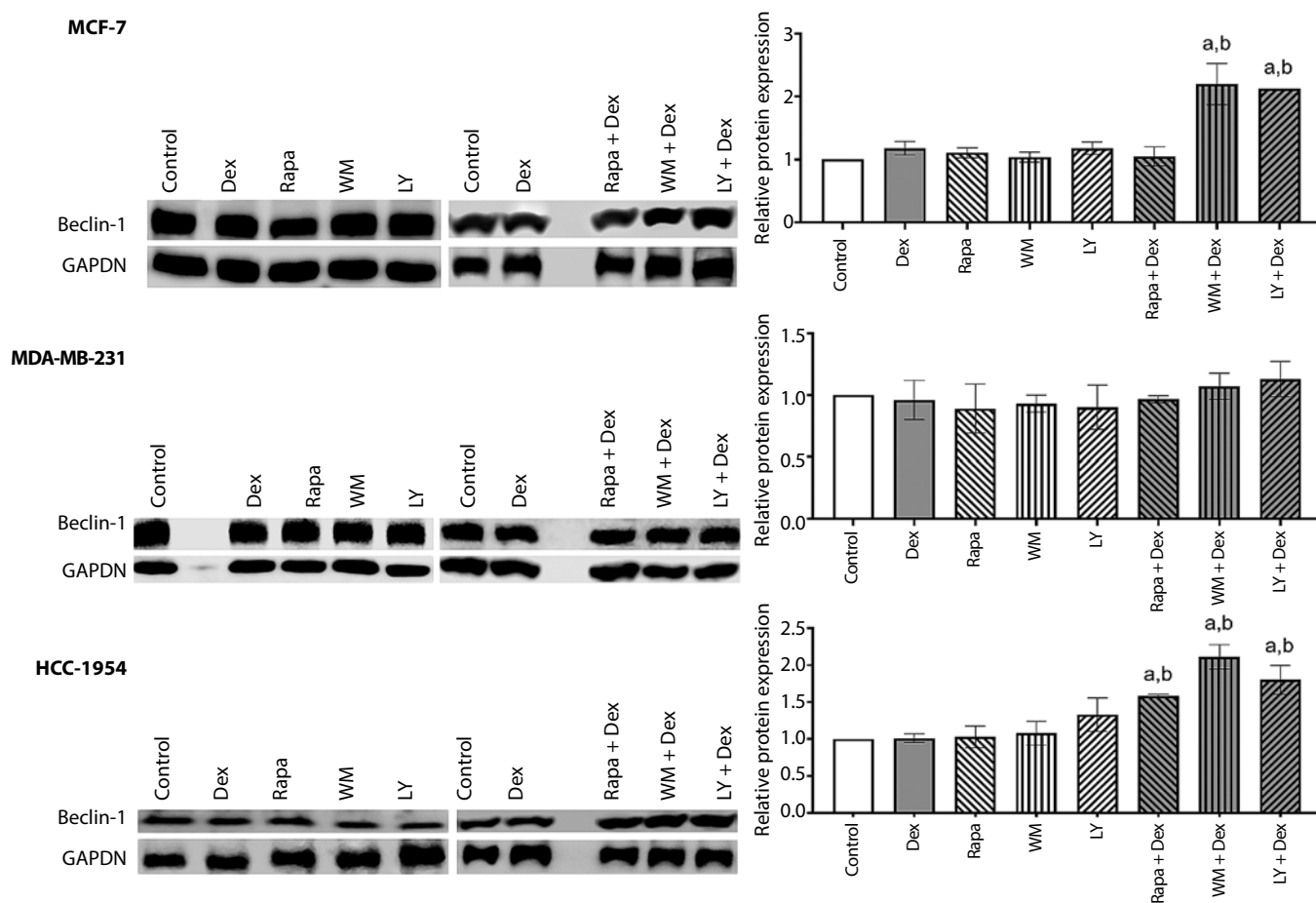


Fig. 3. The effects of PI3K (phosphoinositide 3-kinases)/Akt (protein kinase B)/mTOR (phosphoinositide 3-kinases) inhibitors on the expression of Beclin-1 protein in breast cancer cells individually and in the combination with Dexamethasone (Dex). The Beclin-1 level was evaluated by Western blotting with the specific antibodies. Densitometry results were normalized by glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression. The treatment effects were compared by one-way ANOVA: a – statistically significant difference from the control; b – statistically significant difference from the samples treated with Dex ($p < 0.05$). Rapa – rapamycin; WM – wortmannin; LY – LY-294002

Dexamethasone increased the level of p-4E-BP1 (phospho eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) binding protein-1) in TNBC cells MDA-MB-231. PI3K/Akt/mTOR inhibitors did not affect GC-induced phosphorylation of 4E-BP1 (fig. 2). Rapamycin suppressed the phosphorylation of ribosomal protein S6 in all three BC cell lines individually and in combination with Dex, and inhibited the phosphorylation of 4E-BP1 in MCF-7 and HCC-1954 cells. Wortmannin and LY in combination with Dex decreased the level of p-4E-BP1 and pS6 in HCC-1954 cells (fig. 2). The level of mTOR activity suppression varied between different BC subtypes.

Effect of Dexamethasone and PI3k/Akt/mTOR on the activation of autophagy. Beclin-1 is the main regulator of autophagy in cells [31, 51], and its cleavage in stress conditions induced the shift in cell metabolism to apoptosis activation [31].

Incubation of BC cells with all studied molecules individually and in combination did not lead to Beclin-1 cleavage as well as they did not affect Beclin-1 expression in MDA-MB-231 cells (fig. 3). At the same time combination of WM and LY with Dex induced the increase

in Beclin-1 protein level in MCF-7 and HCC-1954 cells. Rapamycin stimulated the expression of Beclin-1 in combination with Dex in HCC-1954 cell line.

PI3K/Akt/mTOR inhibitors combined with Dex induced the phosphorylation of Beclin-1 by Ser93 residue in cells with *PIK3CA* hyperexpression. Thus, we demonstrated the 1.9 ± 0.5 -fold increase in p-Beclin-1 level after incubation of MCF-7 cells with Rapa + Dex, 3.0 ± 0.7 -fold increase with WM+Dex, and 2.5 ± 0.2 -fold increase with LY + Dex. Weaker effects were showed in HCC-1954 cells: the average increase in p-Beclin-1 (Ser93) level was 1.5-fold (fig. 4).

Dexamethasone and PI3K/Akt/mTOR inhibitors induced the phosphorylation of Beclin-1 by Ser30 in HCC-1954 cells after individual treatment. We demonstrated the 1.5-fold increase in p-Beclin-1 (Ser30) level in MCF-7 and MDA-MB-231 cell after the treatment with Rapa. The similar effect was described in these cell lines after the treatment with WM+Dex (fig. 5).

Cytotoxic effects of Dexamethasone and PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer cells. Dex did not reveal significant cytotoxic effects in BC cells *in vitro* [7] but

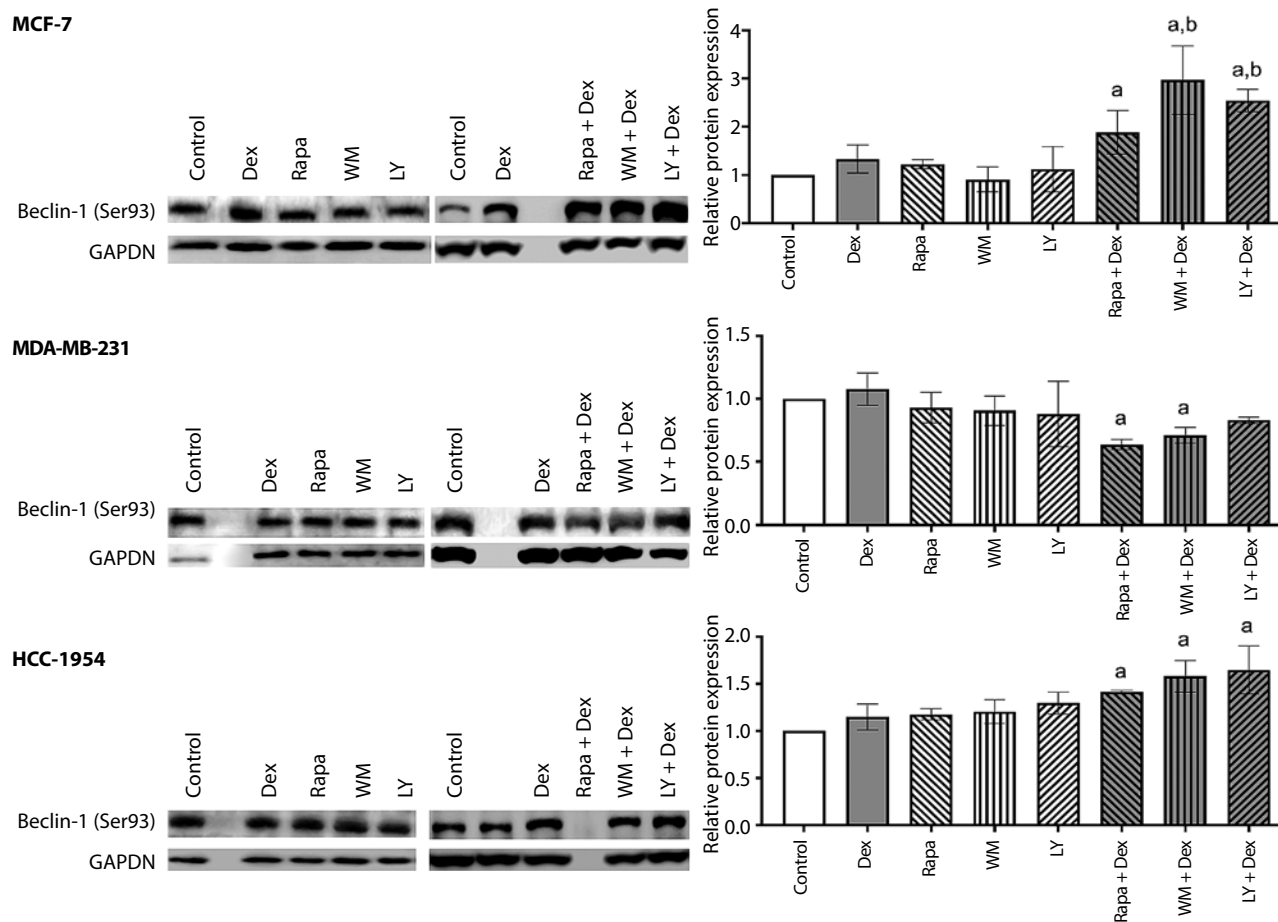


Fig. 4. The effects of PI3K (phosphoinositide 3-kinases)/Akt (protein kinase B)/mTOR (phosphoinositide 3-kinases) inhibitors on the Phospho-Beclin-1 (Ser93) level in breast cancer cells individually and in the combination with Dexamethasone (Dex). The phosho-Beclin-1 level was evaluated by Western blotting with the specific antibodies. Densitometry results were normalized by glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression. The treatment effects were compared by one-way ANOVA: a – statistically significant difference from the control; b – statistically significant difference from the samples treated with Dex ($p < 0.05$). Rapa – rapamycin; WM – wortmannin; LY – LY-294002

induces the growth arrest in G1 phase. Rapamycin inhibited the proliferation of HCC-1954 and MDA-MB-231 cells by 50 and 30 %, respectively (fig. 6, a) as well as induced growth arrest in G1 phase in all studied cells (fig. 6, b). Combination of PI3K/Akt/mTOR inhibitors with Dex decreased the proliferative activity by 20–30 % in MCF-7 cell line.

DISCUSSION

It is well-known that partial mTOR inhibition leads to the development of chemoresistance in cancer cells [52, 53]. The suppression of S6 and 4E-BP1 is associated with antiproliferative effects of Rapa [54–56]. *In vitro* Rapa inhibited the phosphorylation of S6 и 4E-BP1 individually and in combination with Dex in BC cells. LY decrease the level of phosphorylated mTOR targets in MCF-7 cells. At the same time, LY and WM inhibited mTOR activity when used in combination with GC. The data obtained demonstrated partial mTOR inhibition and showed higher sensitivity of S6 to partial inhibitors of PI3K/Akt/mTOR signaling [54]. We demonstrated for the first time the potency of combined application of PI3K/Akt/mTOR modulators

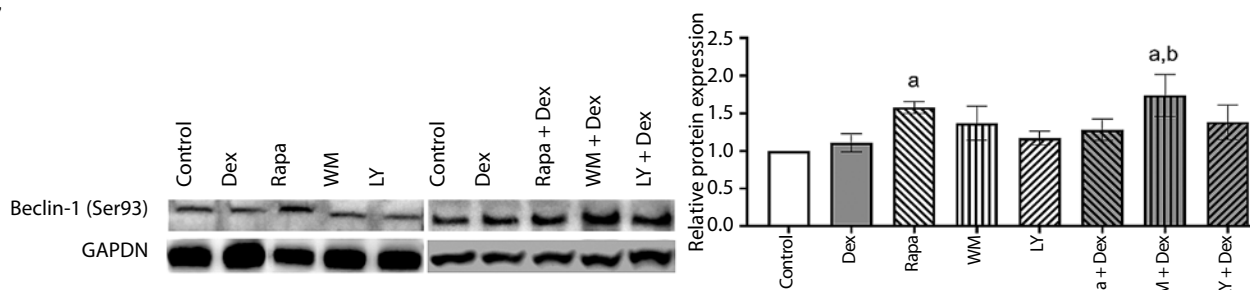
and GC as these compounds did not reveal antagonistic mode of action.

Also we observed higher cytotoxic effects of Dex, Rapa, WM and LY when applied in combination rather than individually in BC cells *in vitro* (fig. 6). Taken together with the absence of Beclin-1 cleavage, these results demonstrated the autophagy contribution to growth arrest in G1 phase (fig. 3).

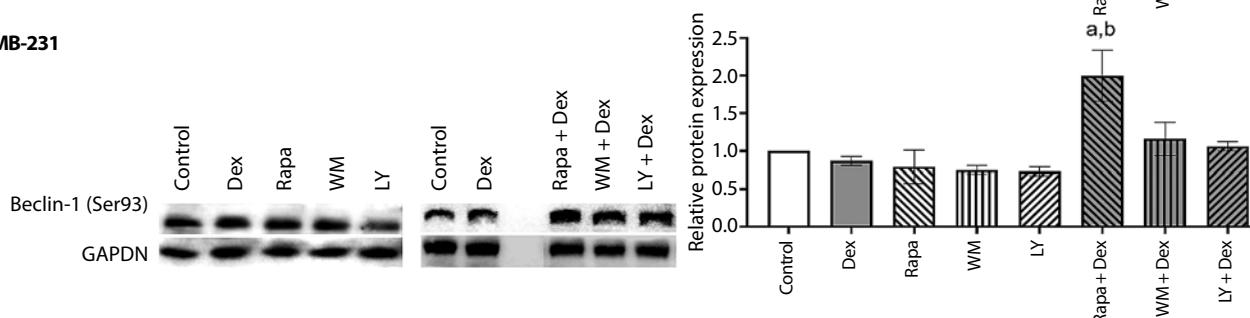
Phosphorylation of Beclin-1 by Ser30 and Ser93 residues is associated with the activation of autophagy [57]. Our results showed the autophagy induction in BC cells by PI3K/Akt/mTOR inhibitors as well as cooperative effects of Dex and PI3K/Akt/mTOR inhibitors on autophagy activation in BC cells with PI3K excessive activation (MCF-7 and HCC-1954).

Dex ability to activate autophagy but not BC cell death *in vitro* demonstrated the induction of prosurvival microautophagy leading to the development of chemoresistance of cancer cells. The combination of GC with PI3K/Akt/mTOR inhibitors allows to activate GC-dependent macroautophagy related to PI3K/Akt/mTOR suppression.

MCF-7



MDA-MB-231



HCC-1954

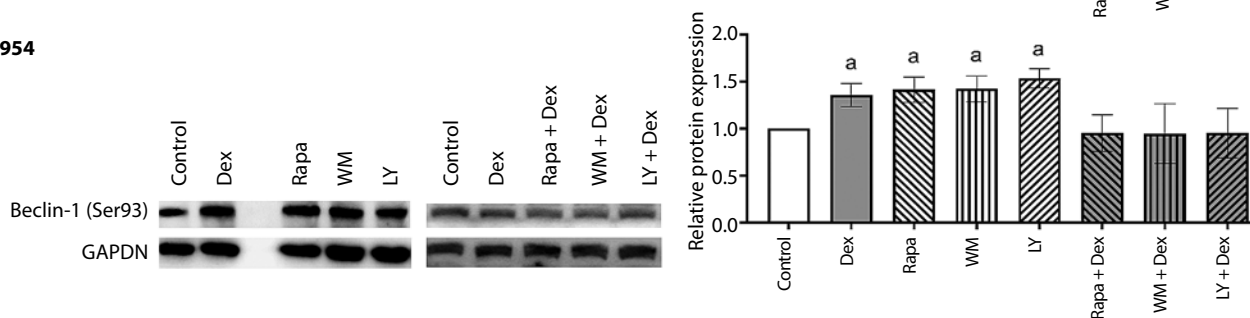
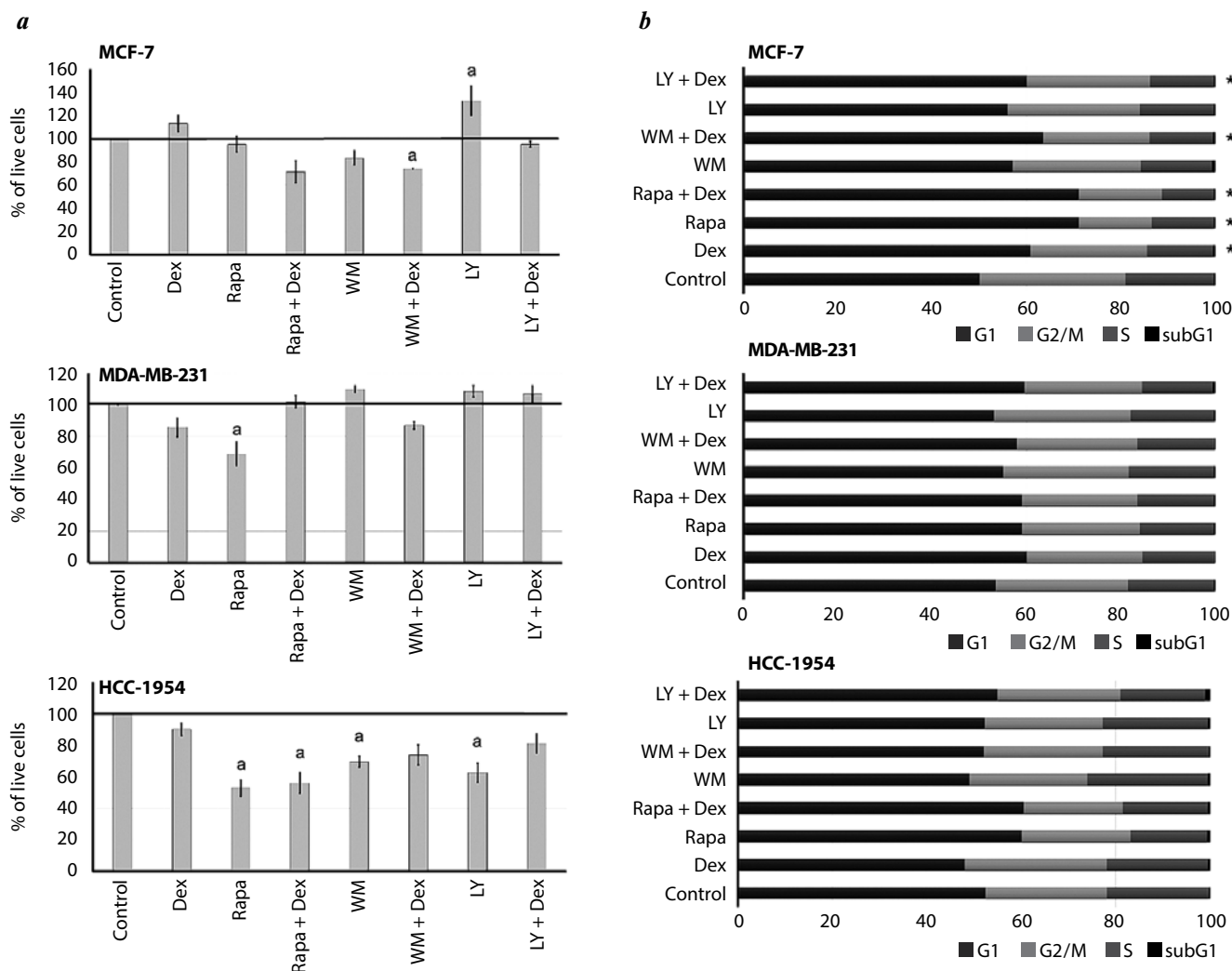


Fig. 5. The effects of PI3K (phosphoinositide 3-kinases)/Akt (protein kinase B)/mTOR (phosphoinositide 3-kinases) inhibitors on the Phospho-Beclin-1 (Ser30) level in breast cancer cells individually and in the combination with Dexamethasone (Dex). The phosho-Beclin-1 level was evaluated by Western blotting with the specific antibodies. Densitometry results were normalized by glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression. The treatment effects were compared by one-way ANOVA: a – statistically significant difference from the control; b – statistically significant difference from the samples treated with Dex ($p < 0.05$). Rapa – rapamycin; WM – wortmannin; LY – LY-294002

CONCLUSION

We demonstrated that the combination of PI3K/Akt/mTOR with Dex cooperatively suppressed mTOR signaling

and activated autophagy in BC cells *in vitro*. Overall, our data provide the rationale for novel GC and PI3K/Akt/mTOR-based therapy for BC and further investigation of this approach.



*Statistically significant difference in G1 phase from the control ($p < 0.05$)

Fig. 6. Antiproliferative effect of PI3K (phosphoinositide 3-kinases)/Akt (protein kinase B)/mTOR (phosphoinositide 3-kinases) inhibitors individually and in combination with Dexamethasone (Dex) in breast cancer cells: *a* – cells were cultured with solvent, Dex, PI3K/Akt/mTOR inhibitors and their combinations. Cells were counted after the 24 h of treatment. Number of the viable cells is presented as percentage to solvent-treated control. *a* – statistically significant difference from the control ($p < 0.05$); *b* – cell cycle phases were detected by flow cytometry with PI staining. The treatment effects were compared by *t*-test. Rapa – rapamycin; WM – wortmannin; LY – LY-294002

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Rezanejad Gatabi Z., Mirhoseini M., Khajeali N. et al. The Accuracy of electrical impedance tomography for breast cancer detection: a systematic review and meta-analysis. *Breast J* 2022;2022:8565490. DOI: 10.1155/2022/8565490
- Onitilo A.A., Engel J.M., Greenlee R.T. et al. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res* 2009; 7(1–2):4–13. DOI: 10.3121/cmr.2009.825
- Vaidya J.S., Baldassarre G., Thorat M.A. et al. Role of glucocorticoids in breast cancer. *Curr Pharm Des* 2010;16(32):3593–600. DOI: 10.2174/138161210793797906
- Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344(11): 783–92. DOI: 10.1056/NEJM200103153441101
- Piccart-Gebhart M.J., Procter M., Leyland-Jones B. et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1659–72. DOI: 10.1056/NEJMoa052306
- Cidlowski J.A. Glucocorticoids and their actions in cells. *Retina* 2009;29(Suppl. 6):21–3. DOI: 10.1097/IAE.0b013e3181ad2636
- Жидкова Е.М., Кузин К.А., Тилова Л.Р. и др. Сравнительный анализ биологических эффектов селективного агониста глюкокортикоидного рецептора CpdA на клеточные линии рака молочной железы различных молекулярных подтипов. *Сибирский онкологический журнал* 2017;16(6):41–6. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-6-41-46
- Zhidkova E.M., Kuzin K.A., Tilova L.R. et al. Comparative analysis of biological effects of selective activator of the glucocorticoid receptor CpdA on different subtypes of breast cancer cell lines.

- Sibirskij onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology. 2017;16(6):41–6. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-6-41-46
8. Conzen S.D. Recent advances in understanding glucocorticoid receptor function in cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2017;15(5):338–40.
 9. Kach J., Conzen S.D., Szmulewitz R.Z. Targeting the glucocorticoid receptor in breast and prostate cancers. *Sci Transl Med* 2015;7(305):19. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac7531
 10. Vandewalle J., Luybaert A., De Bosscher K. et al. Therapeutic mechanisms of glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab* 2018;29(1):42–54. DOI: 10.1016/j.tem.2017.10.010
 11. Britto F.A., Cortade F., Belloum Y. et al. Glucocorticoid-dependent REDD1 expression reduces muscle metabolism to enable adaptation under energetic stress. *BMC Biol* 2018;16(1):65. DOI: 10.1186/s12915-018-0525-4
 12. Baida G., Bhalla P., Kirsanov K. et al. REDD1 functions at the crossroads between the therapeutic and adverse effects of topical glucocorticoids. *EMBO Mol Med* 2015;7(1):42–58. DOI: 10.15252/emmm.201404601
 13. Baida G., Bhalla P., Yemelyanov A. et al. Deletion of the glucocorticoid receptor chaperone FKBP51 prevents glucocorticoid-induced skin atrophy. *Oncotarget* 2018;9(78):34772–83. DOI: 10.18632/oncotarget.26194
 14. Li Z., Chen B., Wu Y. et al. Genetic and epigenetic silencing of the beclin 1 gene in sporadic breast tumors. *BMC Cancer* 2010;10:98. DOI: 10.1186/1471-2407-10-98
 15. Zhu R., Yang G., Cao Z. et al. The prospect of serum and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) in cancer therapy: a rising star. *Ther Adv Med Oncol* 2020;12:1758835920940946. DOI: 10.1177/1758835920940946
 16. Wu W., Chaudhuri S., Brickley D.R. et al. Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res* 2004;64(5):1757–64. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-2546
 17. Melhem A., Yamada S.D., Fleming G.F. et al. Administration of glucocorticoids to ovarian cancer patients is associated with expression of the anti-apoptotic genes SGK1 and MKP1/DUSP1 in ovarian tissues. *Clin Cancer Res* 2009;15(9):3196–204. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2131
 18. Karvonen H., Arjama M., Kaleva L. et al. Glucocorticoids induce differentiation and chemoresistance in ovarian cancer by promoting ROR1-mediated stemness. *Cell Death Dis* 2020;11(9):790. DOI: 10.1038/s41419-020-03009-4
 19. Sorrentino G., Ruggeri N., Zannini A. et al. Glucocorticoid receptor signalling activates YAP in breast cancer. *Nat Commun* 2017;8:14073. DOI: 10.1038/ncomms14073
 20. Ohnaka K. Wnt signaling and glucocorticoid-induced osteoporosis. *Clin Calcium* 2006;16(11):1812–6. DOI: 10.1016/j.ccc.2006.11.1812
 21. Polman J.A., Hunter R.G., Speksnijder N. et al. Glucocorticoids modulate the mTOR pathway in the hippocampus: differential effects depending on stress history. *Endocrinology* 2012;153(9):4317–27. DOI: 10.1210/en.2012-1255
 22. Hirose I., Kanda A., Noda K. et al. Glucocorticoid receptor inhibits Muller glial galectin-1 expression via DUSP1-dependent and -independent deactivation of AP-1 signalling. *J Cell Mol Med* 2019;23(10):6785–96. DOI: 10.1111/jcmm.14559
 23. Lesovaya E.A., Savinkova A.V., Morozova O.V. et al. A novel approach to safer glucocorticoid receptor-targeted anti-lymphoma therapy via REDD1 (regulated in development and DNA damage 1) inhibition. *Mol Cancer Ther* 2020;19(9):1898–908. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-19-1111
 24. Григорьева Д.Д., Жидкова Е.М., Лылова Е.С. и др. Ингибирование глюкокортикоидиндуцированной экспрессии REDD1 рапамицином в клетках рака молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии* 2022;9(1):42–47. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-42-47
 - Grigorieva D.D., Zhidkova E.M., Lylova E.S. et al. Inhibition of glucocorticoid-induced REDD1 expression by rapamycin in breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(1): 42–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-42-47
 25. Molitoris J.K., McColl K.S., Swerdlow S. et al. Glucocorticoid elevation of dexamethasone-induced gene 2 (Dig2/RTP801/REDD1) protein mediates autophagy in lymphocytes. *J Biol Chem* 2011;286(34):30181–9. DOI: 10.1074/jbc.M111.245423
 26. Parzych K.R., Klionsky D.J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 2014;20(3):460–73. DOI: 10.1089/ars.2013.5371
 27. Yun C.W., Lee S.H. The roles of autophagy in cancer. *Int J Mol Sci* 2018;19:11. DOI: 10.3390/ijms19113466
 28. Bhat P., Kriel J., Shubha Priya B. et al. Modulating autophagy in cancer therapy: advancements and challenges for cancer cell death sensitization. *Biochem Pharmacol* 2018;147:170–82. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.11.021
 29. Wang Y., Zhang H. Regulation of autophagy by mTOR signaling pathway. *Adv Exp Med Biol* 2019;1206:67–83. DOI: 10.1007/978-981-15-0602-4_3
 30. Romero M.A., Bayraktar Ekmekcigil O., Bagca B.G. et al. Role of autophagy in breast cancer development and progression: opposite sides of the same coin. *Adv Exp Med Biol* 2019;1152:65–73. DOI: 10.1007/978-3-030-20301-6_5
 31. Kang R., Zeh H.J., Lotze M.T. et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 2011;18(4):571–80. DOI: 10.1038/cdd.2010.191
 32. Vega-Rubin-de-Celis S. The role of Beclin 1-dependent autophagy in cancer. *Biology (Basel)* 2019;9(1). DOI: 10.3390/biology9010004
 33. Liang X.H., Jackson S., Seaman M. et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999;402(6762):672–6. DOI: 10.1038/45257
 34. Qu X., Yu J., Bhagat G. et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003;112(12):1809–20. DOI: 10.1172/JCI20039
 35. Valente G., Morani F., Nicotra G. et al. Expression and clinical significance of the autophagy proteins BECLIN 1 and LC3 in ovarian cancer. *Biomed Res Int* 2014;2014:462658. DOI: 10.1155/2014/462658
 36. Tang H., Sehti S., Titone R. et al. Decreased BECN1 mRNA expression in human breast cancer is associated with estrogen receptor-negative subtypes and poor prognosis. *EBioMedicine* 2015;2(3):255–63. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.01.008
 37. Gao J., Cheng T.S., Qin A. et al. Glucocorticoid impairs cell-cell communication by autophagy-mediated degradation of connexin 43 in osteocytes. *Oncotarget* 2016;7(19):26966–78. DOI: 10.18632/oncotarget.9034
 38. Löffing J., Flores S.Y., Staub O. Sgk kinases and their role in epithelial transport. *Annu Rev Physiol* 2006;68:461–90. DOI: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.131654
 39. Hall B.A., Kim T.Y., Skor M.N. et al. Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) activation in breast cancer: requirement for mTORC1 activity associates with ER- α expression. *Breast Cancer Res Treat* 2012;135(2):469–79. DOI: 10.1007/s10549-012-2161-y
 40. Jiang L., Xu L., Xie J. et al. Inhibition of autophagy overcomes glucocorticoid resistance in lymphoid malignant cells. *Cancer Biol Ther* 2015;16(3):466–76. DOI: 10.1080/15384047.2015.1016658
 41. Surjit M., Ganti K.P., Mukherji A. et al. Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell* 2011;145(2):224–41. DOI: 10.1016/j.cell.2011.03.027
 42. Komakech A., Im J.H., Gwak H.S. et al. Dexamethasone interferes with autophagy and affects cell survival in irradiated malignant glioma cells. *J Korean Neurosurg Soc* 2020;63(5):566–78. DOI: 10.3340/jkns.2019.0187
 43. Chen S., Rehman S.K., Zhang W. et al. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2010;1806(2):220–9. DOI: 10.1016/j.bbcan.2010.07.003
 44. Mabuchi S., Ohmichi M., Kimura A. et al. Estrogen inhibits paclitaxel-induced apoptosis via the phosphorylation of apoptosis

- signal-regulating kinase 1 in human ovarian cancer cell lines. *Endocrinology* 2004;145(1):49–58. DOI: 10.1210/en.2003-0792
45. Stephan S., Datta K., Wang E. et al. Effect of rapamycin alone and in combination with antiangiogenesis therapy in an orthotopic model of human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(20):6993–7000. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0808
 46. Abrams S.L., Steelman L.S., Shelton J.G. et al. Enhancing therapeutic efficacy by targeting non-oncogene addicted cells with combinations of signal transduction inhibitors and chemotherapy. *Cell Cycle* 2010;9(9):1839–46. DOI: 10.4161/cc.9.9.11544
 47. Rexer B.N., Engelman J.A., Arteaga C.L. Overcoming resistance to tyrosine kinase inhibitors: lessons learned from cancer cells treated with EGFR antagonists. *Cell Cycle* 2009;8(1):18–22. DOI: 10.4161/cc.8.1.7324
 48. Holloway R.W., Marignani P.A. Targeting mTOR and glycolysis in HER2-positive breast cancer. *Cancers (Basel)* 2021;13(12):2922. DOI: 10.3390/cancers13122922
 49. Mery B., Poulard C., Le Romancer M. et al. Targeting AKT in ER-positive HER2-negative metastatic breast cancer: from molecular promises to real life pitfalls? *Int J Mol Sci* 2021;22(24):13512. DOI: 10.3390/ijms222413512
 50. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
 51. Menon M.B., Dhamija S. Beclin 1 phosphorylation – at the center of autophagy regulation. *Front Cell Dev Biol* 2018;6:137. DOI: 10.3389/fcell.2018.00137
 52. Ducker G.S., Atreya C.E., Simko J.P. et al. Incomplete inhibition of phosphorylation of 4E-BP1 as a mechanism of primary resistance to ATP-competitive mTOR inhibitors. *Oncogene* 2014;33(12):1590–600. DOI: 10.1038/onc.2013.92
 53. Gremke N., Polo P., Dort A. et al. mTOR-mediated cancer drug resistance suppresses autophagy and generates a druggable metabolic vulnerability. *Nat Commun* 2020;11(1):4684. DOI: 10.1038/s41467-020-18504-7
 54. Yellen P., Saqcena M., Salloum D. et al. High-dose rapamycin induces apoptosis in human cancer cells by dissociating mTOR complex 1 and suppressing phosphorylation of 4E-BP1. *Cell Cycle* 2011;10(22):3948–56. DOI: 10.4161/cc.10.22.18124
 55. Easton J.B., Houghton P.J. Therapeutic potential of target of rapamycin inhibitors. *Expert Opin Ther Targets* 2004;8(6):551–64. DOI: 10.1517/14728222.8.6.551
 56. Dowling R.J., Topisirovic I., Alain T. et al. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science* 2010;328(5982):1172–6. DOI: 10.1126/science.1187532
 57. Qian X., Li X., Cai Q. et al. Phosphoglycerate kinase 1 phosphorylates beclin1 to induce autophagy. *Mol Cell* 2017;65(5):917–31. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.01.027

Authors' contribution

D.D. Grigoreva: Western blot analysis, statistical analysis, article writing;
 E.M. Zhidkova: cell culturing, preparation of the figures, article writing;
 E.S. Lylova: statistical analysis, article writing;
 A.D. Enikeev: statistical analysis, preparation of the figures;
 K.I. Kirsanov: article writing;
 G.A. Belitsky: article edition;
 M.G. Yakubovskaya: analysis of the literature, article edition;
 E.A. Lesovaya: design of the study, article edition.

Вклад авторов

Д.Д. Григорьева: Вестерн-блот-анализ, статистический анализ, написание текста статьи;
 Е.М. Жидкова: культивирование клеток, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи;
 Е.С. Лилова: статистический анализ, написание текста статьи;
 А.Д. Еникеев: статистический анализ, подготовка иллюстративного материала;
 К.И. Кирсанов: написание текста статьи;
 Г.А. Белицкий: редактирование;
 М.Г. Якубовская: анализ литературы, редактирование;
 Е.А. Лесовая: разработка дизайна исследования, редактирование.

ORCID авторов / ORCID of authors

D.D. Grigoreva / Д.Д. Григорьева: <https://orcid.org/0000-0003-2675-089X>
 E.M. Zhidkova / Е.М. Жидкова: <https://orcid.org/0000-0003-3318-9391>
 E.S. Lylova / Е.С. Лилова: <https://orcid.org/0000-0001-6388-1624>
 A.D. Enikeev / А.Д. Еникеев: <https://orcid.org/0000-0002-7628-8616>
 K.I. Kirsanov / К.И. Кирсанов: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>
 M.G. Yakubovskaya / М.Г. Якубовская: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>
 E.A. Lesovaya / Е.А. Лесовая: <https://orcid.org/0000-0002-1967-9637>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Funding. This work is supported by the Russian Science Foundation (grant No 17-75-20124).

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 17-75-20124).

Compliance with principles of bioethics. The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Russian Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

Соблюдение правил биоэтики. Протокол исследования одобрен локальным комитетом Научно-исследовательский институт онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Article submitted: 22.05.2022. **Accepted for publication:** 17.11.2022.

Статья поступила: 22.05.2022. **Принята к публикации:** 17.11.2022.

Биохимические показатели в сыворотке крови больных нейроэндокринными опухолями с карциноидным синдромом

Н.В. Любимова, Ю.С. Тимофеев, А.В. Лебедева, Е.В. Артамонова, И.С. Стилиди, Н.Е. Кушлинский

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

Контакты: Нина Васильевна Любимова biochimia@yandex.ru

Введение. Карциноидный синдром является наиболее частым функциональным синдромом у пациентов с нейроэндокринными опухолями. За манифестацию карциноидного синдрома отвечают более 40 биохимических факторов, среди которых наибольшее значение имеет серотонин. Исследование биохимических маркеров карциноидного синдрома и ассоциированной с ним карциноидной болезни сердца является актуальной задачей лабораторного обследования больных нейроэндокринными опухолями.

Цель исследования – анализ уровней и оценка диагностической эффективности хромогранина А (ХгА), серотонина, мозгового натрийуретического пропептида (proBNP) и тромбоцитарного фактора роста (PDGF-BB) в сыворотке крови больных нейроэндокринными опухолями с различной клинической манифестацией, включая карциноидные синдром и болезнь сердца.

Материалы и методы. Обследованы 66 больных нейроэндокринными опухолями различных локализаций (поджелудочная железа – 24 случая, тонкая кишка – 21, толстая кишка – 6, легкие – 10, невыявленный первичный очаг – 5). У 38 пациентов обнаружены метастазы в печени. У 43 больных отмечены клинические проявления карциноидного синдрома, 16 имели признаки карциноидной болезни сердца. Контрольная группа представлена 30 практически здоровыми донорами. Уровни ХгА, серотонина и PDGF-BB в сыворотке крови определяли с помощью иммуноферментного метода в планшетном формате с использованием тест-систем Chromogranin A NEOLISA (Eurodiagnostica, Швеция), Serotonin ELISA (IBL, Германия) и PDGF-BB ELISA Kit (Invitrogen, США). Анализ proBNP проводили на автоматическом анализаторе Cobas e601 (Roche, Швейцария).

Результаты. При карциноидном синдроме медианы уровней ХгА, серотонина и proBNP были наиболее высокими и статистически значимо отличались от соответствующих показателей контрольной группы. Медиана PDGF-BB статистически значимо выше у больных с опухолями G_2 , чем в группе контроля, в отличие от пациентов с опухолями G_1 и G_2 . Наибольшая диагностическая чувствительность в общей группе нейроэндокринных опухолей отмечена для ХгА (63,6 %) при специфичности 100 %. При карциноидном синдроме наиболее высокая диагностическая чувствительность была характерна для серотонина и ХгА (79 %). У пациентов с клиническими признаками карциноидной болезни сердца отмечалась большая диагностическая чувствительность для proBNP (93,8 %).

Заключение. Проведенное исследование свидетельствует о высокой эффективности ХгА с наибольшей чувствительностью при распространенных формах и опухолях с высокой биологической активностью. Серотонин является чувствительным маркером карциноидного синдрома, ассоциированным с развитием кардиофиброза. Мозговой натрийуретический пропептид – высокочувствительный и специфичный маркер карциноидной болезни сердца. Наиболее высокие уровни PDGF-BB ассоциированы с большой степенью злокачественности нейроэндокринных опухолей.

Ключевые слова: хромогранин А, серотонин, мозговой натрийуретический пропептид, тромбоцитарный фактор роста, нейроэндокринные опухоли

Для цитирования: Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Лебедева А.В. и др. Биохимические показатели в сыворотке крови больных нейроэндокринными опухолями с карциноидным синдромом. Успехи молекулярной онкологии 2022; 9(4):71–77. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-71-77

Biochemical factors in the blood serum of neuroendocrine tumor patients with carcinoid syndrome

N. V. Lyubimova, Yu. S. Timofeev, A. V. Lebedeva, A. V. Artamonova, I. S. Stilidi, N. E. Kushlinskii

N. N. Blokhin National Medical Russian Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia

Contacts: Nina Vasilyevna Lyubimova *biochimia@yandex.ru*

Introduction. Carcinoid syndrome is the most common functional syndrome in patients with neuroendocrine tumors. More than 40 biochemical factors are responsible for the manifestation of carcinoid syndrome, among which serotonin is the most important. The study of biochemical markers of carcinoid syndrome and associated carcinoid heart disease is an important aim of laboratory examination in neuroendocrine tumors patients.

Aim. Analysis of levels and diagnostic efficiency evaluation of chromogranin A (CgA), serotonin, pro-brain natriuretic peptide (proBNP) and platelet-derived growth factor (PDGF-BB) in the blood serum of neuroendocrine tumors patients with various clinical manifestations, including carcinoid syndrome and carcinoid heart disease.

Materials and methods. 66 patients with neuroendocrine tumors of various localizations were examined (pancreas – 24 cases, small intestine – 21, large intestine – 6, lungs – 10, unknown primary focus – 5). 38 patients had liver metastases. In 43 patients, a clinic of carcinoid syndrome was observed, 16 had signs of carcinoid heart disease. The control group consisted of 30 practically healthy people. Serum levels of CgA, serotonin, and PDGF-BB were determined by enzyme immunoassay in microplate format: Chromogranin A NEOLISA (Eurodiagnostica, Sweden), Serotonin ELISA (IBL, German), and PDGF-BB ELISA Kit (Invitrogen, USA). The proBNP analysis was performed on a Cobas e601 automated analyzer (Roche, Switzerland).

Results. In carcinoid syndrome, the medians of CgA, serotonin, and proBNP were the highest, differing statistically significantly from the control group. In patients with G_3 tumors, the median PDGF-BB was statistically significantly higher than in controls, in contrast to G_1 and G_2 . The highest diagnostic sensitivity in the general neuroendocrine tumors group was in CgA – 63.6 %, with a specificity of 100 %. In patients with carcinoid syndrome, the highest diagnostic sensitivity was characteristic of serotonin and chromogranin A (79 %), while in patients with CAD clinic, proBNP had the highest sensitivity – 93.8 %.

Conclusion. The study revealed the high efficiency of CgA, with the highest sensitivity in common forms and tumors with high biological activity. Serotonin can be used in the diagnosis of carcinoid syndrome, associated with cardiofibrosis development. Pro-brain natriuretic peptide is a highly sensitive and specific marker of carcinoid heart disease. The highest levels of PDGF-BB are associated with a high grade of neuroendocrine tumors malignancy.

Keywords: chromogranin A, serotonin, pro-brain natriuretic peptide, platelet-derived growth factor, neuroendocrine tumors

For citation: Lyubimova N.V., Timofeev Yu.S., Lebedeva A.V. et al. Biochemical factors in the blood serum of neuroendocrine tumor patients with carcinoid syndrome. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(4):71–77. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-71-77

ВВЕДЕНИЕ

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) представляют собой группу неоплазий, происходящих из клеток диффузной нейроэндокринной системы, для которых характерна биологическая активность, проявляющаяся в секреции широкого спектра различных соединений [1, 2]. Карциноидный синдром является наиболее частым функциональным синдромом у больных НЭО. Его клиническая манифестация крайне гетерогенна, начиная с легких, часто трудно диагностируемых симптомов и заканчивая тяжелыми проявлениями, значительно снижающими качество жизни пациентов, такими как неконтролируемая диарея или фибротические осложнения. В настоящее время идентифицированы более 40 секреторных продуктов, которые участвуют в патогенезе карциноидного синдрома [3–6].

Основным биохимическим фактором, связанным с развитием карциноидного синдрома, считается серотонин (5-гидрокситриптами́н), представляющий собой биогенный моноамин, образующийся в процессе метаболизма триптофана [6–8]. При этом измененный метаболизм триптофана выявлен у всех пациентов с данным осложнением. Важно отметить, что в патогенезе карциноидного синдрома могут участвовать и другие вещества, такие как биогенные амины, полипептиды, факторы роста и простагландины, обуславливающие развитие клинической симптоматики, включающей приливы, секреторную диарею, бронхо-

спазмы, диспноэ и в конечном счете перитонеальный фиброз и кардиофиброз [6, 9].

Карциноидная болезнь сердца (КБС) является одним из самых опасных осложнений НЭО и проявляется в развитии выраженной правожелудочковой сердечной недостаточности, обусловленной дисфункцией клапанов. При этом механизм ее развития остается до конца неизученным. Известно, что серотонин может стимулировать рост фибробластов и формирование соединительной ткани, что, в свою очередь, приводит к фиброзу клапанов сердца и перитонеальному фиброзу [10–12]. Биохимическая диагностика КБС, развивающейся у 50–60 % больных с карциноидным синдромом, крайне важна для выявления и оценки тяжести течения заболевания. В качестве маркеров КБС применяются N-концевой мозговой натрийуретический пропептид (proBNP), а также серотонин и его производные, при этом гиперсекреция маркеров служит показанием для проведения эхокардиографического исследования [9, 12].

В последние годы активно изучают роль цитокинов и факторов роста в патогенезе НЭО и опухолеассоциированных синдромов, таких как карциноидный синдром и кардиофиброз [13, 14]. К факторам, вовлеченным в развитие процессов фиброза, относится семейство тромбоцитарных факторов роста (PDGF). По своей структуре PDGF является белковой молекулой, состоящей из 2 субъединиц, каждая из которых

может быть представлена одним из 4 типов цепей (А, В, С, D), формируя 5 изоформ: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC и PDGF-DD. Среди них PDGF-BB наиболее доступен для иммуноферментного анализа [15]. Тромбоцитарный фактор роста считают одним из наиболее значимых факторов фиброза, в том числе кардиофиброза, описанных в литературе [13, 16]. Существуют экспериментальные данные об участии этого фактора в развитии фиброза при различных типах опухолей, включая нейроэндокринные. При этом PDGF вовлечен в аутокринную стимуляцию клеток опухоли, а также в аутокринную и паракринную регуляцию клеток стромы [14, 16]. Одно из исследований факторов роста при НЭО было посвящено экспрессии PDGF при опухолях желудочно-кишечного тракта нейроэндокринной природы [17]. До настоящего времени изучение PDGF ограничивается анализом экспрессии белка в тканях опухолей, при этом значение циркулирующих факторов в сыворотке крови остается малоизученным.

Цель исследования — анализ уровней и оценка диагностической эффективности ХгА, серотонина, proBNP и PDGF-BB в сыворотке крови больных НЭО с различной клинической манифестацией, включая карциноидный синдром и КБС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 66 больных НЭО различных локализаций, проходивших лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Выборка представлена 35 женщинами и 31 мужчиной, медиана возраста пациентов составила 58 лет (от 30 до 82 лет). Наиболее часто НЭО выявляли в поджелудочной железе (24 наблюдения) и тонкой кишке (21 наблюдение). Также в выборку включили 10 пациентов с НЭО легких, 6 — с НЭО толстой кишки, 5 — с НЭО из невыявленного первичного очага. У 43 больных отмечены клинические признаки карциноидного синдрома, причем у 16 выявлены признаки КБС. У 38 пациентов наблюдалось распространенное течение заболевания с метастазами в печени.

Контрольная группа представлена 30 практически здоровыми донорами (без онкологических заболеваний), среди которых 16 женщин и 14 мужчин. Медиана их возраста составила 55 лет (от 28 до 80 лет).

Взятие крови проводили натощак из кубитальной вены с соблюдением всех необходимых для стандартного биохимического исследования требований, включая отмену приема антисекреторных препаратов за 7 дней до исследования. Уровни ХгА, серотонина и PDGF-BB в сыворотке крови исследовали иммуноферментным методом с использованием стандартизованных тест-систем Chromogranin A NEOLISA (Eurodiagnostica, Швеция), Serotonin ELISA (IBL, Германия) и PDGF-BB ELISA Kit (Invitrogen, США). Анализ концентраций proBNP проводили с помощью элект-

рохемилюминесцентного метода на автоматическом анализаторе Cobas e601 (Roche, Швейцария). Статистические расчеты выполняли в программах Statistica 10 (Statsoft) и SPSS (IBM) с использованием непараметрических методов исследования (критериев Манна–Уитни, Краскелла–Уоллиса и Фишера). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведен сравнительный анализ ХгА, серотонина, proBNP и PDGF-BB в сыворотке крови больных НЭО общей группы относительно группы контроля (табл. 1). Медианы концентраций ХгА, серотонина и proBNP статистически значимо превышали соответствующие показатели в контрольной группе ($p < 0,05$), тогда как для PDGF-BB в общей группе НЭО различия не были статистически значимыми ($p = 0,22$).

Оценена связь уровней показателей с клинико-биологическими характеристиками, такими как функциональная активность опухоли, выражающаяся в наличии карциноидного синдрома и/или клинических признаков КБС, а также распространенности процесса (наличие метастазов в печени).

Так, при *карциноидном синдроме* медианы ХгА, серотонина и proBNP были наиболее высокими и статистически значимо отличались от медиан в контрольной группе ($p < 0,01$) и группе больных НЭО без признаков карциноидного синдрома ($p < 0,05$). Максимальная концентрация серотонина составила 3160 нг/мл и была выявлена у пациента с выраженной карциноидной симптоматикой. В группе больных без признаков карциноидного синдрома получены статистически значимые различия с группой контроля только для ХгА ($p = 0,01$), медианы серотонина и proBNP не отличались от медиан этой группы. Статистически значимых различий в концентрациях PDGF-BB в зависимости от наличия карциноидного синдрома выявлено не было.

При анализе связи концентраций изучаемых показателей с развитием КБС наиболее значимые результаты получены для proBNP. Так, медиана proBNP у больных с КБС (390 пг/мл) статистически значимо была выше ($p = 0,000001$), чем у больных без таковой (77,2 пг/мл), превышая ее более чем в 5 раз, при статистически значимых различиях в сравнении с медианой контрольной группы ($p = 0,00002$). Максимальный уровень proBNP при КБС достигал 2950 пг/мл, тогда как у пациентов без данной патологии — 341 пг/мл. При этом медиана концентраций proBNP в группе больных НЭО без признаков КБС не отличалась от медианы этого показателя контрольной группы ($p = 0,11$). В то же время медианы уровней серотонина и ХгА статистически значимо ($p < 0,0001$) отличались от этих медиан группы контроля как у пациентов с КБС, так и у пациентов без признаков кардиофиброза. Статистически значимых различий уровней PDGF-BB в зависимости от наличия признаков КБС выявлено не было ($p = 0,12$).

Таблица 1. Концентрации хромогранина А (ХгА), серотонина, мозгового натрийуретического пропептида (ProBNP) и тромбоцитарного фактора роста (PDGF-BB) в группах нейроэндокринных опухолей (НЭО) и контроля, Ме (интерквартильный размах)

Table 1. The concentrations of chromogranin A, serotonin, pro-brain natriuretic peptide (ProBNP) and platelet-derived growth factor (PDGF-BB) in groups of neuroendocrine tumors (NETs) and in the control, Me (interquartile range)

Группа Group	ХгА, нг/мл Chromogranin A, ng/ml	Серотонин, нг/мл Serotonin, ng/ml	ProBNP, пг/мл ProBNP, pg/ml	PDGF-BB, пг/мл PDGF-BB, pg/ml
Общая группа пациентов с НЭО Total group of patients with NETs	182* (94–1400)	452* (145–1112)	140* (50–255)	7199 (5173–9883)
Карциноидный синдром: Carcinoid syndrome:				
есть present	729* (138–4779)	811* (344–1248)	213* (50–371)	6080 (4607–9843)
нет absent	86* (52–142)	167** (114–227)	69 (48–121)	9051 (5425–11300)
Карциноидная болезнь сердца: Carcinoid heart disease:				
есть present	2706* (600–17416)	1125* (537–1369)	390* (253–706)	5106 (4191–9803)
нет absent	125* (60–420)	194* (115–858)	77 (37–184)	8154 (5425–10530)
Метастазы в печени: Liver metastases:				
есть present	759* (180–4995)	936* (441–1226)	212* (62–371)	6655 (4677–9844)
нет absent	89* (49–121)	147 (114–189)	88 (34–186)	7086 (5102–10167)
Локализация НЭО: NET location:				
поджелудочная железа pancreas	147* (60–2848)	136 (90–604)	163* (65–257)	8329** (5515–10167)
легкие lungs	99* (52–253)	206* (148–423)	72 (26–168)	9110 (3109–11870)
тонкая кишка small intestine	426* (180–2242)	1112* (748–1257)	152* (49–311)	5824 (4607–9883)
Степень дифференцировки НЭО: NET differentiation grade:				
G ₁	101* (67–796)	423** (67–1186)	69 (37–184)	5425 (4607–12330)
G ₂	313* (127–3927)	688* (123–1150)	184* (50–270)	6823 (5191–9724)
G ₃	155* (98–748)	384* (196–811)	108* (68–341)	8355* (6376–12910)
Контрольная группа Control group	54 (36–67)	138 (115–169)	50 (25–100)	5933 (4712–6264)

*Статистически значимые отличия от группы контроля ($p < 0,05$). **Отличия от группы контроля имеют характер статистической тенденции ($p = 0,05–0,1$).

*Statistically significant differences from the control group ($p < 0.05$). **Differences from the control group have a character of statistical tendency ($p = 0.05–0.1$).

Был проведен также сравнительный анализ концентраций маркеров в зависимости от *распространенности опухолевого процесса*. В группе больных с метастазами в печени уровни ХгА, серотонина и proBNP статически значимо превышали эти показатели как у пациентов группы контроля, так и у больных с локализованными формами НЭО ($p < 0,001$). При этом, если медианы концентраций ХгА у больных с локализованными формами отличались от медиан этих показателей группы контроля ($p = 0,04$), то для серотонина и proBNP статистически значимых различий выявлено не было. Таким образом, уровень ХгА

повышался как при локализованных, так и при распространенных формах НЭО, тогда как для серотонина и proBNP характерно его увеличение только при распространенных формах заболевания с поражением печени. Медианы концентраций PDGF-BB в зависимости от распространенности заболевания не различались.

При наиболее часто встречающихся в нашей выборке *локализациях НЭО* проводили дифференцированный анализ концентраций изучаемых показателей. Так, медианы уровней ХгА при всех указанных локализациях опухоли статистически значимо отличались от этих показателей контрольной группы ($p < 0,01$).

В то же время медианы концентраций серотонина в группах больных с поражением тонкой кишки ($p < 0,001$) статистически значимо превышали медианы группы контроля, а гиперсекреция proBNP наблюдалась в группах НЭО поджелудочной железы и тонкой кишки. Медианы уровней PDGF-BB в группе пациентов с НЭО поджелудочной железы были выше, чем в контрольной группе, однако различия носили характер статистической тенденции ($p = 0,08$).

У большинства пациентов общей группы НЭО удалось провести статистический анализ связи концентраций изучаемых показателей в сыворотке крови со степенью злокачественности НЭО. Медианы концентраций ХгА и серотонина не зависели от степени злокачественности опухоли и были статистически значимо выше во всех анализируемых группах (G_1 , G_2 , G_3) относительно группы контроля ($p < 0,01$). Медианы уровней proBNP значимо превышали медиану этих показателей группы контроля только при G_2 и G_3 ($p < 0,05$). Необходимо отметить, что медианы сыворо-

точных концентраций PDGF-BB не отличались от медиан контрольной группы при G_1 и G_2 , однако у больных НЭО со степенью злокачественности G_3 медиана этого показателя (8355 пг/мл) была статистически значимо выше, чем в контрольной группе (5934 пг/мл) ($p = 0,02$). Таким образом, увеличение концентрации PRGF-BB в сыворотке крови характерно только при НЭО высокой степени злокачественности.

При оценке диагностической эффективности изучаемых показателей приняты следующие пороговые концентрации: ХгА — 108 нг/мл, серотонин — 200 нг/мл, ProBNP — 160 пг/мл, PDGF-BB — 8700 пг/мл, полученные с учетом результатов определения в контрольной группе с использованием ROC-анализа (табл. 2).

В анализируемой выборке наибольшей диагностической чувствительностью в общей группе НЭО обладал ХгА — 63,6 % при специфичности в контрольной группе 100 %.

У больных с карциноидным синдромом наиболее часто повышались уровни серотонина (79,0 %)

Таблица 2. Частота превышения пороговых уровней хромогранина А (ХгА), серотонина, мозгового натрийуретического пептида (ProBNP) и тромбоцитарного фактора роста (PDGF-BB) в различных группах нейроэндокринных опухолей (НЭО) и в контрольной группе

Table 2. The frequency of exceeding the threshold level of the chromogranin A, serotonin, pro-brain natriuretic peptide (ProBNP) and platelet-derived growth factor (PDGF-BB) in different groups of neuroendocrine tumors (NETs) and in the control group

Показатель Parameter	ХгА, нг/мл Chromogranin A, ng/ml	Серотонин, нг/мл Serotonin, ng/ml	ProBNP, пг/мл ProBNP, pg/ml	PDGF-BB, пг/мл PDGF-BB, pg/ml
Специфичность в контрольной группе, % Specificity in the control group, %	100	91	100	80
Частота повышения порогового уровня, %: Frequency of increased threshold level, %:				
общая группа НЭО total NET group	63,6	60,6	46,9	40,9
с карциноидным синдромом with carcinoid syndrome	79,1	79,0	60,4	29,5
без карциноидного синдрома without carcinoid syndrome	34,8	26,0	21,7	60,8
с карциноидной болезнью сердца with carcinoid heart disease	87,5	93,7	93,8	31,3
без карциноидной болезни сердца without carcinoid heart disease	53,2	46,8	29,7	44,6
с метастазами в печени with liver metastases	84,2	78,9	60,5	39,4
без метастазов в печени without liver metastases	30,3	20,0	35,0	40,4
Локализации НЭО, %: NET location, %:				
поджелудочная железа pancreas	54,2	33,3	50,0	54,1
легкие lungs	40,0	50,5	30,0	70,7
тонкая кишка small intestine	80,9	95,2	47,6	42,9
Степень злокачественности НЭО, %: NET malignancy grade, %:				
G_1	45,5	54,5	36,4	45,5
G_2	79,2	66,6	54,1	33,3
G_3	60,0	60,0	40,0	50,0

и хромогранина А (79,1 %). При этом у пациентов с клиническими признаками КБС максимальная диагностическая чувствительность была характерна для proBNP — 93,8 % при специфичности в контрольной группе 100 %.

Согласно данным, представленным в табл. 2, в группах больных с распространенными формами НЭО частота повышения уровней ХгА, серотонина и proBNP была более высокой (84,2; 78,9 и 60,5 % соответственно), чем при локализованных формах НЭО (30,3; 20,2 и 35,0 % соответственно). При этом частота повышения концентрации PDGF-BB не зависела от распространенности опухолевого процесса.

Наибольшая чувствительность ХгА и серотонина характерна для группы НЭО тонкой кишки (80,9 и 95,2 % соответственно), что может быть связано с особенностями секреторной активности клеток этого типа опухоли, а также распространенностью процесса. Наиболее высокая частота повышения уровня PDGF-BB (70,7 %) выявлена в группе НЭО легких.

Согласно полученным данным, ХгА показал высокую диагностическую чувствительность у больных НЭО, достигая максимальных значений в группе с карциноидным синдромом, а также при распространенных формах НЭО, что подтверждает его значение как основного универсального биохимического маркера НЭО [18–21].

Значение серотонина как маркера карциноидного синдрома подтверждается его высокими уровнями и частотой их повышения в группе больных с карциноидной симптоматикой, при этом наиболее выраженная его гиперсекреция характерна для пациентов с НЭО тонкой кишки [5, 18, 22, 23]. Необходимо отметить, что наблюдаемая у пациентов с КБС выраженная гиперсекреция серотонина подтверждает фундаментальные представления о его значении как ключевого фактора в развитии кардиофиброза, возникающего при карциноидном синдроме [6].

Проанализированные нами впервые данные пациентов с верифицированной КБС представляют особое значение в отношении proBNP как маркера диагностики и оценки течения этого тяжелого осложнения карциноидного синдрома. Высокие диагностические чувствительность и специфичность proBNP подтверждают, что он является важным маркером КБС, что согласуется с результатами ряда исследований [10, 12, 24].

Полученные нами сывороточные концентрации PDGF-BB позволяют предположить его связь с высокой степенью злокачественности опухолей, что подтверждают приведенные в литературе данные о высокой митогенной активности этого фактора и его участия в стимуляции опухолевого роста [13, 14, 16]. Для оценки перспектив исследования PDGF при НЭО требуется дополнительный анализ данных больших групп пациентов с НЭО с различными гистологическими характеристиками и биологической активностью и разной локализацией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование свидетельствует о высокой эффективности ХгА при НЭО, при этом наибольшее повышение его концентрации характерно для распространенных форм заболевания, осложненных карциноидным синдромом. Серотонин является чувствительным маркером карциноидного синдрома, ассоциированным с развитием кардиофиброза, тогда как proBNP — высокочувствительным и специфичным маркером КБС. Уровни PDGF-BB ассоциированы со степенью злокачественности НЭО. Дальнейшие исследования на больших выборках с включением НЭО различных локализаций позволят более детально оценить диагностические возможности биологически активных соединений и их связь с клиническими особенностями и течением опухолей нейроэндокринной природы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Aluri V., Dillon J.S. Biochemical testing in neuroendocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2017;46(3):669–77. DOI: 10.1016/j.ecl.2017.04.004
- Hofland J., Katsas G., de Herder W.W. Advances in the diagnosis and management of well-differentiated neuroendocrine neoplasms. *Endocr Rev* 2020;41(2):371–403. DOI: 10.1210/endo/bnz004
- Eriksson B., Oberg K., Stridsberg M. Tumor markers in neuroendocrine tumors. *Digestion* 2000;62(1):33–8. DOI: 10.1159/000051853
- De Herder W.W. Biochemistry of neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007;21(1):33–41. DOI: 10.1016/j.beem.2006.12.002
- Vinik A.I., Silva M.P., Woltering E.A. et al. Biochemical testing for neuroendocrine tumors. *Pancreas* 2009;38(8):876–89. DOI: 10.1097/MPA.0b013e3181bc0e77
- Fanciulli G., Ruggeri R.M., Grossrubatscher E. et al. Serotonin pathway in carcinoid syndrome: clinical, diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Rev Endocr Metab Disord* 2020;21(4):599–12. DOI: 10.1007/s11154-020-09547-8
- Jian B., Xu J., Connolly J. et al. Serotonin mechanisms in heart valve disease I: serotonin-induced up-regulation of transforming growth factor-beta1 via G-protein signal transduction in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol* 2002;161(6):2111–21. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)64489-6
- Lesurtel M., Soll C., Graf R., Clavien P.A. Role of serotonin in the hepato-gastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives. *Cell Mol Life Sci* 2008;65(6):940–52. DOI: 10.1007/s00018-007-7377-3
- Hayes A.R., Davar J., Caplin M.E. Carcinoid heart disease: a review. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2018;47(3):671–82. DOI: 10.1016/j.ecl.2018.04.012

10. Bhattacharyya S., Toumpanakis C., Chilkunda D. et al. Risk factors for the development and progression of carcinoid heart disease. *Am J Cardiol* 2011;107(8):1221–6. DOI: 10.1016/j.amjcard.2010.12.025
11. Grozinsky-Glasberg S., Grossman A.B., Gross D.J. Carcinoid heart disease: from pathophysiology to treatment – something in the way it moves. *Neuroendocrinology* 2015;101(4):263–73. DOI: 10.1159/000381930
12. Jin C., Sharma A.N., Thevakumar B. et al. Carcinoid heart disease: pathophysiology, pathology, clinical manifestations, and management. *Cardiology* 2021;146(1):65–73. DOI: 10.1159/000507847
13. Kong P., Christia P., Frangogiannis N.G. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci* 2014;71(4):549–74. DOI: 10.1007/s00018-013-1349-6
14. Laskaratos F.M., Rombouts K., Caplin M. et al. Neuroendocrine tumors and fibrosis: an unsolved mystery? *Cancer* 2017;123(24):4770–90. DOI: 10.1002/cncr.31079
15. Fredriksson L., Li H., Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15(4):197–204. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.007
16. Klinkhammer B.M., Floege J., Boor P. PDGF in organ fibrosis. *Mol Aspects Med* 2018;62:44–62. DOI: 10.1016/j.mam.2017.11.008
17. Chaudhry A., Papanicolaou V., Oberg K. et al. Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in neuroendocrine tumors of the digestive system. *Cancer Res* 1992;52(4):1006–12.
18. Oberg K. Circulating biomarkers in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 2011;18(1):17–25. DOI: 10.1530/ERC-10-0280
19. Jun E., Kim S.C., Song K.B. et al. Diagnostic value of chromogranin A in pancreatic neuroendocrine tumors depends on tumor size: a prospective observational study from a single institute. *Surgery* 2017;162(1):120–30. DOI: 10.1016/j.surg.2017.01.019
20. Modlin I.M., Gustafsson B.I., Moss S.F. et al. Chromogranin A – biological function and clinical utility in neuroendocrine tumor disease. *Ann Surg Oncol* 2010;17(9):2427–43. DOI: 10.1245/s10434-010-1006-3
21. Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Чурикова Т.К. и др. Значение хромогранина А в диагностике и прогнозе нейроэндокринных опухолей. *Медицинский алфавит* 2019;17(2):19–22. DOI: 10.33667/2078-5631-2019-2-17(392)-19-22
22. Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Чурикова Т.К. et al. The importance of chromogranin A in the diagnosis and prognosis of neuroendocrine tumors. *Medicinskij alfavit = Medical Alphabet* 2019;17(2):19–22. (In Russ.). DOI: 10.33667/2078-5631-2019-2-17(392)-19-22
23. Любимова Н.В., Кушлинский Н.Е. Биохимические маркеры сыворотки крови и мочи при обследовании больных нейроэндокринными опухолями. *Альманах клинической медицины* 2016;44(4):439–50. DOI: 10.18786/2072-0505-2016-44-4-439-450
24. Любимова Н.В., Кушлинский Н.Е. Biochemical markers of blood serum and urine in the examination of patients with neuroendocrine tumors. *Al'manah klinicheskoy mediciny = Almanac of Clinical Medicine* 2016;44(4):439–50. (In Russ.). DOI: 10.18786/2072-05-2016-44-4-439-450
25. Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Чурикова Т.К. и др. Хромогранин А и серотонин в оценке эффективности лечения нейроэндокринных опухолей. *Альманах клинической медицины* 2019;47(8):685–90. DOI: 10.18786/2072-0505-2019-47-054
26. Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Чурикова Т.К. et al. Chromogranin A and serotonin in evaluating the effectiveness of treatment of neuroendocrine tumors. *Al'manah klinicheskoy mediciny = Almanac of Clinical Medicine* 2019; 47(8):685–90. (In Russ.). DOI: 10.18786/2072-05-2019-47-054
27. Korse C.M., Taal B.G., de Groot C.A. et al. Chromogranin-A and N-terminal pro-brain natriuretic peptide: an excellent pair of biomarkers for diagnostics in patients with neuroendocrine tumor. *J Clin Oncol* 2009;27(26):4293–99. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.7047

Вклад авторов

Н.В. Любимова: разработка дизайна исследования, написание текста статьи;
 Ю.С. Тимофеев: проведение иммуноферментного анализа, статистический анализ, написание текста статьи;
 А.В. Лебедева: сбор материала, проведение иммуноферментного анализа, написание текста статьи;
 Е.В. Артамонова: консультации пациентов;
 И.С. Стилиди: консультации пациентов, выполнение операций;
 Н.Е. Кушлинский: разработка дизайна исследования, редактирование.

Authors' contributions

N.V. Lyubimova: study design, article writing;
 Yu.S. Timofeev: enzyme immunoassay performing, statistical analysis, article writing;
 A.V. Lebedeva: collecting of materials, enzyme immunoassay performing, article writing;
 E.V. Artamonova: patient consultations;
 I.S. Stilidi: patient consultations, execution of operations;
 N.E. Kushlinskii: study design, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.В. Любимова / N.V. Lyubimova: <https://orcid.org/0000-0003-0430-2754>
 Ю.С. Тимофеев / Yu.S. Timofeev: <https://orcid.org/0000-0001-9305-6713>
 А.В. Лебедева / A.V. Lebedeva: <https://orcid.org/0000-0001-5881-1795>
 Е.В. Артамонова / E.V. Artamonova: <https://orcid.org/0000-0001-7728-9533>
 И.С. Стилиди / I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>
 Н.Е. Кушлинский / N.E. Kushlinskii: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>

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 этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The local ethics committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia approved the protocol of the study. All patients signed an informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 26.08.2022. **Принята к публикации:** 20.09.2022.

Article submitted: 26.08.2022. **Accepted for publication:** 20.09.2022.

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-78-88



Экспрессионная гетерогенность генов семейства ABC-транспортеров и генов химиочувствительности в опухоли желудка, канцероматозе и метастазах в лимфатические узлы

М.М. Цыганов^{1,2}, И.А. Цыденова¹, В.А. Маркович¹, М.К. Ибрагимова¹⁻³, Е.О. Родионов¹,
С.А. Тузиков¹, Н.В. Литвяков¹

¹Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; Россия, 634009 Томск, переулок Кооперативный, 5;

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2;

³Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия; 634050 Томск, проспект Ленина, 36

Контакты: Матвей Михайлович Цыганов TsyganovMM@yandex.ru

Введение. Установлено, что метастатическим опухолям (в частности раку желудка) свойственна гетерогенность между первичными и метастатическими очагами. Такой тип гетерогенности является причиной низкой эффективности терапии, поэтому его следует учитывать при лечении первично-метастатических форм опухоли. В связи с этим сравнительный анализ экспрессии генов ABC-транспортеров и генов химиочувствительности позволит в определенной мере охарактеризовать резистентность и чувствительность первичной опухоли, канцероматоза и метастазов к терапии и дать основу для персонализированного подхода в лечении.

Цель – оценка экспрессионной гетерогенности генов ABC-транспортеров и генов химиочувствительности в опухоли желудка, канцероматозе и метастазах в лимфатические узлы.

Материалы и методы. В исследование включен 41 больной с диссеминированным раком желудка IV стадии с канцероматозом брюшины. Всем пациентам выполнена операция в объеме паллиативной гастрэктомии по Ру. После хирургического вмешательства в зависимости от показаний проводилась химиотерапия по схемам GemCap + C, FOLFIRI + C, XELIRI + C, PC. РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Германия). Уровень экспрессии генов ABC-транспортеров (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2*) и генов химиочувствительности (*BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2α*, *TUBβ3*, *TYMS*, *GSTP1*) в первичной опухоли, канцероматозе и метастазах в лимфатические узлы оценивали с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Результаты. Показано, что уровень экспрессии исследуемых генов сильно варьирует. Из генов ABC-транспортеров наибольшее значение экспрессии для опухолевой ткани желудка, канцероматоза и метастаза в лимфатические узлы выявлено для *ABCG1* ($3,1 \pm 1,1$; max 32,0), *ABCG2* ($7,9 \pm 2,3$; max 54,1) и *ABCG2* ($9,6 \pm 3,8$; max 100,9) соответственно. Среди генов химиочувствительности гиперэкспрессия в этих тканях была характерна только для *TOP2α* ($17,2 \pm 5,9$; max 161,9; $10,8 \pm 4,1$; max 105,1; $35,3 \pm 0,8$; max 439,6 соответственно). Установлено, что уровень экспрессии генов *TOP2α* и *BRCA1* выше в метастазах в лимфатических узлах по сравнению с опухолевой тканью желудка и канцероматозом ($p = 0,005$ и $p = 0,001$ соответственно), тогда как экспрессия гена *ABCC1* статистически значимо выше в канцероматозе ($p = 0,03$).

Заключение. Таким образом, прослеживается высокий уровень экспрессионной гетерогенности при раке желудка, влияющей на паттерны экспрессии различных генов в разных локализациях. Точное определение профиля экспрессии исследуемых генов в первичной опухоли и метастазах позволит подобрать тактику лечения и схемы химиотерапии, которые с наибольшей вероятностью будут эффективны в каждом конкретном случае.

Ключевые слова: диссеминированный рак желудка, канцероматоз, гены семейства ABC-транспортеров, гены химиочувствительности, гетерогенность опухоли, экспрессия

Для цитирования: Цыганов М.М., Цыденова И.А., Маркович В.А. и др. Экспрессионная гетерогенность генов семейства ABC-транспортеров и генов химиочувствительности в опухоли желудка, канцероматозе и метастазах в лимфатические узлы. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(4):78–88. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-78-88

Expression heterogeneity of ABC-transporter family genes and chemosensitivity genes in gastric tumor, carcinomatosis and lymph node metastases

M.M. Tsyganov^{1,2}, I.A. Tsydenova¹, V.A. Markovich¹, M.K. Ibragimova¹⁻³, E.O. Rodionov¹, S.A. Tuzikov¹, N.V. Litvyakov¹

¹Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; 5 Cooperative Lane, Tomsk 634009, Russia;

²Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moskovsky Tract, Tomsk 634050, Russia;

³National Research Tomsk State University; 36 Lenina Prospekt, Tomsk 634050, Russia

Contacts: Matvey Mikhailovich Tsyganov TsyganovMM@yandex.ru

Introduction. Metastatic tumors (particularly gastric cancer) have been found to be characterized by heterogeneity between the primary tumor and metastases. This type of heterogeneity comes to the fore when treating primary-metastatic forms of tumor and is an important reason for the low effectiveness of their treatment. In this regard, comparative analysis of ABC-transporter gene expression and chemosensitivity genes will allow to characterize to a certain extent the resistance and sensitivity of primary tumor, carcinomatosis and metastases to therapy and provide the basis for personalized treatment approach.

Aim. To evaluate expression heterogeneity of ABC-transporter genes and chemosensitivity genes in gastric tumor, carcinomatosis and lymph node metastases.

Materials and methods. Overall 41 patients with disseminated gastric cancer stage IV with carcinomatosis of peritoneum were included in the investigation. All patients underwent surgery according to Roux palliative gastrectomy. After surgery patients underwent chemotherapy depending on indications. RNA was isolated using RNeasy Plus mini kit (Qiagen, Germany). The expression level of ABC transporter genes (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2*) and chemosensitivity genes (*BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2α*, *TUBβ3*, *TYMS*, *GSTP1*) was assessed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in primary tumor, carcinomatosis and lymph node metastases.

Results. The expression levels of the genes under study were shown to vary widely. For ABC transporter genes, *ABCG1* (3.1 ± 1.1 ; max 32.0), *ABCG2* (7.9 ± 2.3 ; max 54.1), *ABCC2* (9.6 ± 3.8 ; max 101.0) were the most expressed genes in gastric tumor tissue, carcinomatosis and lymph node metastasis, respectively. Hyperexpression among chemosensitivity genes at all three sites was characteristic only of *TOP2α* (17.2 ± 6.0 ; max. 161.9; 10.8 ± 4.1 ; max. 105.1; 35.3 ± 0.8 ; max. 439.6, respectively). We found that *TOP2α* and *BRCA1* gene expression levels were higher in lymph node metastasis compared with gastric tumor tissue and carcinomatosis (at $p = 0.005$ and $p = 0.001$). Whereas *ABCC1* gene expression was statistically significantly higher in carcinomatosis ($p = 0.03$).

Conclusion. Thus, a high level of expression heterogeneity is observed in gastric cancer, which affects the expression patterns of various genes in different localizations. The expression profile can be used to determine the level of heterogeneity and approach to personalized therapy tactics.

Keywords: disseminated gastric cancer, carcinomatosis, genes of the ABC transporter family, chemosensitivity genes, tumor heterogeneity, expression

For citation: Tsyganov M.M., Tsydenova I.A., Markovich V.A. et al. Expression heterogeneity of ABC-transporter family genes and chemosensitivity genes in gastric tumor, carcinomatosis and lymph node metastases. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(4):78–88. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-78-88

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ) — одно из самых распространенных злокачественных новообразований во всем мире. Эта патология является 3-й по значимости причиной смерти от рака [1]. Только в 2018 г. в мире было диагностировано около 1 млн случаев РЖ [1]. Рак желудка является одним из наиболее злокачественных типов рака в связи с быстрым прогрессированием, развитием отдаленных метастазов и устойчивостью к традиционной химиотерапии. Предпринимаются значительные усилия, чтобы понять механизм этой устойчивости и улучшить результаты лечения. Считается, что внутриопухолевая гетерогенность является основной причиной неэффективности терапии местно-распространенных операбельных опухолей [2], в том числе РЖ [3]. В то же время помимо широко известной внутриопухолевой гетерогенности для метастатических опу-

холей характерна гетерогенность между первичной опухолью и метастазами (лимфогенными и отдаленными) [4]. Ее необходимо учитывать при лечении первичных метастатических опухолей, поскольку она является важной причиной низкой результативности терапии [5]. Это связано с тем, что даже при индивидуальном подходе довольно сложно подобрать эффективные схемы лечения в случаях как первичной опухоли, так и метастазов. В данном отношении первично-метастатический РЖ является особенно сложной локализацией, поскольку помимо отдаленных метастазов и метастазов в регионарные лимфатические узлы (ЛУ) он может давать метастазы в брюшину или канцероматоз.

Исследование X. De Aretxabala и соавт., выполненное в 1989 г., показало, что уровень хромосомной гетерогенности между первичной опухолью желудка

и метастазами в ЛУ составляет 33 % [6]. М. Amato и соавт. [7] изучали гетерогенность экспрессии рецептора эпидермального фактора роста 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) (важного маркера для назначения герцептина больным РЖ) между первичной опухолью и отдаленными метастазами и обнаружили, что у 2 (33 %) из 6 пациентов с HER2-положительной первичной опухолью метастазы были HER2-негативными и у 6 (75 %) из 8 пациентов с HER2-положительными метастазами первичная опухоль была HER2-негативна. Эти результаты ставят под сомнение целесообразность назначения трастузумаба пациентам только на основе HER2-статуса первичной опухоли.

В еще одном исследовании различия в иммуногистохимической экспрессии HER2 между первичными и парными метастатическими ЛУ наблюдались в 1 % случаев [8]. Были изучены амплификации генов *EGFR*, *HER2*, *FGFR2*, *MET*, *PIK3CA*, *KRAS*, *MYC* и *CCNE1* в первичной опухоли желудка и метастазах в ЛУ и продемонстрировано, что более чем у 68 % пациентов статус амплификаций генов в первичной опухоли и лимфогенных метастазах не совпадает [9]. Экспрессия *PD-L1* и мутационная нагрузка показали значительную гетерогенность между исходными первичными опухолями и метастазами (дискордантность 39 и 31 % соответственно). При этом анализ связи *PD-L1* и уровня мутационной нагрузки с показателями выживаемости без прогрессирования не выявил статистически значимых различий, также не была установлена связь с ответом на действие ингибиторов иммунных контрольных точек [10].

Анализ литературы показал, что в основном изучается гетерогенность между первичной опухолью желудка и сайтами прогрессии в плане маркеров чувствительности к таргетной терапии или иммунотерапии. Практически отсутствуют данные о гетерогенности маркеров чувствительности/резистентности к конвенциональной терапии, несмотря на ее широкое использование для лечения РЖ. В настоящей работе изучается гетерогенность экспрессии генов семейства ABC-транспортеров и генов химиочувствительности (*RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2α*, *TYMS*, *TUBβ3*, *GSTP1*, *BRCA1*) в первичной опухоли желудка, лимфогенных, отдаленных метастазах и канцероматозе у одних и тех же пациентов с первично-метастатическим раком.

ABC-транспортеры представляют собой семейство трансмембранных белков, которые играют большую роль в переносе различных экзогенных и эндогенных веществ через мембраны против градиента концентрации посредством гидролиза аденозинтрифосфата (АТФ) [11]. Установлено, что ABC-транспортеры ответственны за формирование химиорезистентности при различных онкологических заболеваниях [12–14]. В то же время низкая экспрессия в опухоли желудка таких генов, как *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCC7*, *ABCC8*, *ABCC9* и *ABCC10*, связана с высокими показателями общей

выживаемости (log rank test $p \leq 0,05$) [15]. В исследовании Т.М. Агаújo и соавт. продемонстрировано, что амплификация гена *ABCA13* увеличивает риск метастазирования РЖ в ЛУ [16]. Экспрессия генов эксцизионной (*ERCC1*), гомологичной репарации (*BRCA1*), тимидилат-синтазы (*TYMS*), рибонуклеотидредуктазы М1 (*RRM1*), β-тубулина III (*TUBβ3*) и топоизомеразы IIα (*TOP2α*), связанная с чувствительностью к конвенциональным препаратам [17], различается в опухолевых клетках, в том числе и при РЖ, и связана с клинико-патологическими характеристиками пациентов [18–20].

Таким образом, изучение молекулярно-генетических особенностей РЖ имеет непосредственное отношение к клинической практике, поскольку, помимо дальнейшего выяснения патогенеза, создает основу для определения прогностических и диагностических маркеров, поиска новых мишеней для терапевтических препаратов и является основой для подбора персонализированного лечения.

Цель исследования — анализ межсайтовой гетерогенности экспрессии генов семейства ABC-транспортеров и генов химиочувствительности у пациентов с диссеминированным РЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследование был включен 41 пациент с диссеминированным РЖ IV стадии (T3–4N0–3M1) с канцероматозом брюшины: 22 (54 %) пациента младше 50 лет и 19 (46 %) — старше 50 лет. В большинстве случаев больные были мужского пола (54 %), реже — женского (46 %). У всех пациентов была аденокарцинома с низкой и/или умеренной степенью дифференцировки. Больные находились на лечении в клинике Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук с 2017 по 2020 г. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (исправленной в 2013 г.) [21].

Всем пациентам выполнена операция в объеме паллиативной гастрэктомии по Ру. После хирургического вмешательства в зависимости от показаний проводилась химиотерапия по схемам GemCap + C (интраперитонеально) (гемзар в дозе 800 мг/м² внутривенно в 1-й и 8-й дни; цисплатин в дозе 50 мг интраперитонеально на водной нагрузке в 4-й день; капецитабин в дозе 1500 мг/м² в течение 14 дней, интервал 21 день), FOLFIRI + C (интраперитонеально) (ириротекан в дозе 170 мг/м² — внутривенная инфузия 90 мин; лейковорин в дозе 400 мг/м² — внутривенная инфузия 2 ч в 1-й день; 5-фторурацил в дозе 400 мг/м² внутривенно струйно, затем в дозе 2400 мг/м² — внутривенная инфузия 46 ч; цисплатин в дозе 50 мг интраперитонеально на водной нагрузке во 2-й день, интервал 21 день); XELIRI + C (интраперитонеально) (ириротекан в дозе 230 мг/м² — внутривенная инфузия 60–90 мин

в 1-й день; цисплатин в дозе 50 мг интраперитонеально на водной нагрузке во 2-й день; капецитабин в дозе 1800 мг/м² в день в течение 14 дней, интервал 21 день); РС (паклитаксел в дозе 135 мг/м² внутривенно в 1-й день; цисплатин интраперитонеально в 4-й день; паклитаксел интраперитонеально в 8-й день, интервал 21 день). Химиотерапия проводилась при удовлетворительных общем состоянии и лабораторных показателях пациентов без отклонений от нормы.

У 1 пациента наблюдалась опухоль Т3, у остальных — Т4. Кроме того, в 3 (7 %) из 41 случаев отсутствовали метастазы в регионарных ЛУ, у 5 (12 %) наблюдались метастазы в 1–2 ЛУ, у 6 (15 %) — в 3–6 (N1 и N2 соответственно). У большинства пациентов (в 15 (37 %) случаях) выявлено поражение ≥ 7 регионарных ЛУ.

В качестве исследуемых образцов использовали операционный материал — опухолевую ткань желудка (забор производился к центру опухоли полнослойно), неизмененную ткань желудка (забор производился на максимальном отдалении от края опухоли полнослойно), ткань канцероматоза, метастатический материал в ЛУ. Материал забирали в объеме ~30–60 мм³ и помещали в раствор RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, США). После 24-часовой инкубации при +4 °C образцы биоматериала сохраняли при температуре –80 °C для дальнейшего выделения РНК.

Выделение РНК. РНК была выделена с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Германия). Концентрацию и чистоту выделения РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США). Концентрация РНК составила от 50 до 200 нг/мкл; $A_{260}/A_{280} = 1,85–2,05$; $A_{260}/A_{230} = 1,80–2,08$. Целостность РНК определяли с помощью капиллярного электрофореза на приборе Tape Station (Agilent Technologies, США). Число целостности РНК (RNA integrity number, RIN) составило 6,6–9,2. Для получения комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора RevertAid™ (Thermo Fisher Scientific, США) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией производителя.

Количественная полимеразная цепная реакция. Уровень экспрессии 6 генов семейства ABC-транспортеров (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2*) и 8 генов химиочувствительности (*BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2α*, *TUBβ3*, *TYMS*, *GSTP1*) определяли с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени (по технологии TaqMan) на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Австралия). Полимеразную цепную реакцию проводили в 3 репликах. Объем реакционной смеси составил 15 мкл. Она включала 250 мкМ дезоксинуклеотидов (dNTPs) («СибЭнзайм», Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2,5 мМ MgCl₂, 19SE-буфер (67 мМ Tris — HCl (pH 8,8 при 25 °C), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20), 2,5 ед HotStart Taq polymerase

(«СибЭнзайм», Россия) и 50 нг кДНК. Программа амплификации включала 1 цикл для полной денатурации матрицы и праймеров (10 мин при 94 °C) и 40 циклов: 1-й шаг — денатурация матрицы (10 с при 94 °C); 2-й шаг — отжиг праймеров (20 с при 60 °C). Два референсных гена — *GAPDH* (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase) и *ACTB* (actin beta) — были использованы в качестве эталонных генов. Уровень экспрессии генов был нормализован по отношению к экспрессии генов-рефери и экспрессии в нормальной ткани желудка каждого пациента по методу Pfaffl [22] и измерялся в условных единицах. Для определения отношения экспрессии между образцом и калибратором использовалась следующая формула:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct_{\text{target(calibrator-test)}}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref(calibrator-test)}}}},$$

где E — эффективность реакции; Ct — пороговый цикл генов-мишеней (target) и гена-рефери (ref); $\Delta Ct_{\text{target(calibrator-test)}} = Ct_{\text{гена-мишени в калибраторе}} - Ct_{\text{гена-мишени в опытном образце}}$; $\Delta Ct_{\text{ref(calibrator-test)}} = Ct_{\text{гена-рефери в калибраторе}} - Ct_{\text{гена-рефери в опытном образце}}$.

Праймеры и зонды представлены в табл. 1.

Статистические методы. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое и среднюю квадратичную ошибку. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали U-критерий Манна–Уитни. Различия между исследуемыми группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящем исследовании проведен анализ экспрессии 6 генов семейства ABC-транспортеров и 8 генов химиочувствительности в 3 сайтах по каждому пациенту. Исследовали опухолевую ткань желудка, канцероматоз брюшины, метастаз в ЛУ. В табл. 2 представлены параметры экспрессии исследуемых генов.

Согласно данным, представленным в табл. 2, уровень экспрессии исследуемых генов сильно варьировал. Из генов ABC-транспортеров наибольшее значение экспрессии для опухолевой ткани желудка, канцероматоза и метастаза в ЛУ выявлено для *ABCG1* ($3,1 \pm 1,1$; max 32,0), *ABCG2* ($7,9 \pm 2,3$; max 54,1) и *ABCC2* ($9,6 \pm 3,8$; max 100,9) соответственно. Среди генов химиочувствительности гиперэкспрессия в этих тканях была характерна только для *TOP2* ($17,2 \pm 5,9$; max 161,9; $10,8 \pm 4,1$; max 105,1; $35,3 \pm 0,8$; max 439,6 соответственно).

Выявлен высокий уровень экспрессионной гетерогенности у пациентов с РЖ (рис. 1, 2). Сравнение экспрессии генов семейства ABC-транспортеров продемонстрировало, что только ген *ABCC1* показал

Таблица 1. Последовательность праймеров и проб исследованных генов

Table 1. Sequence of primers and samples of the genes studied

Ген Gene	Ампликон, п. н. Amplicon, bp	Последовательность Sequence
GAPDH	124	F 5'-gccagccgagccacatc-3'
		R 5'-ggcaacaatatccactttaccaga-3'
		Probe 5'-cgccaatacagaccaaatccg-3'
ACTB	73	F 5'-gagaagatgacccagatcatgtt-3'
		R 5'-atagcacagcctggatagcaa-3'
		Probe 5'-agaccttcaacaccccagccat-3'
ABCB1	93	F 5'-gattgacagctacagcacgg-3'
		R 5'-ggtcgggtgggatagtga-3'
		Probe 5'-tgccgaacacattggaaggaaa-3'
ABCC1	87	F 5'-agggtggctgcggaaag-3'
		R 5'-cggagcccttgatagcca-3'
		Probe 5'-tggtgagatggacaaagtggag-3'
ABCC2	85	F 5'-cctgtcggctctgggaa-3'
		R 5'-tgcccttgatggtgatgtg-3'
		Probe 5'-atgctgggagaaatggaaaatgt-3'
ABCC5	76	F 5'-caagagggtaaactggttga-3'
		R 5'-ctaaaaatggctgaaatgagagag-3'
		Probe 5'-ggcagtggtgggaagtggaaa-3'
ABCG1	7	F 5'-cctactacctggccaagaccat-3'
		R 5'-agtacacgatgctgcagtaggc-3'
		Probe 5'-acgtgccctttcatgatcatgttccag-3'
ABCG2	97	F 5'-aaaggatgtctaagcaggga-3'
		R 5'-tgaggccaataaggtgagg-3'
		Probe 5'-tcgaggctgatgaatggagaag-3'
RRM1	94	F 5'-actaagcaccctgactatgctatcc-3'
		R 5'-cttccatcacatcactgaacacttt-3'
		Probe 5'-cagccaggatcgctgtcttaactgca-3'
ERCC1	121	F 5'-ggcgacgtaattcccgaacta-3'
		R 5'-agtttctccccaggctctgc-3'
		Probe 5'-accacaacctgcaccagactacatcca-3'
BRCA1	107	F 5'-acagctgtgtgtgctctctgtg-3'
		R 5'-cattgtcctctgtccaggcatc-3'
		Probe 5'-catcattacccttggcacagggtg-3'

TOP1	97	F 5'-ggcgagtgatctaaggataatgaa-3'
		R 5'-tggatatcttaaagggtacagcgaa-3'
		Probe 5'-accattttcccatcatcctttgttctgagc-3'
TOP2α	75	F 5'-agtcgcttccagggttcttgag-3'
		R 5'-tttcatttacaggctgcaatgg-3'
		Probe 5'-cccttcacgaccgtcacatgga-3'
TUBβ3	71	F 5'-gggccaagtctctgggaagtc-3'
		R 5'-cgagtcgccacgtagtgtg-3'
		Probe 5'-atgagcatggcatcgaccacagc-3'
TYMS	91	F 5'-tctggaagggtgttttggga-3'
		R 5'-tcccagattttcactccctt-3'
		Probe 5'-tctttagcatttggatcccttga-3'
GSTP1	84	F 5'-ctggtggacatggatgaatgac-3'
		R 5'-cttgcccgcctcatagtgtg-3'
		Probe 5'-aggacctccgctgcaatacatctc-3'

Примечание. Все пробы — FAM → bHQ1; F — прямой праймер; R — обратный праймер; probe — зонд.

Note. All samples — FAM → BHQ1; F — direct primer; R — reverse primer.

статистически значимую разницу в уровне экспрессии между исследуемыми сайтами по каждому пациенту (см. рис. 1). Экспрессия гена *ABCC1* была статистически значимо выше при канцероматозе брюшины ($p = 0,03$).

Установлено, что уровень экспрессии гена *ABCC1* в канцероматозе ($1,9 \pm 0,5$) статистически значимо выше, чем в метастазе в ЛУ ($1,2 \pm 0,2$) ($p = 0,03$). Также на уровне выраженной тенденции экспрессия *ABCC1* была больше в канцероматозе по сравнению с первичным опухолевым узлом ($p = 0,07$) (см. рис. 1б).

Выявлено, что уровень экспрессии гена *TOP2α* выше в метастазе в ЛУ ($35,3 \pm 0,8$) по сравнению с канцероматозом ($10,8 \pm 4,1$) ($p = 0,03$) (см. рис. 2а). Показаны статистически значимые различия в экспрессии исследуемого гена между опухолевой тканью ($17,2 \pm 6,0$) и канцероматозом ($10,8 \pm 4,1$) ($p = 0,01$). Аналогичные результаты получены для *BRCA1* (см. рис. 2з). Достоверные различия в уровне экспрессии наблюдаются между опухолевой тканью и канцероматозом ($p = 0,005$) и метастазом в ЛУ и канцероматозом ($p = 0,01$). Несмотря на большой разброс в уровне экспрессии исследуемых генов, у некоторых пациентов отмечаются высокие показатели экспрессии во всех образцах, что может свидетельствовать о наличии общих механизмов чувствительности и/или резистентности.

Таблица 2. Параметры экспрессии исследуемых генов в разных образцах

Table 2. Expression parameters of the studied genes in different samples

Ген Gene	Экспрессия генов в опухоли желудка (у. е.) Gene expression in gastric tumor			Экспрессия генов в канцероматозе (у. е.) Gene expression in carcinomatosis			Экспрессия генов в метастазе в лимфатический узел (у. е.) Gene expression in metastasis to a lymph node		
	Mean $\pm$ SE	Median (IR 25–75 %)	Max	Mean $\pm$ SE	Median (IR 25–75 %)	Max	Mean $\pm$ SE	Median (IR 25–75 %)	Max
<i>ABCB1</i>	1,0 $\pm$ 0,2	0,7 (0–1,4)	4,0	0,9 $\pm$ 0,2	0,3 (0–1,4)	4,7	1,4 $\pm$ 0,51	0,4 (0–1,51)	12,6
<i>ABCC1</i>	1,1 $\pm$ 0,2	0,8 (0,3–1,2)	5,6	1,9 $\pm$ 0,5	0,9 (0,3–2,4)	13,5	1,2 $\pm$ 0,23	0,9 (0,23–1,41)	5,0
<i>ABCC2</i>	1,8 $\pm$ 0,8	0,1 (0–1,6)	25,5	5,5 $\pm$ 2,5	0,12 (0–1,3)	57,9	1,8 $\pm$ 0,71	0,1 (0–1,71)	17,3
<i>ABCC5</i>	2,12 $\pm$ 0,5	0,4 (0,1–2,7)	12,4	3,6 $\pm$ 1,0	0,6 (0,1–2,9)	21,8	2,2 $\pm$ 0,79	0,5 (0,05–2,52)	24,2
<i>ABCG1</i>	3,1 $\pm$ 1,1	0,5 (0,1–2,1)	32,0	2,9 $\pm$ 0,9	0,45 (0,2–2,4)	24,8	2,3 $\pm$ 0,68	0,7 (0,1–2,25)	15,5
<i>ABCG2</i>	2,8 $\pm$ 0,6	1,5 (0,6–4,3)	19,9	7,9 $\pm$ 2,23	1,9 (0,6–10,01)	54,1	9,6 $\pm$ 3,77	2,1 (0,93–6,5)	101,0
<i>RRM1</i>	3,2 $\pm$ 1,2	1,1 (0,7–2,6)	45,56	1,7 $\pm$ 0,3	1,1 (0,7–2,2)	9,3	2,5 $\pm$ 0,8	1,2 (0,6–3,2)	24,9
<i>ERCC1</i>	1,2 $\pm$ 0,4	0,7 (0–1,3)	13,6	0,9 $\pm$ 0,3	0,4 (0–1,0)	6,9	0,8 $\pm$ 0,3	0,2 (0–1,2)	5,6
<i>TOP1</i>	2,7 $\pm$ 0,8	0,6 (0–3,2)	23,4	2,34 $\pm$ 0,6	0,7 (0,15–3,7)	17,5	9,4 $\pm$ 7,1	1,1 (0,1–4,0)	234,8
<i>TOP2a</i>	17,2 $\pm$ 6,0	2,6 (0,7–9,3)	161,9	10,8 $\pm$ 4,1	2,4 (0,4–9,6)	105,1	35,3 $\pm$ 0,8	4,7 (0,9–16,1)	439,6
<i>TYMS</i>	5,3 $\pm$ 1,5	1,7 (0,5–5,9)	49,9	2,5 $\pm$ 0,7	1,2 (0–2,5)	21,3	3,8 $\pm$ 16,0	1,7 (0,29–5,6)	15,9
<i>TUBB3</i>	5,7 $\pm$ 1,5	2,0 (0,9–3,9)	37,8	9,2 $\pm$ 6,2	1,8 (0,4–3,9)	211,6	7,4 $\pm$ 2,5	2,3 (0,87–8,5)	77,7
<i>GSTP1</i>	3,8 $\pm$ 1,2	0,6 (0,2–3,4)	33,7	3,78 $\pm$ 1,9	1,2 (0,3–2,56)	66,8	2,7 $\pm$ 0,8	0,9 (0,31–3,1)	24,3
<i>BRCA1</i>	2,5 $\pm$ 0,4	2,2 (0,7–3,4)	12,7	2,7 $\pm$ 1,0	0,6 (0,1–1,5)	32,2	4,4 $\pm$ 2,3	1,6 (0,7–3,2)	77,1

Примечание. Mean $\pm$ SE – среднее значение экспрессии $\pm$ ошибка средней; Median – медиана; IR – межквартильный диапазон; max – максимальное значение экспрессии.

Note. Mean $\pm$ SE – mean expression value $\pm$ standard error; IR – interquartile range; max – maximum expression value.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время хорошо известно, что при различных локализациях внутриопухолевая гетерогенность влияет на характер экспрессии генов, и профиль экспрессии может быть использован для определения уровня гетерогенности [23]. В недавней работе было показано, что при иерархической кластеризации с использованием профиля экспрессии всех генов (gene expression profiling, GEP) большинство (61/71; 86 %) образцов опухолей были сгруппированы по пациентам, что указывает на большую гетерогенность между пациентами, нежели на внутриопухолевую гетерогенность [24]. Тем не менее внутриопухолевая гетерогенность является особенностью РЖ. В частности, независимо от расположения опухолевых клеток желудка, отсутствие экспрессии гена *ARID1A* или его низкая экспрессия наблюдаются только в 14,7 % случаев РЖ [25].

При этом согласно полученным нами данным продемонстрирована внутри- и межопухолевая гетерогенность при РЖ в уровне экспрессии генов семейства ABC-транспортёров и генов химиочувствительности. Несмотря на изученность ABC-генов и формирования лекарственной резистентности, вопрос об их гетерогенности при РЖ не решен. Была выявлена разница в экспрессии *ABCC1* и *TOP2a* в зависимости от локализации. Оба гена связаны с чувствительностью опухоли к доксорубину. Если высокий уровень экспрессии *ABCC1* ассоциирован с резистентностью опухоли к данному препарату [26], то гиперэкспрессия *TOP2a* при лечении больных доксорубином сопряжена с более вероятным ответом на лечение ($p = 0,002$) по сравнению с группой пациентов, получавших доцетаксел [26]. Это подтверждается рядом других исследований, в ходе которых установлено, что некоторые ABC-гены играют роль в формировании химиорезистентности у больных РЖ. Были продемонстрированы низкие показатели выживаемости у пациентов, у которых наблюдалась гиперэкспрессия *ABCB1* ($p = 0,030$) [27]. Ген *ABCC4* высоко экспрессируется в нескольких типах клеток РЖ [28].

Напротив, в нормальных клетках слизистой оболочки желудка экспрессия *ABCC4* очень низкая или не определяется. При этом ингибирование экспрессии гена *ABCC4* может подавлять пролиферацию клеток РЖ с множественной лекарственной устойчивостью и повышать чувствительность клеток к химиотерапевтическим препаратам.

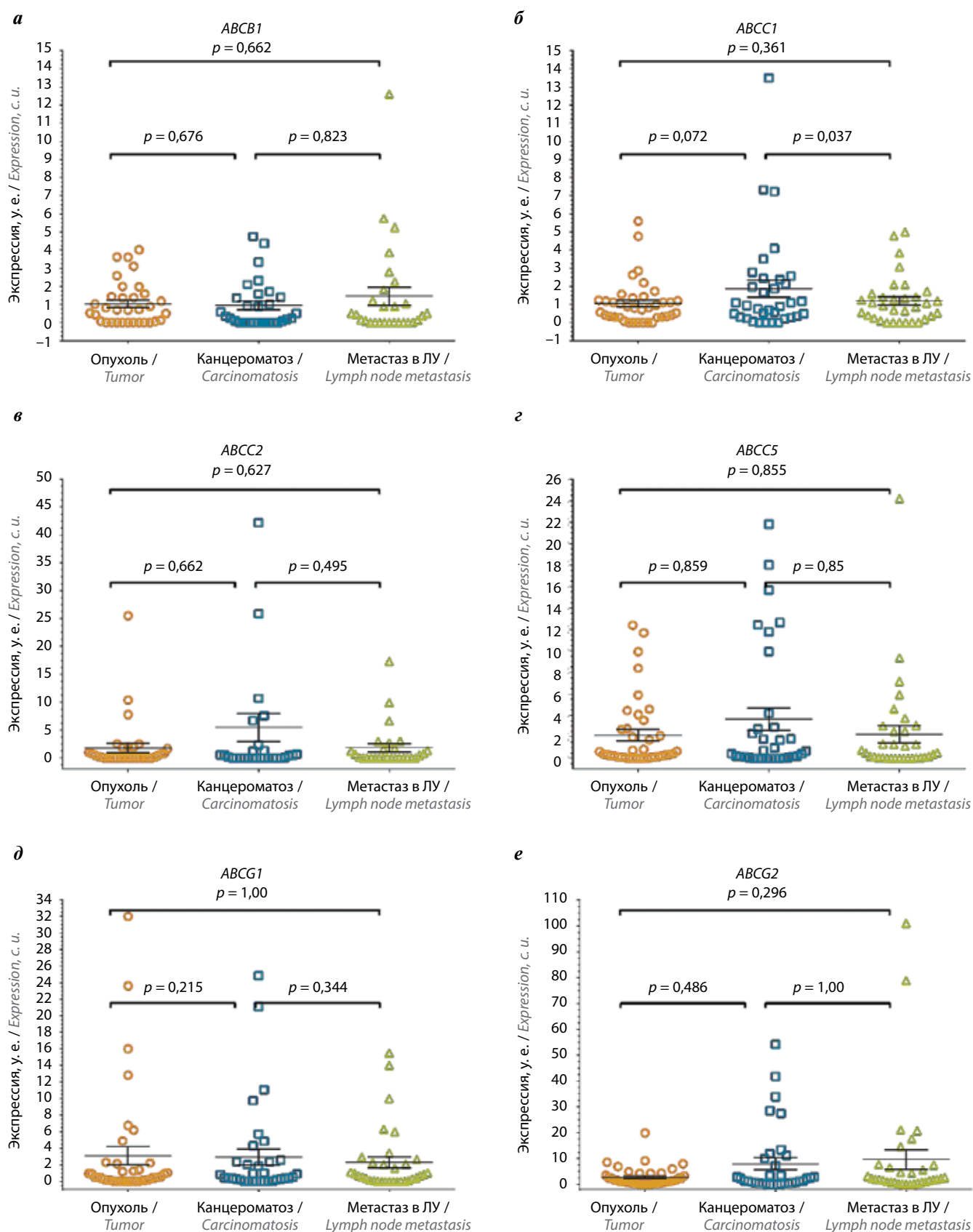


Рис. 1. Сравнение уровня экспрессии исследуемых генов семейства ABC-транспортёров в разных сайтах. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали U-критерий Манна–Уитни. ЛУ – лимфатический узел

Fig. 1. Comparison of the expression level of the studied ABC-transporter family genes in different studied sites. Mann–Whitney U test was used to test the hypothesis about the significance of differences between the study groups

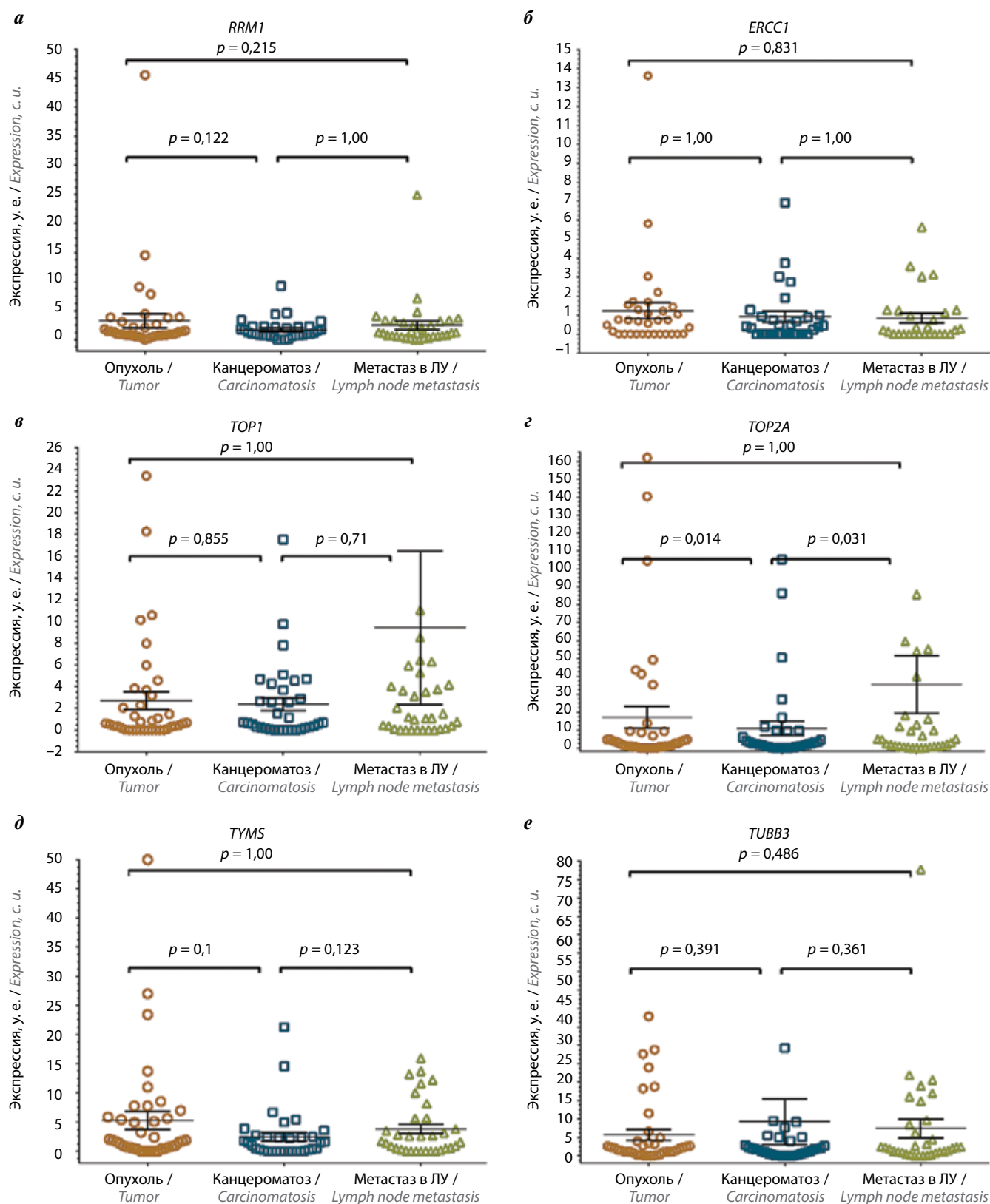


Рис. 2. Сравнение уровня экспрессии генов химиочувствительности *RRM1* (а), *ERCC1* (б), *TOP1* (в), *TOP2A* (г); *TYMS* (д), *TUBB3* (е), *GSTP1* (ж), *BRCA1* (з) в разных сайтах. Для более удобной визуализации вариации уровня экспрессии исследуемых генов на рис. в (ген *TOP1*) отсутствует значение экспрессии 234,8; на рис. г (ген *TOP2A*) – экспрессии 314,7 и 439,6; на рис. е (ген *TUBB3*) – экспрессии 211,6;

Fig. 2. Comparison of the expression level of the studied chemosensitivity *RRM1* (a), *ERCC1* (b), *TOP1* (v), *TOP2A* (g); *TYMS* (d), *TUBB3* (e), *GSTP1* (ж), *BRCA1* (з) genes in different studied sites. The expression level was measured in arbitrary units (c. u.); for more convenient visualization of the variation in the level of expression of the studied genes, in fig. в (*TOP1* gene) there is no expression value of 234.8; Fig. г (*TOP2A* gene) – expression value 314.7 and 439.6; Fig. е (*TUBB3* gene) – expression value 211.6;

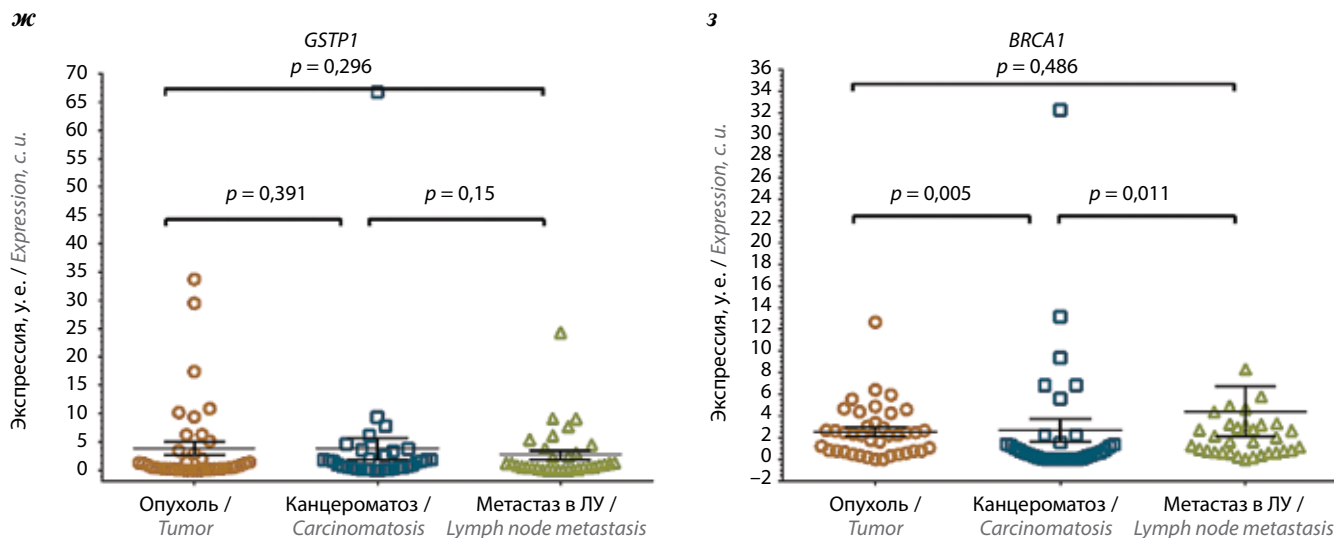


Рис. 2. Окончание: на рис. 3 (ген *BRCA1*) — экспрессии 77,1. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали U-критерий Манна–Уитни. ЛУ — лимфатический узел

Fig. 2. The end: fig. 3 (*BRCA1* gene) — expression value 77.1; Mann–Whitney U test was used to test the hypothesis about the significance of differences between the study groups

Аналогичное исследование было проведено в отношении гена *ABCB1* [29]. Его продукт представляет собой трансмембранный переносчик, который участвует в формировании механизма множественной лекарственной устойчивости в опухолевых клетках за счет активного выброса лекарственных средств. Нокаунт гена *ABCB1* повышает накопление адриамицина (доксорубина) в этих клетках и соответственно увеличивает чувствительность к лечению.

Что касается генов химиочувствительности, то в недавнем исследовании были проанализированы 12 генов, влияющих на эффективность лечения РЖ. Для генов химиочувствительности был показан высокий уровень экспрессии в опухолевой ткани желудка. Наибольший уровень экспрессии выявлен для гена *TOP2α*. Для *BRCA1*, *TUBβ3* и *RRM1* также были получены статистически значимые результаты ($p < 0,05$). Проведение анализа по парным корреляциям, основанного на различиях экспрессии между опухолевой и соседними тканями, позволило выявить метаболический кластер таких генов, как *BRCA1*, *TYMS*, *TOP2α* и *STMN1* [30]. В еще одном исследовании рассматривалась связь между клинико-патологическими характеристиками и экспрессией *ERCC1*, *BRCA1*, *RRM1* и *TOP2α*. Показано, что экспрессия *TYMS* и *TUBβ3* коррелирует с возрастом, при этом у пациентов старше 57 лет наблюдается более низкая экспрессия *TYMS* ($p = 0,044$) и *TUBβ3* ($p = 0,024$). Кроме того, более низкая экспрессия *TUBβ3* выявлена у пациентов женского пола ($p = 0,026$) и больных с наличием в семейном анамнезе РЖ ($p = 0,025$). Для остальных исследуемых генов не было обнаружено корреляций между клинико-патологическими характеристиками и экспрессией [31]. В недавнем исследовании оценка экспрессии генов химиочувствительности в ткани первичного РЖ пока-

зала, что высокая экспрессия *TOP2α* связана с риском развития гематогенного метастазирования, а также является хорошим прогностическим фактором для рецидивов ($p < 0,0001$) [32].

Наши предыдущие проспективные исследования рака молочной железы и легкого показали возможность применения оценки экспрессии генов ABC-транспортеров и генов химиочувствительности для персонализированного назначения схемы химиотерапии [33–35]. Согласно полученным данным снижение экспрессии ABC-генов в процессе лечения сопряжено с эффективностью химиотерапии и достижением более высоких показателей безметастатической выживаемости. Однако, к сожалению, при РЖ проводятся лишь ассоциативные исследования, проспективные работы в этой области не выполняются. Также показано, что низкая экспрессия *BRCA1* связана с высокой частотой ответа опухоли на химиотерапию таксанами (67 % (6/9) против 32 % (17/54); $p = 0,04$). При этом низкий уровень *TUBβ3* тоже коррелировал с повышенной вероятностью ответа опухоли (43 % (21/49) против 8 % (1/13); $p = 0,02$) и увеличением показателей общей выживаемости (10,5 мес против 7,1 мес; $p = 0,02$) [36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, природа РЖ крайне неоднородная. Для метастатических форм злокачественных новообразований характерна гетерогенность между первичной опухолью и метастазами (лимфогенными и/или отдаленными). Такая разновидность гетерогенности является важной причиной низкой эффективности терапии, поэтому ее необходимо учитывать при лечении первично-метастатического РЖ. Это обуславливает актуальность дальнейших исследований в данном направлении.

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

1. Smyth E.C., Nilsson M., Grabsch H.I. et al. Gastric cancer. *Lancet* 2020;396(10251):635–48. DOI: 10.1016/s0140-6736(20)31288-5
2. Bhatia S., Frangioni J.V., Hoffman R.M. et al. The challenges posed by cancer heterogeneity. *Nat Biotechnol* 2012;30(7):604–10. DOI: 10.1038/nbt.2294
3. Pectasides E., Stachler M.D., Derks S. et al. Genomic heterogeneity as a barrier to precision medicine in gastroesophageal adenocarcinoma. *Cancer Discov* 2018;8(1):37–48. DOI: 10.1158/2159-8290.cd-17-0395
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. Marusyk A., Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 2010;1805(1):105–17. DOI: 10.1016/j.bbcan.2009.11.002
6. De Aretxabala X., Yonemura Y., Sugiyama K. et al. Gastric cancer heterogeneity. *Cancer* 1989;63(4):791–8. DOI: 10.1002/1097-0142(19890215)63:4<791::aid-cnrcr2820630431>3.0.co;2-w
7. Amato M., Perrone G., Righi D. et al. HER2 status in gastric cancer: comparison between primary and distant metastatic disease. *Pathol Oncol Res* 2017;23(1):55–61. DOI: 10.1007/s12253-016-0082-5
8. Cho E.Y., Park K., Do I. et al. Heterogeneity of ERBB2 in gastric carcinomas: a study of tissue microarray and matched primary and metastatic carcinomas. *Mod Pathol* 2013;26(5):677–84. DOI: 10.1038/modpathol.2012.205
9. Silva A.N., Coffa J., Menon V. et al. Frequent coamplification of receptor tyrosine kinase and downstream signaling genes in Japanese primary gastric cancer and conversion in matched lymph node metastasis. *Ann Surg* 2018;267(1):114–21. DOI: 10.1097/SLA.0000000000002042
10. Zhou K.I., Peterson B., Serritella A. et al. Spatial and temporal heterogeneity of PD-L1 expression and tumor mutational burden in gastroesophageal adenocarcinoma at baseline diagnosis and after chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2020;26(24):6453–63. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2085
11. Robey R.W., Pluchino K.M., Hall M.D. et al. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer* 2018;18(7):452–64. DOI: 10.1038/s41568-018-0005-8
12. Liu X. ABC family transporters, in drug transporters in drug disposition, effects and toxicity. *Adv Exp Med Biol* 2019;1141(1):13–100. DOI: 10.1007/978-981-13-7647-4_5
13. Amawi H., Sim H.-M., Tiwari A.K. et al. ABC family transporters, in drug transporters in drug disposition, effects and toxicity. *Adv Exp Med Biol* 2019;1141(1):549–80. DOI: 10.1007/978-981-13-7647-4_5
14. Tsyganov M.M., Freidin M.B., Ibragimova M.K. et al. Genetic variability in the regulation of the expression cluster of *MDR* genes in patients with breast cancer. *Cancer Chem Pharmacol* 2017;80(2):251–60. DOI: 10.1007/s00280-017-3354-1
15. Mao X., He Z., Zhou F. et al. Prognostic significance and molecular mechanisms of adenosine triphosphate-binding cassette subfamily C members in gastric cancer. *Medicine (Baltimore)* 2019;98(50):1–12. DOI: 10.1097/MD.00000000000018347
16. Araújo T., Seabra A., Lima E. et al. Recurrent amplification of *RTEL1* and *ABCA13* and its synergistic effect associated with clinicopathological data of gastric adenocarcinoma. *Mol Cytogenet* 2016;9(1):1–7. DOI: 10.1186/s13039-016-0260-x
17. Tsyganov M., Rodionov E., Miller S. et al. Substantiation of expressive markers use to personalize lung cancer chemotherapy. *Antibiot Khimioter* 2015;60(9–10):38–45.
18. Wei K.-K., Jiang L., Wei Y.-Y. et al. The prognostic value of *ERCC1* expression in gastric cancer patients treated with platinum-based chemotherapy: a meta-analysis. *Tumor Biol* 2014;35(9):8721–31. DOI: 10.1007/s13277-014-2128-1
19. Chen W., Wang J., Li X. et al. Prognostic significance of *BRCA1* expression in gastric cancer. *Med Oncol* 2013;30(1):1–6. DOI: 10.1007/s12032-012-0423-5
20. Huang J., Hu H., Xie Y. et al. Effect of *TUBB3*, *TS* and *ERCC1* mRNA expression on chemoresponse and clinical outcome of advanced gastric cancer by multiplex branched-DNA liquid chip technology. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2013;38(6):582–9. (In Chinese). DOI: 10.3969/j.issn.1672-7347.2013.06.006
21. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania. *Cancer* 2004;10(4):273–94. DOI: 10.1002/cncr.20298
22. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45
23. Sung J.-Y., Shin H.-T., Sohn K.-A. et al. Assessment of intratumoral heterogeneity with mutations and gene expression profiles. *PLoS One* 2019;14(7):1–15. DOI: 10.1371/journal.pone.0219682
24. Gyanchandani R., Lin Y., Lin H.-M. et al. Intratumor heterogeneity affects gene expression profile test prognostic risk stratification in early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22(21):5362–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2889
25. Tober J.M., Halske C., Behrens H.-M. et al. Intratumoral heterogeneity and loss of *ARID1A* expression in gastric cancer correlates with increased PD-L1 expression in Western patients. *Hum Pathol* 2019;94(1):98–109. DOI: 10.1016/j.humpath.2019.09.016
26. Durbecq V., Paesmans M., Cardoso F. et al. Topoisomerase- $\text{II}\alpha$ expression as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel. *Mol Cancer Ther* 2004;3(10):1207–14. DOI: 10.1158/1535-7163.1207.3.10
27. De Oliveira J., Felipe A.V., Neto R.A. et al. Association between *ABCB1* immunohistochemical expression and overall survival in gastric cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(16):6935–8. DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.16.6935
28. Zhang G., Wang Z., Qian F. et al. Silencing of the *ABCC4* gene by RNA interference reverses multidrug resistance in human gastric cancer. *Oncol Rep* 2015;33(3):1147–54. DOI: 10.3892/or.2014.3702
29. Zhu C.-Y., Lv Y.-P., Yan D.-F. et al. Knockdown of *MDR1* increases the sensitivity to adriamycin in drug resistant gastric cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(11):6757–60. DOI: 10.7314/apjcp.2013.14.11.6757
30. Li S.-C., Ma R., Wu J.-Z. et al. Delineation of gastric cancer subtypes by co-regulated expression of receptor tyrosine kinases and chemosensitivity genes. *Am J Transl Res* 2015;7(8):1429–39.
31. Cao Y., Zhang G., Wang P. et al. Clinical significance of *UGT1A1* polymorphism and expression of *ERCC1*, *BRCA1*, *TYMS*, *RRM1*, *TUBB3*, *STMN1* and *TOP2A* in gastric cancer. *BMC Gastroenterol* 2017;17(1):1–13. DOI: 10.1186/s12876-016-0561-x
32. Terashima M., Ichikawa W., Ochiai A. et al. *TOP2A*, *GGH*, and *PECAM1* are associated with hematogenous, lymph node, and peritoneal recurrence in stage II/III gastric cancer patients enrolled in the ACTS-GC study. *Oncotarget* 2017;8(34):57574–82. DOI: 10.18632/oncotarget.15895
33. Tsyganov M.M., Rodionov E.O., Ibragimova M.K. et al. Personalized prescription of chemotherapy based on assessment of mRNA expression of *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2 α* , *TUBB3*, *TYMS*, and *GSTP1* genes in tumors compared to standard chemotherapy in the treatment of non-small-cell lung cancer. *J Personal Med* 2022;12(10):1647.

34. Tsyganov M.M., Ibragimova M.K., Gaptulbarova K.A. et al. DNA Copy number aberrations and expression of ABC transporter genes in breast tumour: correlation with the effect of neoadjuvant chemotherapy and prognosis of the disease. *Pharmaceutics* 2022;14(5):1–19. DOI: 10.3390/pharmaceutics14050948
35. Tsyganov M.M., Ibragimova M.K., Garbukov E.Y. et al. Predictive and prognostic significance of mRNA Expression and DNA copies aberrations of *ERCC1*, *RRM1*, *TOP1*, *TOP2A*, *TUBB3*, *TYMS*, and *GSTP1* genes in patients with breast cancer. *Diagnostics* 2022;12(2):1–15. DOI: 10.3390/diagnostics12020405
36. Moiseyenko V.M., Volkov N.M., Suspistin E.N. et al. Evidence for predictive role of BRCA1 and bTUBIII in gastric cancer. *Med Oncol* 2013;30(2):1–9. DOI: 10.1007/s12032-013-0545-4

Вклад авторов

М.М. Цыганов, И.А. Цыденнова: разработка концепции и дизайна исследования, написание текста статьи;
М.К. Ибрагимова, В.А. Маркович, Е.О. Родионов: сбор и обработка материала;
С.А. Тузиков, Н.В. Литвяков: редактирование.

Authors' contribution.

M.M. Tsyganov, I.A. Tsydenova: development of the concept and design of the study, article writing;
V.A. Markovich, M.K. Ibragimova, E.O. Rodionov: collection and processing of material;
S.A. Tuzikov, N.V. Litvyakov: editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.М. Цыганов / M.M. Tsyganov: <https://orcid.org/0000-0001-7419-4512>
И.А. Цыденнова / I.A. Tsydenova: <https://orcid.org/0000-0002-2716-3075>
В.А. Маркович / V.A. Markovich: <https://orcid.org/0000-0002-7599-1211>
М.К. Ибрагимова / M.K. Ibragimova: <https://orcid.org/0000-0001-8815-2786>
Е.О. Родионов / E.O. Rodionov: <https://orcid.org/0000-0003-4980-8986>
С.А. Тузиков / S.A. Tuzikov: <https://orcid.org/0000-0002-0884-1838>
Н.В. Литвяков / N.V. Litvyakov: <https://orcid.org/0000-0002-0714-8927>

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

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 локальным комитетом Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (протоколы № 1 от 15.05.2014 и № 2 от 10.04.2018).

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 Scientific Research Institute of Oncology of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (protocols No. 1 of 15.05.2014 and No. 2 of 10.04.2018).

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

Статья поступила: 29.09.2022. **Принята к публикации:** 25.10.2022.

Article submitted: 29.09.2022. **Accepted for publication:** 25.10.2022.

Мутации в гене *PIK3CA* при раке молочной железы с низкой экспрессией белка HER2/neu

И.А. Павленко, П.Е. Повилайтите, В.Ю. Кацяев, Н.С. Макаревич, А.В. Петров

ГБУ Ростовской области «Патологоанатомическое бюро»; Россия, 344015 Ростов-на-Дону, ул. Благодатная, 170а

Контакты: Ирина Аркадьевна Павленко pavlenko.ir@gmail.com

Введение. Нарушения в PI3K-зависимом каскаде (PI3K – фосфоинозитид-3-киназа) характерны для всех типов рака молочной железы (РМЖ). В частности, 30–40 % пациенток с распространенным/метастатическим гормон-позитивным HER2-отрицательным (HER2 – human epidermal growth factor receptor 2; рецептор эпидермального фактора роста, тип 2) РМЖ несут мутации *PIK3CA* в опухолевых клетках. Обнаружение этих мутаций у пациенток с гормон-позитивным HER2-отрицательным РМЖ имеет большое клиническое значение, поскольку они являются предиктором чувствительности опухоли к ингибитору PI3K алпелисибу. По статусу экспрессии белка HER2/neu всех больных с гормон-позитивным HER2-отрицательным РМЖ можно разделить на 2 группы: с низкой экспрессией HER2/neu (оценками 0, 1+ или 2+ по данным иммуногистохимического исследования и отрицательным результатом гибридизации *in situ*) и отсутствием экспрессии этого белка.

Цель работы – установить, существуют ли различия в характере и распространенности мутаций в гене *PIK3CA* у пациенток с низкой экспрессией HER2/neu и отсутствием экспрессии этого белка.

Материалы и методы. Исследованы 32 образца люминального HER2-отрицательного иммунофенотипа РМЖ, которые по характеру экспрессии HER2/neu разделены на 2 группы: с низкой экспрессией HER2/neu ($n = 15$) и ее отсутствием ($n = 17$). Наличие мутаций в гене *PIK3CA* определяли с помощью коммерчески доступного набора cobas *PIK3CA* MutationTest (Roche, Швейцария) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на материале из парафиновых блоков (тканевой биопсии).

Результаты. Мутации в гене *PIK3CA* выявлены в 37,5 % случаев, из них в 2 случаях определена мутация p.E542K, в 3 – p.E545X, в 6 – p.H1047X, в 1 – p.N345K. При анализе мутационного статуса обеих групп обнаружены статистически значимые различия по количественному распределению мутаций в гене *PIK3CA*. Частота этих мутаций была достоверно выше в опухолях с низкой экспрессией HER2/neu ($p = 0,0268$).

Заключение. Таким образом, выявлены характерные генетические изменения у пациенток с РМЖ с низкой экспрессией HER2/neu. Эти изменения являются потенциальными мишенями для таргетной терапии, что важно для клинической практики, поскольку открывает новые возможности в лечении больных РМЖ с низкой экспрессией HER2/neu.

Ключевые слова: рак молочной железы, рецептор эпидермального фактора роста типа 2, мутации в гене *PIK3CA*

Для цитирования: Павленко И.А., Повилайтите П.Е., Кацяев В.Ю. и др. Мутации в гене *PIK3CA* при раке молочной железы с низкой экспрессией белка HER2/neu. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(4):89–95. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-89-95

PIK3CA mutations in breast cancer with low HER2/neu expression

I.A. Pavlenko, P.E. Povilaitite, V. Yu. Kaciyaev, N.S. Makarevich, A.V. Petrov

Rostov Regional Bureau of Pathology; 170a Blagodatnaya St., Rostov-on-Don 344015, Russia

Contacts: Irina Arkadyevna Pavlenko pavlenko.ir@gmail.com

Introduction. Disturbances in the PI3K-dependent (PI3K – phosphoinositide 3-kinase) cascade are characteristic of all types of breast cancer. In particular, 30–40 % of patients with advanced/metastatic hormone-positive HER2-negative (HER2 – human epidermal growth factor receptor 2) breast cancer carry *PIK3CA* mutations in tumor cells. The detection of these mutations in patients with hormone-positive HER2-negative breast cancer is of great clinical importance, since they are a predictor of tumor sensitivity to the PI3K inhibitor alpelisib. According to the HER2/neu protein expression status, all patients with hormone-positive HER2-negative breast cancer can be divided into two groups – with low expression of HER2/neu (scores 0, 1+ or 2+ per immunohistochemical analysis and negative result of *in situ* hybridization) and with a complete lack of expression of this protein.

Aim. To establish whether there are differences in the nature and prevalence of *PIK3CA* mutations in patients in these two groups.

Materials and methods. The study was carried out on 32 breast cancer samples with a luminal HER2-negative immunophenotype, which were divided into two groups – with low HER2/neu expression ($n = 15$) and with a complete absence of HER2/neu expression ($n = 17$). *PIK3CA* mutations were determined using the commercially available cobas *PIK3CA* MutationTest kit (Roche, Switzerland) by real-time polymerase chain reaction on paraffin block material (tissue biopsy). **Results.** Mutations of the *PIK3CA* gene were detected in 37.5 % of cases, of which p.E542K mutation was detected in 2 cases; p.E545X – in 3, p.H1047X – in 6 and p.N345K – in 1. Analysis of the mutational status of both groups revealed statistically significant differences in the quantitative distribution of *PIK3CA* mutations. The frequency of *PIK3CA* mutations was significantly higher in tumors with low expression of HER2/neu ($p = 0.0268$). Thus, characteristic genetic changes have been identified for a group of patients with HER2-low breast cancer. These changes are potential targets for therapy, which is important for clinical practice, as it opens up new therapeutic possibilities for breast cancer patients with low HER2/neu expression.

Keywords: breast cancer, human epidermal growth factor receptor 2, *PIK3CA* mutations

For citation: Pavlenko I.A., Povilaitite P.E., Kaciyaev V.Yu. et al. *PIK3CA* mutations in breast cancer with low HER2/neu expression. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(4):89–95. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-89-95

ВВЕДЕНИЕ

PIK3CA – ген, кодирующий каталитическую субъединицу фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) p110 α . Мутации в этом гене приводят к патологической активации сигнального пути PI3K-Akt-mTOR (мишень рапамицина млекопитающих), регулирующего ключевые метаболические процессы в клетках – рост, пролиферацию, миграцию и др. [1]. Активация сигнального пути PI3K-Akt-mTOR очень часто происходит в процессе канцерогенеза.

Известно, что активирующие соматические мутации в гене *PIK3CA* играют значительную роль в патогенезе и прогрессии опухолей и часто встречаются при раке молочной железы (РМЖ). Мутации *PIK3CA* выявляются в 30–40 % случаев люминального А и люминального В HER2-отрицательного РМЖ [2]. В других молекулярно-генетических подтипах – HER2-положительном и трижды негативном РМЖ – мутации в гене *PIK3CA* также встречаются, но значительно реже [3]. Однако на течение заболевания и прогноз они влияют независимо от того, в какой молекулярно-генетической подгруппе были выявлены. Резистентность опухолевых клеток к терапевтическому воздействию таргетного препарата трастузумаб у больных HER2-положительным РМЖ и к гормональной терапии у пациентов с люминальным HER2-отрицательным РМЖ обусловлена именно мутациями *PIK3CA* [4].

Большинство мутаций в гене *PIK3CA* расположено в экзонах 9 (замены p.E542K с.1624G>A, p.E545K с.1633G>A) и 20 (замены p.H1047R с.3140A>G и p.H1047L с.3140A>T) – так называемых «горячих точках» спирального и киназного доменов белка p110 α [5]. Показано, что они повышают киназную активность PI3K, ведут к активации нижележащей киназы Akt и, таким образом, являются онкогенными [4].

Обнаружение данных мутаций имеет важное клиническое значение, поскольку они являются предикторами чувствительности опухоли к ингибиторам PI3K. В частности, продемонстрировано преимущество добавления селективного ингибитора изоформы PI3Ka алпелисиба к стандартной гормональной тера-

пии у пациенток с распространенным РМЖ, имеющих положительный статус гормональных рецепторов и отрицательный HER2-статус, если в опухоли детектировались мутации в гене *PIK3CA* [2].

Прогностическая и предиктивная значимость более редких мутаций в экзонах 1, 4, 7 в настоящий момент активно изучается в доклинических исследованиях. Описаны и двойные мутации в гене *PIK3CA*, которые ускоряют онкогенную трансформацию клеток РМЖ, но при этом ассоциируются с более высокой по сравнению с одиночными мутациями чувствительностью к ингибиторам PI3K [6].

Следует подчеркнуть, что группа пациенток с люминальным HER2-отрицательным РМЖ гетерогенна. В нее входят как больные с люминальным А подтипом РМЖ, прогностически достаточно благоприятным в силу высокой эффективности эндокринотерапии, так и с более агрессивным люминальным В подтипом, требующим назначения химио- и гормонотерапии с учетом клинических данных. Экспрессия HER2/neu также не является однородной. Приблизительно у 50 % пациенток с люминальным РМЖ отмечается низкий уровень экспрессии HER2/neu (HER2-low) [7]. В соответствии с рекомендациями по определению HER2-статуса, в настоящее время считается, что такие больные имеют HER2-отрицательный РМЖ, и им не рекомендуется назначение таргетной анти-HER2-терапии. Вместе с тем недавнее исследование С. Denkert и соавт. на обширной выборке пациенток с РМЖ ($n = 2310$) убедительно показало, что опухоли с низкой экспрессией HER2/neu по клинико-патологическим параметрам, ответу на терапию и выживаемости отличаются от РМЖ без экспрессии HER2/neu (HER2/neu-0) [8]. Авторы высказали мнение, что биология опухолей с низкой экспрессией HER2/neu и без таковой различна, и предложили провести градацию между ними, выделив для клинической практики новую подгруппу больных.

Однако на сегодняшний день опухоли с низкой экспрессией HER2/neu не отнесены к отдельному молекулярно-биологическому подтипу, а критерии

их определения в рекомендациях по выявлению HER2/neu-статуса четко не обозначены. Вместе с тем понятно, что выделение группы опухолей с низкой экспрессией HER2/neu и отсутствием экспрессии HER2/neu могут улучшить эффективность лечения пациенток с РМЖ. Теперь дело за тем, чтобы разработать новые классификационные критерии для HER2-low- и HER2-0-РМЖ, и, видимо, это произойдет в ближайшем будущем. Пока же считается, что опухоль имеет HER2-low-статус, если по результатам иммуногистохимического (ИГХ) исследования по балльной шкале они получили оценки 0, 1+ или 2+ и в ходе проведения гибридизации *in situ* (*in situ* hybridization, ISH) получен отрицательный результат [9].

Расширение наших знаний о биологии РМЖ происходит постоянно. Выявление факторов, ассоциированных с низкой экспрессией HER2/neu при РМЖ, может быть использовано в качестве дополнительного критерия установления HER2-статуса, прогноза заболевания, а также способствовать разработке новых мишеней таргетной терапии.

Цель исследования — установить, существуют ли различия в характере и распространенности мутаций в гене *PIK3CA* у пациентов с низкой экспрессией HER2/neu и без таковой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 32 пациентки с люминальным HER2-отрицательным распространенным и/или метастатическим, прогрессирующим на фоне гормонотерапии РМЖ, в возрасте от 37 до 84 лет (медиана возраста 63 года). Верификация диагноза и определение HER2-статуса выполнены в лаборатории высокотехнологичных методов диагностики ГБУ Ростовской области «Патологоанатомическое бюро». Морфологически у подавляющего числа пациенток ($n = 30$) верифицирован инфильтративный РМЖ неспецифического типа. Тубулярный рак выявлен у 1 больной, муцинозный — также у 1 больной. Степень злокачественности опухоли соответствовала G_1 , G_2 и G_3 в 3, 81 и 16 % случаев соответственно. Рак молочной железы стадии IIA выявлен у 6,3 % пациенток, IIB — у 25,0 %, IIIA — у 12,5 %, IIIB — у 18,8 %, IIIC — у 12,5 % и IV — у 25,0 %.

HER2-отрицательными считались опухоли, которые после выполнения ИГХ-исследования с использованием антител к HER2/neu (Ventana anti-HER2/neu 4B5 Rabbit Monoclonal Primary Antibody, система визуализации Ventana UltraView Universal DAB) получили оценки 0 или 1+ по балльной шкале от 0 до 3+. При неопределенной экспрессии HER2 (оценка 2+) для уточнения HER2-статуса применяли метод ISH, согласно рекомендациям Американской ассоциации клинических онкологов/Американского колледжа патологов (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists, ASCO/CAP) [10]. В исследование включались только те пациентки с экспрессией

HER2, оцененной по данным ИГХ-исследования как 2+, у которых в ходе ISH получен отрицательный результат (отсутствие амплификации гена *HER2*). Алгоритм отбора HER2-отрицательных образцов представлен в табл. 1.

Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на сбор биологического материала, клинических данных и проведение молекулярно-генетического исследования. В дальнейшем все клинические данные больных были деперсонифицированы.

С целью увеличения количества опухолевых клеток в исследуемом материале при необходимости перед выделением ДНК проводили макродиссекцию образцов. Экстракция ДНК из парафиновых блоков осуществлялась с помощью набора DNA Sample Preparation Kit (Roche, Швейцария) в соответствии с инструкцией производителя. Мутации в гене *PIK3CA* определяли методом мультиплексной аллель-специфической полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени в 96-луночном планшете с использованием набора cobas *PIK3CA* Mutation Test (Roche, Швейцария) на анализаторе cobas z 480. Данный набор позволяет выявлять известные мутации в экзонах 1, 4, 7, 9 и 20 гена *PIK3CA*. Анализ и интерпретация полученных результатов были автоматизированы и проводились без участия оператора программным обеспечением анализатора, что исключало фактор субъективности.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы XLStat (версия 2022, Addinsoft, Франция). Сравнение частот в разных подгруппах выполняли с помощью точного критерия Фишера. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По статусу экспрессии белка HER2/neu все 32 пациентки были разделены на 2 группы: с низкой экспрессией HER2/neu ($n = 15$) и ее отсутствием ($n = 17$). HER2-негативными считались опухоли, которые после выполнения ИГХ-исследования с использованием антител к HER2/neu (клон 4B5) получили оценку 0 (53,2 % случаев). В группу с низкой экспрессией HER2/neu вошли опухоли с оценками 1+ или 2+ по данным ИГХ-исследования и отрицательным результатом ISH (46,8 % случаев).

В 32 исследованных образцах РМЖ выявлены 12 (37,5 %) различных мутаций в гене *PIK3CA*: в 2 случаях p.E542K, в 3 — p.E545X, в 6 — p.H1047X, в 1 — p.N345K (табл. 2).

Полученные результаты согласуются с опубликованными данными о частоте мутаций в гене *PIK3CA* при гормон-позитивном HER2-негативном РМЖ [2, 3]. Чаще всего встречалась мутация p. H1047X. Образцов с несколькими различными мутациями не обнаружено.

Точный тест Фишера позволил выявить статистически значимые различия в количественном

Таблица 1. Алгоритм иммуногистохимического исследования HER2-статуса и отбора образцов рака молочной железы с низкой экспрессией HER2 (HER2-low) (по рекомендациям Американской ассоциации клинических онкологов/Американского колледжа патологов (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists, ASCO/CAP))

Table 1. Algorithm of immunohistochemical analysis of HER2 status and selection of breast cancer samples with low HER2 expression (HER2-low) (per the guidelines of the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP))

Оценка по данным иммуногистохимического исследования Score per immunohistochemical analysis	HER2-статус HER2 status	HER2-статус после выполнения ISH HER2 status after ISH
0 — отсутствие окрашивания или слабое неполное окрашивание мембраны менее чем 10 % клеток инвазивной карциномы 0 — absence of staining or weak partial membrane staining in less than 10 % of invasive carcinoma cells	Отрицательный Negative	ISH не выполняется* ISH is not performed*
1+ — слабое неполное окрашивание мембраны более чем 10 % клеток инвазивной карциномы 1+ — weak partial membrane staining in more than 10 % of invasive carcinoma cells	Отрицательный HER2-low (1+)* Negative HER2-low (1+)*	ISH не выполняется ISH is not performed
2+ — неполное яркое окрашивание мембран или слабое по интенсивности, но равномерное мембранное окрашивание 10 % клеток инвазивной карциномы 2+ — partial intense membrane staining or weak but homogenous membrane staining of 10 % of invasive carcinoma cells	Неопределенный и требует верификации с помощью метода ISH Ambiguous and requires confirmation with ISH	HER2-low (2+)/ISH—* HER2 (2+)/ISH+**
3+ — интенсивное окрашивание полной мембраны более чем 10 % клеток инвазивной карциномы 3+ — intense staining of the whole membrane in more than 10 % of invasive carcinoma cells	Положительный Positive	ISH не выполняется** ISH is not performed**

*Группы, включенные в исследование. **Группы, не включенные в исследование.

Примечание. HER2 — human epidermal growth factor receptor 2 (рецептор эпидермального фактора роста, *tnfr* 2); ISH — *in situ* hybridization (гибридизация *in situ*).

*Groups included in the study. **Groups not included in the study.

Note. HER2 — human epidermal growth factor receptor 2; ISH — *in situ* hybridization.

Таблица 2. Мутации в гене *PIK3CA* в образцах с низкой экспрессией HER2/*neu* и без нее

Table 2. *PIK3CA* gene mutations in samples with low and no expression of HER2/*neu*

<i>PIK3CA</i> -статус <i>PIK3CA</i> status	HER2=0 (<i>n</i> = 17)		HER2-low (<i>n</i> = 15)	
	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%
Мутантный Mutant	3	17,6	9	60
Дикий тип Wild type	14	82,4	6	40
N345K	1	5,9	—	—
E542K	—	—	2	13,3
E545X	1	5,9	2	13,3
H1047X	1	5,9	5	33,3

Примечание. HER2 — human epidermal growth factor receptor 2 (рецептор эпидермального фактора роста, *tnfr* 2).

Note. HER2 — human epidermal growth factor receptor 2.

распределении мутаций в *PIK3CA* между группами больных с низкой экспрессией белка HER2/*neu* и ее отсутствием ($p = 0,0268$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Рак молочной железы представляет собой гетерогенное заболевание. Выделяют несколько биологических подтипов РМЖ: люминальный А, люминальный В, HER2-положительный и трижды негативный. Для каждого из них существуют принципиально разные подходы к лечению.

По рекомендациям, разработанным ASCO/CAP, опухоли с ИГХ-оценками 0, 1+ или 2+ и отрицательным результатом ISH считаются HER2-отрицательными. Подразумевается, что амплификация гена *HER2/neu* в них отсутствует, а экспрессия белка в таком случае не имеет клинического значения. Однако так ли это?

В последнее время группе опухолей с низкой экспрессией HER2/*neu* уделяют особое внимание. Новый препарат трастузумаб дерукстекан (Т-Dx), представляющий собой конъюгат антитела трастузумаба с ингибитором топоизомеразы I, показал свою эффективность именно в этой группе больных [11]. Как и другие конъюгаты антитела с лекарством (antibody-drug conjugates, ADC) с отщепляемым линкером, трастузумаб дерукстекан способен уничтожать не только клетки, несущие мишень, но и соседние за счет диффузии лекарственного вещества (так называемый bystander effect).

В РМЖ с ИГХ-оценками 0, 1+ или 2+ и отрицательным результатом ISH экспрессия HER2/*neu* на мембране опухолевых клеток, очевидно, различна.

Она является результатом не только генетических перестроек (полисомия 17-й хромосомы, коамплификация *HER2/neu* с центромерной зоной 17-й хромосомы и т.д.), но и следствием интенсификации процессов синтеза, презентации и распада рецептора, которая происходит по другим причинам. По-видимому, наличие даже небольшой экспрессии рецепторов *Her2/neu*, которая в рутинной практике в настоящий момент пока трактуется как *HER2*-отрицательный статус, может иметь важное клиническое значение, что было продемонстрировано в представленном на конференции ASCO (2022) исследовании DESTINY-BREAST04 [12]. Его результаты оказались настолько впечатляющими, что препарат трастузумаб дерукстекан был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) США для применения у пациенток с неоперабельным и/или метастатическим РМЖ с низким уровнем экспрессии *HER2/neu*, ранее получавших лечение.

Исследование DESTINY-BREAST04 продемонстрировало, что рецептор *HER2/neu* является одним из значимых молекулярных маркеров не только в опухолях с положительным *HER2*-статусом, но и в тех, где экспрессия *HER2/neu* выражена слабо. Это открывает новые возможности терапии примерно для 50 % больных РМЖ, которые в настоящее время классифицируются как пациенты с отрицательным *HER2*-статусом, но на самом деле имеют низкую экспрессию *HER2/neu*. Результаты исследования DESTINY-BREAST04 подтверждают обоснованность выделения группы с низкой экспрессией *HER2/neu* в отдельную категорию, поскольку трастузумаб дерукстекан на 50 % снижает риск прогрессирования заболевания и более чем на 1/3 — риск смерти [12]. Теперь, вероятно, перед профессиональным сообществом возникнет задача пересмотра классификации РМЖ с возможностью выделения опухолей с низкой экспрессией *HER2/neu* в отдельную группу. Также предстоит изучить их молекулярные особенности, которые могут быть связаны с прогнозом заболевания у данной категории пациенток, послужить в качестве дополнительных критериев установления *HER2*-статуса и помочь в разработке новых мишеней таргетной терапии.

Наше исследование продемонстрировало статистически значимое увеличение частоты встречаемости активирующих соматических мутаций в гене *PIK3CA* при РМЖ с низкой экспрессией *HER2/neu* по сравнению с опухолями, где экспрессия *HER2/neu* отсутствовала ($p < 0,05$). Сходные результаты были продемонстрированы в исследовании G. Zhang и соавт., которые на выборке в 523 человека выявили целый спектр генетических различий между РМЖ с низкой экспрессией *HER2/neu* и ее отсутствием. Так, авторы показали, что, помимо увеличения частоты мутаций в гене *PIK3CA*, опухоли с низкой экспрессией *HER2/neu* характеризуются небольшим уровнем мутаций в гене

p53 и значительно более низким уровнем полного патоморфологического ответа на неоадьювантную терапию, что косвенно может свидетельствовать об их существенных отличиях от РМЖ с отсутствием экспрессии *HER2/neu* [13].

В нашей выборке наиболее часто встречались 3 клинически значимые мутации — *p.E542K*, *p.E545X*, *p.H1047X*. Мутация *N345K* в экзоне 4, которая была обнаружена у 1 пациентки, является более редкой по сравнению с тройкой лидирующих мутаций в «горячих точках» экзонов 9 и 20. Согласно базам данных COSMIC (Catalog of Somatic Mutations in Cancer — Каталог соматических мутаций при раковых заболеваниях) и OncoKB, она считается патогенной и онкогенной, но чувствительность к ингибиторам *PI3K* при этой мутации была показана пока только в доклинических исследованиях [14]. Таким образом, клиническую значимость мутации *N345K* с учетом ее малой распространенности [15] еще предстоит изучить.

Интересен тот факт, что процессы активации разных генов *PI3K*-опосредованного сигнального каскада у носителей мутаций в гене *PIK3CA* в киназном (*p.H1047X*) и спиральном (*p.E545X*, *p.E542K*) доменах *p110*-субъединицы *PIK3CA* различаются. Мутации в киназном домене в итоге определяют более высокую пролиферативную активность опухоли, а мутации в спиральном — более выраженный миграционный (а значит, и метастатический) потенциал [16, 17]. По сравнению с пациентками, не имеющими мутаций *PI3K/Akt*-каскадного пути, больные, в опухолях у которых детектировались мутации в спиральном домене *PIK3CA*, демонстрировали более низкие показатели выживаемости без прогрессирования [18]. В связи с этим необходимо проанализировать спектр мутаций *PIK3CA* в зависимости от таких клинико-патологических характеристик больных, как степень злокачественности опухоли, стадия заболевания, наличие или отсутствие метастазов в лимфатических узлах (табл. 3).

Согласно данным, представленным в табл. 3, в нашем исследовании не было выявлено статистических различий в клинико-патологических характеристиках больных в зависимости от типа мутации *PIK3CA*. Тем не менее спектр мутаций в этом гене, безусловно, заслуживает отдельного изучения на более многочисленной выборке больных.

Известно, что рецептор *HER2/neu* способен образовывать гетеродимеры с тирозинкиназами *MET* и *RET*, в результате чего активируются нижележащие сигнальные пути, в том числе *PI3K-Akt-mTOR* [19]. Можно предположить, что наличие активирующих мутаций в гене *PIK3CA* способствует достижению того же самого эффекта, обеспечивая конститутивную стимуляцию сигнального каскада *PI3K-Akt-mTOR* в условиях низкой экспрессии *HER2/neu*. Иными словами, мутации *PIK3CA* в условиях недостаточной экспрессии *HER2/neu*, возможно, играют своего рода компенсаторную и потенцирующую роль, в результате

Таблица 3. Клинико-патологические характеристики пациентов в зависимости от типа мутации *PIK3CA*

Table 3. Clinical and pathological characteristics of the patients depending on the type of *PIK3CA* mutation

Характеристика Characteristic	Мутации <i>PIK3CA</i> в экзоне 9 (<i>n</i> = 5) <i>PIK3CA</i> mutations in exon 9 (<i>n</i> = 5)	Мутации <i>PIK3CA</i> в экзоне 20 (<i>n</i> = 6) <i>PIK3CA</i> mutations in exon 20 (<i>n</i> = 6)	<i>p</i>
Стадия заболевания, <i>n</i> : Disease stage, <i>n</i> :			
II	2	3	0,517
III	2	3	
IV	1	0	
Степень дифференцировки, <i>n</i> : Differentiation grade, <i>n</i> :			
G ₁	0	0	1,0
G ₂	3	4	
G ₃	2	2	
Количество вовлеченных лимфатических узлов, <i>n</i> : Number of involved lymph nodes, <i>n</i> :			
0 (N0)	3	3	0,99
1–3 (N1)	2	3	

чего происходит активация молекулярных каскадов, стимулирующих пролиферацию, миграцию и устойчивость опухолевых клеток к лекарственной терапии. Если это действительно так, то не только белок HER2/neu, но и ген *PIK3CA* может стать перспективной мишенью для терапии РМЖ с низкой экспрессией HER2/neu.

Наше исследование проведено на сравнительно малой выборке, и его результаты следует расценивать как предварительные. Тем не менее установленные различия в частоте мутаций в гене *PIK3CA* позволяют заключить, что люминальный РМЖ с низкой экспрессией HER2/neu биологически, а возможно, и клинически отличается от опухолей с отсутствием экспрессии HER2/neu. Требуется дальнейшие исследования для установления полного спектра молекулярных особенностей РМЖ с низкой экспрессией HER2/neu.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У пациенток с люминальным HER2-негативным распространенным и/или метастатическим РМЖ с низкой экспрессией HER2/neu мутации в гене *PIK3CA* встречались статистически значимо чаще, чем у больных с ее отсутствием. Поскольку данные результаты могут оказаться важными для клинической практики, мы предполагаем, что среди опухолей люминального HER2-отрицательного фенотипа целесообразно выделять и рассматривать отдельно группу с низкой экспрессией HER2/neu.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Yang J., Nie J., Ma X. et al. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer* 2019;18(1):26. DOI: 10.1186/s12943-019-0954-x
- Соколова Т.Н., Соловьева Т.И., Алексахина С.Н. и др. Клинико-морфологические особенности опухолей молочной железы с мутациями *PIK3CA* у российских больных: наблюдательное исследование. *Современная онкология* 2022;24(1):12–23. DOI: 10.26442/18151434.2022.1.201435
Sokolova T.N., Solovyeva T.I., Aleksakhina S.N. et al. Clinical and morphological features of breast tumors with *PIK3CA* mutations in Russian patients: observational study. *Sovremennaya onkologiya = Journal of Modern Oncology* 2022;24(1):12–23. (In Russ.). DOI: 10.26442/18151434.2022.1.201435
- Martínez-Sáez O., Chic N., Pascual T. et al. Frequency and spectrum of *PIK3CA* somatic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2020;22(1):45. DOI: 10.1186/s13058-020-01284-9
- Miricescu D., Totan A., Stanescu-Spinu I.I. et al. *PI3K/AKT/mTOR* signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects. *Int J Mol Sci* 2020;22(1):173. DOI: 10.3390/ijms22010173
- Criscitiello C., Marra A., Curigliano G. *PIK3CA* mutation assessment in HR+/HER2– metastatic breast cancer: overview for oncology clinical practice. *J Mol Pathol* 2021;2(1):42–54. DOI: 10.3390/jmp2010005
- Vasan N., Razavi P., Johnson J.L. et al. Double *PIK3CA* mutations in cis increase oncogenicity and sensitivity to PI3Kα inhibitors. *Science* 2019;366(6466):714–23. DOI: 10.1126/science.aaw9032
- Agostinetti E., Rediti M., Fimereli D. et al. HER2-low breast cancer: molecular characteristics and prognosis. *Cancers (Basel)* 2021;31(11):2824. DOI: 10.3390/cancers13112824
- Denkert C., Seither F., Schneeweiss A. et al. Clinical and molecular characteristics of HER2-low-positive breast cancer: pooled analysis of individual patient data from four prospective, neoadjuvant clinical trials. *Lancet Oncol* 2021;22(8):1151–61. DOI: 10.1016/S1473-2045(21)00301-6
- Miglietta F., Griguolo G., Bottosso M. et al. HER2-low-positive breast cancer: evolution from primary tumor to residual disease after neoadjuvant treatment. *NPI Breast Cancer* 2022;8(1):66. DOI: 10.1038/s41523-022-00434-w
- Wolff A.C., McShane L.M., Hammond M.E.H. et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142(11):1364–82. DOI: 10.1200/JCO.2018.77.8738
- Tarantino P., Hamilton E., Tolaney S.M. et al. HER2-low breast cancer: pathological and clinical landscape. *J Clin Oncol* 2020;38(17):1951–62. DOI: 10.1200/JCO.19.02488
- Modi S., Jacot W., Yamashita T. et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-low advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2022;387(1):9–20. DOI: 10.1056/NEJMoa2203690

13. Zhang G., Ren C., Li C. et al. Distinct clinical and somatic mutational features of breast tumors with high-, low-, or non-expressing human epidermal growth factor receptor 2 status. *BMC Med* 2022;20(1):142. DOI: 10.1186/s12916-022-02346-9
14. Migliaccio I., Paoli M., Risi E. et al. PIK3CA co-occurring mutations and copy-number gain in hormone receptor positive and HER2 negative breast cancer. *NPJ BreastCancer* 2022;8(1):24. DOI: 10.1038/s41523-022-00382-5
15. Fusco N., Malapelle U., Fassan M. PIK3CA mutations as a molecular target for hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Front Oncol* 2021;11:644737. DOI: 10.3389/fonc.2021.644737
16. Zardavas D., Phillips W.A., Loi S. *PIK3CA* mutations in breast cancer: reconciling findings from preclinical and clinical data. *Breast Cancer Res* 2014;16(1):201. DOI: 10.1186/bcr3605
17. Vatte C., Al Amri A.M., Cyrus C. et al. Helical and kinase domain mutations of PIK3CA, and their association with hormone receptor expression in breast cancer. *Oncol Lett* 2019;18(3):2427–33. DOI: 10.3892/ol.2019.10565
18. Tang Y., Li J., Xie N. et al. *PIK3CA* gene mutations in the helical domain correlate with high tumor mutation burden and poor prognosis in metastatic breast carcinomas with late-line therapies. *Aging (Albany NY)* 2020;12(2):1577–90. DOI: 10.18632/aging.102701
19. Дакс А.А., Федорова О.А., Шувалов О.Ю. и др. Участие тирозинкиназного рецептора ERBB2/HER2 в регуляции клеточной смерти. *Биохимия* 2020;85(10):1500–12. DOI: 10.31857/S0320972520100152
- Daks A.A., Fedorova O.A., Shuvalov O.Y. et al. The role of ERBB2/HER2 tyrosine kinase receptor in the regulation of cell death. *Biochemistry* 2020;85(10):1500–12. (In Russ.). DOI: 10.31857/S0320972520100152

Вклад авторов

И.А. Павленко: разработка концепции исследования, обзор литературы по теме статьи, статистическая обработка данных, написание текста статьи;

П.Е. Повилайте: разработка концепции исследования, подбор материала для исследования, редактирование;

В.Ю. Кацыяев: подбор материала для исследования, редактирование;

Н.С. Макаревич: получение экспериментальных данных;

А.В. Петров: получение экспериментальных данных, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contribution

I.A. Pavlenko: development of the research concept, literature review on the topic of the article, statistical data processing, article writing;

P.E. Povilaite: development of the research concept, selection of material for research, editing;

V.Y. Katsiyaev: selection of material for research, editing;

N.S. Makarevich: obtaining experimental data;

A.V. Petrov: obtaining experimental data, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.А. Павленко / I.A. Pavlenko: <https://orcid.org/0000-0002-4578-8263>

П.Э. Повилайте / P.E. Povilaite: <https://orcid.org/0000-0002-0934-0349>

В.Ю. Кацыяев / V.Yu. Katsiyaev: <https://orcid.org/0000-0002-5955-1099>

Н.С. Макаревич / N.S. Makarevich: <https://orcid.org/0000-0001-7691-9775>

А.В. Петров / A.V. Petrov: <https://orcid.org/0000-0001-7252-774X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено при спонсорской поддержке Российского общества клинической онкологии (RUSSCO) (договор № МГД/РОПАБ.RU/2022 от 10.01.2022).

Funding. The study was sponsored by Russian Society of Clinical Oncology (RUSSCO) (contract № MGD/ROPAB.RU/2022 signed 10.01.2022).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

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

Статья поступила: 05.10.2022. **Принята к публикации:** 28.10.2022.

Article submitted: 05.10.2022. **Accepted for publication:** 28.10.2022.

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-96-111



Проявления апоптоза в субпопуляциях циркулирующих опухолевых клеток с фенотипами, ассоциированными со стволовостью и эпителиально-мезенхимальным переходом, при карциноме молочной железы

В.М. Перельмутер¹, Е.С. Григорьева¹, М.В. Завьялова^{1,2}, Л.А. Таширева¹, В.В. Алифанов^{1,2}, О.Е. Савельева¹, С.В. Вторушин^{1,2}, Е.Л. Чойнзонов^{1,2}, Н.В. Чердынцева¹⁻³

¹ Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук; Россия, 634009 Томск, переулок Кооперативный, 5

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2;

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет; Россия, 634050, Томск, проспект Ленина, 36

Контакты: Владимир Михайлович Перельмутер pvm@ngs.ru

Введение. Способность циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) инициировать метастазирование в отдаленных сайтах, прежде всего, связана с их резистентностью к апоптозу, что позволяет сохранить жизнеспособность в кровотоке. Знание фенотипических признаков, связанных с этой способностью, позволило бы прогнозировать риск развития метастазов и оптимизировать адъювантную терапию.

Цель исследования – изучение проявлений апоптоза в популяциях ЦОК с различными фенотипическими характеристиками.

Материалы и методы. В исследование включены 58 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа стадии T1–4N0–3M0. Клеточные концентраты, полученные из цельной крови пациентов, окрашены коктейлем антител к CK7/8, CD45, EpCAM, CD44, CD24, CD133, ALDH, N-кадгерину, что позволяет идентифицировать ЦОК с признаками стволовости и эпителиально-мезенхимального перехода. Окрашивание аннексином V и 7-амино-актиномицином D использовали для оценки разных стадий апоптоза каждой из популяций ЦОК.

Результаты. Циркулирующие опухолевые клетки характеризуются выраженной гетерогенностью по проявлениям признаков стволовости и эпителиально-мезенхимального перехода и ассоциации с наличием ранних и поздних признаков апоптоза и некроза. Для ЦОК с фенотипами, включающими коэкспрессию эпителиального маркера CK7/8 и маркера стволовости CD133 (но не CD44), более характерно отсутствие признаков апоптоза. Коэкспрессия CK7/8 и CD133 ЦОК с маркерами стволовости CD44+/CD24– ассоциирована с развитием ранних, но не поздних признаков апоптоза и некроза. Циркулирующие опухолевые клетки с отсутствием коэкспрессии CK7/8 и CD133 могли иметь и ранние, и поздние признаки апоптоза и некроза. Фенотипы ЦОК с признаками раннего апоптоза, экспрессирующие CD133, в отличие от ЦОК без экспрессии CD133, сохраняются в крови после неоадъювантной химиотерапии.

Заключение. Существуют фенотипические признаки ЦОК, имеющие отношение к стволовости и эпителиально-мезенхимальному переходу, сопряженные с устойчивостью к апоптозу или чувствительностью к нему.

Ключевые слова: рак молочной железы, циркулирующие опухолевые клетки, апоптоз, влияние химиотерапии

Для цитирования: Перельмутер В.М., Григорьева Е.С., Завьялова М.В. и др. Проявления апоптоза в субпопуляциях циркулирующих опухолевых клеток с фенотипами, ассоциированными со стволовостью и эпителиально-мезенхимальным переходом, при карциноме молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(4):96–111. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-96-111

Signs of apoptosis in circulating tumor cell subpopulations with phenotypes associated with stemness and epithelial-mesenchymal transition in breast carcinoma

V.M. Perelmutter¹, E.S. Grigorieva¹, M.V. Zavyalova^{1,2}, L.A. Tashireva¹, V.V. Alifanov^{1,2}, O.E. Saveleva¹, S.V. Vtorushin^{1,2}, E.L. Choyazonov^{1,2}, N.V. Cherdynseva¹⁻³

¹Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; 5 Cooperative Lane, Tomsk 634009, Russia;

²Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moskovsky Tract, Tomsk 634050, Russia;

³National Research Tomsk State University; 36 Lenin Prospekt, Tomsk 634050, Russia

Contacts: Vladimir Mikhailovich Perelmutter pvm@ngs.ru

Introduction. Ability of circulating tumor cells (CTC) initiate metastases in distant sites is associated primarily with their resistance to apoptosis which allows them to retain viability in the blood. Knowledge of phenotypical signs associated with this ability would allow to predict the risk of metastases and optimize adjuvant therapy.

Aim. To examine signs of apoptosis in CTC populations with various phenotypical characteristics.

Materials and methods. The study included 58 patients with invasive breast carcinoma of unspecified type, stages T1–4N0–3M0. Cell concentrates extracted from patients' whole blood were stained with an antibody cocktail against CK7/8, CD45, EpCAM, CD44, CD24, CD133, ALDH, N-cadherin which allowed to identify CTC with signs of stemness and epithelial-mesenchymal transition. Annexin V and 7-amino-actinomycin D staining was used for evaluation of apoptosis stage in CTC populations.

Results. Circulating tumor cells are characterized by heterogeneity in respect to signs of stemness and epithelial-mesenchymal transition and presence of early and late signs of apoptosis and necrosis. CTC phenotypes including co-expression of epithelial marker CK7/8 and stemness marker CD133 (but not CD44) are characterized by absence of signs of apoptosis. Co-expression of CK7/8 and CD133 in CTC with stemness markers CD44+/CD24– is associated with development of early but not late signs of apoptosis and necrosis. Circulating tumor cells without co-expression of CK7/8 and CD133 could have both early and late signs of apoptosis and necrosis. Circulating tumor cells phenotypes with signs of early apoptosis expressing CD133 remain in blood after non-adjuvant chemotherapy opposed to CTC without CD133 expression.

Conclusion. There are CTC phenotypical signs associated with stemness and epithelial-mesenchymal transition and linked to apoptosis resistance or sensitivity.

Keywords: breast cancer, circulating tumor cells, apoptosis, the effect of chemotherapy

For citation: Perelmutter V.M., Grigorieva E.S., Zavyalova M.V. et al. Signs of apoptosis in circulating tumor cell subpopulations with phenotypes associated with stemness and epithelial-mesenchymal transition in breast carcinoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(4):96–111. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-96-111

ВВЕДЕНИЕ

Образование гематогенных метастазов — основная причина смерти онкологических больных — определяется наличием в кровотоке циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) и особенностями органов-мишеней. Изучение условий появления ЦОК, а также определение их функциональной характеристики являются важнейшими задачами онкологии. Их решение поможет в профилактике метастазирования и лекарственной резистентности.

Хорошо известно, что ЦОК характеризуются высокой гетерогенностью [1, 2]. В связи с этим важно выяснить, с какими свойствами связана адаптивность ЦОК к условиям преметастатической ниши, почему одни диссеминированные клетки способны к формированию метастазов в ранний период, а другие становятся их источником через большой отрезок времени, а также какое место в проявлении этих качеств играют свойства стволовости и состояние эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП).

Ключевой характеристикой ЦОК, от которой зависит любая функциональная активность, является их способность сохранять жизнеспособность в циркуляции. По образному выражению L.B. Krog и M.D. Henry, жизнь ЦОК «мерзкая, жестокая и короткая» [3]. S. Meng и соавт. (2004) изучили динамику ЦОК после хирургического удаления первичных опухолей молочной железы и пришли к выводу, что период полужизни

ЦОК составляет около 1–2 ч [4]. По другим данным, он равен 25–30 мин [5]. В то же время, по мнению R.A. Weinberg (2008), 97 % ЦОК исчезают в течение нескольких дней [6].

Биомеханические параметры условий пребывания ЦОК в циркуляции изучаются на разнообразных моделях и в условиях *in vivo* [3]. Циркулирующие опухолевые клетки могут погибать в циркуляции из-за отсроченного апоптоза, который развивается из-за отделения опухолевой клетки от внеклеточного матрикса [7]. Некоторые ЦОК подвергаются механической деструкции в связи с действием на клетку напряжения сдвига пристеночной крови относительно стенки сосуда (wall shear stress) и напряжения, возникающего при сдвиге слоев крови относительно друг друга (fluid shear stress). Полагают, что эффект зависит от исходного состояния опухолевой клетки [3, 8].

Важный аспект — изучение проявлений апоптоза в ЦОК с различными фенотипическими характеристиками, ассоциированными со свойствами стволовости и ЭМП. Существует множество исследований, демонстрирующих устойчивость к апоптозу клеток опухоли со стволовоподобными свойствами [9–11].

Остается открытым вопрос, обладают ли стволовые клетки с разными маркерами стволовости или их различным сочетанием (CD44+/CD24–, CD133 и альдегиддегидрогеназа (ALDH)) одинаковой устойчивостью

к апоптозу. Эпителиально-мезенхимальный переход — еще одно состояние, с которым связывают резистентность к апоптозу [12].

Данные о связи апоптоза с иными фенотипическими признаками опухолевых клеток немногочисленны. Согласно результатам исследования N.V. Jordan и соавт. (2016), несмотря на то, что HER2-положительные ЦОК (human epidermal growth factor receptor 2 — рецептор эпидермального фактора роста, тип 2) обладают более выраженной пролиферативной активностью и чаще формируют метастазы, чем HER2-отрицательные ЦОК, показатели апоптоза у этих клеток одинаковы [13].

Клиническое значение наличия ЦОК в апоптозе оценивается неоднозначно. Чаще указывают на то, что наличие большего количества апоптотических ЦОК у онкологических больных коррелирует с лучшим исходом [14, 15]. Однако имеются данные, согласно которым сохранение апоптотических ЦОК при раке молочной железы (РМЖ) является свидетельством отсутствия ответа на химиотерапию [16].

Апоптоз может быть неудачным (failed apoptosis) [17]. Существуют свидетельства обратимости апоптоза. Важным обстоятельством является то, что опухолевые клетки с обратимым апоптозом приобретают более агрессивные свойства [18].

Цель исследования — изучение проявлений апоптоза в популяциях ЦОК с различными фенотипическими характеристиками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В проспективное исследование включены 58 пациенток с инвазивной протоковой карциномой молочной железы неспецифического типа стадии T1–4N0–3M0, получавших лечение в Научно-исследовательском институте онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук. Из них 16 пациенток с люминальным А молекулярно-биологическим подтипом, 32 пациентки — с люминальным Б, 8 пациенток — с трижды негативным. У 1 больной выявлен HER2-положительный подтип, у 1 пациентки данные не уточнены.

В группе без неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) ($n = 43$) образцы венозной крови забирали в вакуумные пробирки, обработанные этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) перед операцией и НАХТ, в группе с НАХТ ($n = 15$) — в вакуумные пробирки, обработанные ЭДТА перед операцией и после проведения 6 курсов НАХТ. Полученные образцы инкубировали при 37 °C в течение 1,5 ч. Клеточный концентрат отбирали на границе раздела фаз между осажденными эритроцитами и плазмой. Полученный клеточный концентрат отмывали в 2 мл буфера Cell Wash (BD Biosciences, США) с помощью центрифугирования при 800 x g в течение 15 мин.

Цитофлуориметрическое исследование проводили посредством окрашивания полученного клеточного

концентрата антителами против поверхностных и внутриклеточных маркеров. На 1-м этапе окрашивали маркеры CD45, EpCAM (CD326), CD44, CD24, CD133, N-кадгерин (N-cadh), а также аннексин V (AnnV) и 7-амино-актиномицин D (7-AAD). На 2-м этапе проводили внутриклеточное окрашивание маркерами EpCAM (CD326), CK7/8 и ALDH1A1. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин с 5 мкл раствора, блокирующего свободные Fc-рецепторы, для устранения неспецифического связывания антител (Human TruStain FcX, Sony Biotechnology, США). Далее к поверхностным маркерам добавляли моноклональные антитела — APC-Cy7-анти-CD45 (клон HI30, IgG1, Sony Biotechnology, США), BV650-анти-CD326 (клон 9C4, IgG2b, Sony Biotechnology, США), PE-Cy7-анти-N-cadh (клон 8C11, IgG1, Sony Biotechnology, США), BV510-анти-CD44 (клон G44–26, IgG2b, BD Horizont, США), PerCP-Cy5.5-анти-CD24 (клон ML5, IgG2a, Sony Biotechnology, США), BV786-анти-CD133 (клон 293C3, IgG2b, BD Pharmingen, США), а также FITC-конъюгированный AnnV (Sony Biotechnology, США) и 7-AAD (Sony Biotechnology) — и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Соответствующие изотипические антитела добавляли к контрольному образцу в той же концентрации. После инкубации оставшиеся эритроциты лизировали 250 мкл буфера OptiLyse C (Beckman Coulter, Франция) при комнатной температуре в течение 10 мин в темноте и промывали 1 мл буфера Cell Wash (BD Biosciences, США) при 800 x g в течение 6 мин.

Для внутриклеточного окрашивания клетки пермеабилizировали 250 мкл BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, США) при 4 °C в течение 30 мин в темноте и дважды промывали в 1 мл буфера BD Perm/Wash (BD Biosciences, США) при 800 x g в течение 6 мин. После этого образцы разводили в 50 мкл буфера BD Perm/Wash (BD Biosciences, США) и инкубировали при 4 °C в течение 10 мин в темноте с 5 мкл Fc Receptor Blocking Solution (Human TruStain FcX, Sony Biotechnology, США). Далее добавляли моноклональные антитела AF647-анти-CK7/8 (клон CAM5.2, Mouse IgG2a, BD Pharmingen), BV 650-анти-CD326 (клон 9C4, IgG2b, Sony Biotechnology, США) и PE-анти-ALDH1A1 (клон 03, IgG1, Sino Biological, Китай) и инкубировали при 4 °C в течение 20 мин. К контрольному образцу добавляли соответствующие изотипические антитела в той же концентрации. После инкубации образцы промывали 1 мл буфера Cell Wash (BD Biosciences, США) при 800 x g в течение 6 мин. Затем образцы разводили в 100 мкл Stain buffer (Sony Biotechnology, США). Клетки MCF-7 использовали в качестве положительного контроля, а клетки U937 — в качестве отрицательного контроля. Частицы VersaComp Antibody Capture Bead (Beckman Coulter, США) применяли для настройки компенсации. Иммунофлуоресценцию анализировали на проточном цитофлуориметре Novocyte 3000 (ACEA Biosciences, США).

В результате мы оценили фенотипы ЦОК:

- хотя бы с 1 из эпителиальных маркеров (EpCAM+CK7/8–; EpCAM–CK7/8+; EpCAM+CK7/8+);
- стволовые и нестволовые (CD44+CD24–; CD44–CD24–);
- с признаками ЭМП и без них (N-cadh+; N-cadh–).

В каждой из указанных популяций ЦОК оценивали экспрессию дополнительных маркеров стволовости – ALDH1A1 и CD133 – с одновременным окрашиванием AnnV и 7-AAD.

Негативное окрашивание AnnV и 7-AAD (AnnV–7-AAD–) в ЦОК расценивали как отсутствие признаков апоптоза, позитивное окрашивание AnnV и негативное 7-AAD (AnnV+7-AAD–) – как наличие ранних признаков апоптоза, позитивное окрашивание AnnV и 7-AAD (AnnV+7-AAD+) – как наличие поздних признаков апоптоза и/или некроза в ЦОК, негативное окрашивание AnnV и позитивное окрашивание 7-AAD (AnnV–7-AAD+) – как наличие признаков некроза [19].

Статистическую обработку проводили с помощью GraphPad Prism9. Для сравнения частот встречаемости использовали точный критерий Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика фенотипов циркулирующих опухолевых клеток при инвазивной протоковой карциноме молочной железы неспецифического типа в зависимости от окрашивания аннексином V и 7-амино-актиномицином D. В 43 случаях НАХТ не назначалась, в 15 случаях ЦОК исследовали после нее. Циркулирующие опухолевые клетки при оценке различных вариантов экспрессии EpCam, CK7/8, CD44, CD24, N-cadh, ALDH, CD133 и окрашивания 7-AAD и AnnV характеризовались крайней степенью гетерогенности.

Циркулирующие опухолевые клетки с одним и тем же фенотипом могли обнаруживаться в разных состояниях в зависимости от наличия или отсутствия признаков клеточной гибели: без признаков гибели (AnnV–7-AAD–), с ранними (AnnV+7-AAD–) или поздними (AnnV+7-AAD+) признаками апоптоза и/или

некроза или только некроза (AnnV–7-AAD+). Причем встречались разные сочетания состояний одного и того же фенотипа ЦОК.

Частота встречаемости фенотипов ЦОК и их состояний варьировала в широких пределах. Одни фенотипы встречались не более чем в 5 % случаев, другие фенотипы обнаруживались с частотой, равной или в значительной степени превышающей 6 % (табл. 1, 2). Следует отметить, что количество часто и редко обнаруживаемых фенотипов ЦОК не различалось. Не было значимых различий и количества ЦОК между группами с наличием и отсутствием ранних признаков апоптоза (см. табл. 1).

Три фенотипа ЦОК без признаков апоптоза (AnnV–7-AAD–) обнаруживались с частотой, превышающей 60 %. Один из этих фенотипов (фенотип 69), составляющий 63 %, характеризовался наличием признаков стволовости по 2 маркерам и ЭМП по экспрессии N-cadh (CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh+ALDH–CD133+AnnV–7-AAD–), т.е. признаков, ожидаемо повышающих резистентность клеток к гибели. Однако 2 других фенотипа (фенотипы 12 и 18 – 60 и 88 % соответственно) не имели ни признаков стволовости, ни признаков ЭМП – экспрессии N-cadh (CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV–7-AAD– и CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV–7-AAD–) (см. табл. 2).

Характеристика фенотипов циркулирующих опухолевых клеток в зависимости от сочетания признаков стволовости, эпителиально-мезенхимального перехода и ранних признаков апоптоза. Можно было ожидать, что вероятность развития апоптоза в клетках с наличием и отсутствием стволовоподобных свойств должна быть различной. Поскольку ЦОК различались по экспрессии 3 маркеров стволовости, представляло интерес сопоставление спектра вариантов стволовости среди ЦОК без признаков апоптоза и с их наличием. Проведено сравнение наличия ранних признаков апоптоза среди ЦОК, различающихся вариантом

Таблица 1. Частота обнаружения и количество циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) с наличием (AnnV+7-AAD–) или отсутствием (AnnV–7-AAD–) ранних признаков апоптоза

Table 1. Frequency and number of early apoptotic (AnnV+7-AAD–) and non-apoptotic (AnnV–7-AAD–) circulating tumor cells (CTCs)

Фенотип ЦОК Phenotype of CTC	Часто встречающиеся ЦОК (≥6 %), Me (Q1–Q3) Common CTC (≥6 %), Me (Q1–Q3)		Редко встречающиеся ЦОК (<5 %), Me (Q1–Q3) Rare CTC (<5 %), Me (Q1–Q3)	
	Частота (%) Frequency (%)	Количество ЦОК (на 100 мкл) Number of CTC (in 100 μL)	Частота, % Frequency, %	Количество ЦОК (на 100 мкл) Number of CTC (in 100 μL)
AnnV–7-AAD– (n = 39)	18,5 (12,0–51,0) (n = 33)	0,83 (0,83–1,68)	2,0 (2,0–2,0) (n = 6)	1,66 (0,83–3,32)
AnnV+7-AAD– (n = 28)	9,0 (7,0–35,0) (n = 10)	1,24 (0,83–2,36)	2,0 (2,0–5,0) (n = 18)	1,01 (0,83–1,24)

Примечание. AnnV – аннексин V; 7-AAD – 7-амино-актиномицин D.

Note. AnnV – annexin V; 7-AAD – 7-amino-actinomycin D.

Таблица 2. Частота встречаемости фенотипов циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) и их состояний, отражающих ранние (AnnV+7-AAD-), поздние (AnnV+7-AAD+) признаки апоптоза или некроза (AnnV-7-AAD+) и их отсутствие (AnnV-7-AAD-) с учетом проведения неoadъювантной химиотерапии (НАХТ)

Table 2. Frequency of circulating tumor cells (CTCs) phenotypes and their constitution of early apoptosis (AnnV+7-AAD-), late apoptosis (AnnV+7-AAD+) or necrosis (AnnV-7-AAD+), non-apoptosis (AnnV-7-AAD-) depending on neoadjuvant chemotherapy (NACT)

Номер фенотипа Phenotype number	Фенотип Phenotype	Число случаев с данным фенотипом, абс. (%) Frequency events, abs. (%)	
		Без НАХТ (n = 43) Without NACT (n = 43)	С НАХТ (n = 15) With NACT (n = 15)
1-я группа – AnnV–7-AAD– Group 1 – AnnV–7-AAD–			
1	CD45–EpCam+CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH– CD133+AnnV–7-AAD–	3 (7)	2 (13)
2	CD45–EpCam+CK7/8+CD44–CD24–N-cadh+ALDH– CD133+AnnV–7-AAD–	1 (2)	1 (7)
3	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH– CD133+AnnV–7-AAD–	14 (33)	7 (47)
4	CD45–EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH–CD133– AnnV–7-AAD–	1 (2)	2 (13)
5	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	4 (9)	0 (0)
6	CD45–EpCam–CK7/8+CD44– CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	4 (9)	1 (7)
7	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133– AnnV–7-AAD–	1 (2)	0 (0)
8	CD45– EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV– 7-AAD–	3 (7)	0 (0)
2-я группа – AnnV–7-AAD+ Group 2 – AnnV–7-AAD+			
9	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133– AnnV–7-AAD+	1 (2)	0 (0)
10	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh–ALDH+CD133– AnnV–7-AAD+	2 (5)	1 (7)
11	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH+CD133– AnnV–7-AAD+	2 (5)	0 (0)
3-я группа – AnnV–/+7-AAD– Group 3 – AnnV–/+7-AAD–			
12	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133– AnnV–7-AAD–	26 (60)	9 (60)
13	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133– AnnV+7-AAD–	2 (5)	0 (0)
14	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh+ALDH–CD133– AnnV–7-AAD–	2 (5)	2 (13)
15	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh+ALDH–CD133– AnnV+7-AAD–	1 (2)	0 (0)
16	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh+ALDH–CD133– AnnV–7-AAD–	9 (21)	2 (13)
17	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh+ALDH–CD133– AnnV+7-AAD–	3 (7)	0/15 (0)

Продолжение табл. 2

Continuation of table 2

Номер фенотипа Phenotype number	Фенотип Phenotype	Число случаев с данным фенотипом, абс. (%) Frequency events, abs. (%)	
		Без НАХТ ($n = 43$) Without NACT ($n = 43$)	С НАХТ ($n = 15$) With NACT ($n = 15$)
18	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV–7-AAD–	38 (88)	13 (87)
19	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV+7-AAD–	4 (9)	2 (13)
20	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH+CD133–AnnV–7-AAD–	6 (14)	1 (7)
21	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH+CD133–AnnV+7-AAD–	2 (5)	0 (0)
22	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133+AnnV–7-AAD–	21 (49)	12 (80) $\chi^2 = 4,40$; $p_a = 0,034^*$
23	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133+AnnV+7-AAD–	5 (12)	1 (7)
24	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh+ALDH–CD133+AnnV–7-AAD–	16 (37)	3 (20)
25	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh+ALDH–CD133+AnnV+7-AAD–	1 (2)	1 (7)
26	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH+CD133–AnnV–7-AAD–	6 (14)	0 (0)
27	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH+CD133–AnnV+7-AAD–	3 (7)	0 (0)
28	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh+ALDH–CD133+AnnV–7-AAD–	6 (14)	5 (33)
29	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh+ALDH–CD133+AnnV+7-AAD–	1 (2)	1 (7)
30	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV–7-AAD–	5 (12)	3 (20)
31	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV+7-AAD–	2 (5)	0 (0)
32	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh+ALDH–CD133–AnnV–7-AAD–	1 (2)	1 (7)
33	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh+ALDH–CD133–AnnV+7-AAD–	1 (2)	0 (0)
34	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV–7-AAD–	24 (56)	10 (67)
35	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV+7-AAD–	2 (5)	1 (7)
36	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	9 (21)	3 (20)
37	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH+CD133+AnnV+7-AAD–	1 (2)	1 (7)
38	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	4 (9)	1 (7)

Продолжение табл. 2

Continuation of table 2

Номер фенотипа Phenotype number	Фенотип Phenotype	Число случаев с данным фенотипом, абс. (%) Frequency events, abs. (%)	
		Без НАХТ (n = 43) Without NACT (n = 43)	С НАХТ (n = 15) With NACT (n = 15)
39	CD45–EpCam+CK7/8–CD44– CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV+7-AAD–	1 (2)	0 (0)
40	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh–ALDH+CD133– AnnV–7-AAD–	3 (7)	1 (7)
41	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh–ALDH+CD133– AnnV+7-AAD–	2 (5)	0 (0)
42	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh–ALDH– CD133+AnnV–7-AAD–	24 (56)	10 (67)
43	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh–ALDH– CD133+AnnV+7-AAD–	12 (28)	5 (33)
44	CD45–EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH– CD133+AnnV–7-AAD–	5 (12)	2 (13)
45	CD45–EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH– CD133+AnnV+7-AAD–	3 (7)	0 (0)
46	CD45–EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH– CD133+AnnV–7-AAD–	3 (7)	2 (13)
47	CD45–EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH– CD133+AnnV+7-AAD–	1 (2)	1 (7)
48	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH+CD133– AnnV–7-AAD–	6 (14)	2 (13)
49	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH+CD133– AnnV+7-AAD–	2 (5)	0 (0)
50	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH– CD133+AnnV–7-AAD–	23 (53)	10 (67)
51	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH– CD133+AnnV+7-AAD–	2 (5)	0 (0)
52	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133– AnnV–7-AAD–	6 (14)	3 (20)
53	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133– AnnV+7-AAD–	2 (5)	0 (0)
54	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH– CD133+AnnV–7-AAD–	9 (21)	7 (46,7) $\chi^2 = 3,6$; $p_a = 0,05^*$
55	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH– CD133+AnnV+7-AAD–	1 (2)	1 (7)
56	CD45–EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	0 (0)	2 (13) $\chi^2 = 5,9$; $p_a = 0,01^*$
57	CD45–EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV+7-AAD–	2 (5)	0 (0)
58	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	7 (16)	1 (7)
59	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV+7-AAD–	0 (0)	1 (7)

Окончание табл. 2

The end of table 2

Номер фенотипа Phenotype number	Фенотип Phenotype	Число случаев с данным фенотипом, абс. (%) Frequency events, abs. (%)	
		Без НАХТ (n = 43) Without NACT (n = 43)	С НАХТ (n = 15) With NACT (n = 15)
60	CD45–EpCam– CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	6 (14)	5 (33)
61	CD45–EpCam– CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV+7-AAD–	2 (5)	1 (7)
4-я группа AnnV–/+7-AAD–/+ Group 4 AnnV–/+7-AAD–/+			
62	CD45–EpCam+CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133– AnnV–7-AAD–	9 (21)	5 (33)
63	CD45–EpCam+CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133– AnnV–7-AAD+	0 (0)	1 (7)
64	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh+ALDH+CD133– AnnV–7-AAD–	10 (23)	3 (20)
65	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh+ALDH+CD133– AnnV+7-AAD–	4 (9)	0 (0)
66	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh+ALDH+CD133– AnnV+7-AAD+	1 (2)	0 (0)
67	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH–CD133– AnnV–7-AAD–	4 (9)	0 (0)
68	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH–CD133– AnnV–7-AAD+	1 (2)	0 (0)
69	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh+ALDH– CD133+AnnV–7-AAD–	27 (63)	8 (53)
70	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh+ALDH– CD133+AnnV+7-AAD–	19 (44)	6 (40)
71	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh+ALDH– CD133+AnnV–7-AAD+	1 (2)	0 (0)
72	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV–7-AAD+	0 (0)	1 (7)
73	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	23 (53)	5 (33)
74	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV+7-AAD–	15 (35)	5 (33)
75	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV+7-AAD+	2 (5)	1 (7)
76	CD45–EpCam+CK7/8– CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	24 (56)	0 (60)
77	CD45–EpCam+CK7/8– CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV+7-AAD–	18 (42)	9 (60)
78	CD45–EpCam+CK7/8– CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV+7-AAD+	2 (5)	0 (0)

*Указаны только значения p, свидетельствующие о статистически значимых различиях между сравниваемыми группами.

Примечание. AnnV – аннексин V; 7-AAD – 7-амино-актиномицин D; N-cadh – N-кадгерин.

Note. AnnV – annexin V; 7-AAD – 7-amino-actinomycin D; N-cadh – N-cadherin.

коэкспрессии маркеров стволовости. Рассмотрены 7 вариантов коэкспрессии маркеров стволовости (CD44+CD24-, CD133+, ALDH+, CD133+ALDH+, CD133+CD44+CD24-, ALDH+CD44+CD24-, CD133+CD44+CD24-ALDH+) и 1 – без признаков стволовости (CD133-CD44-CD24-ALDH-). Сумма таких вариантов ЦОК в каждой из 4 групп сравнения (AnnV-7-AAD-HAXT-, AnnV+7-AAD-HAXT-, AnnV-7-AAD-HAXT+ и AnnV+7-AAD-HAXT+) принималась за 100 %. Результаты сравнения показали, что процент ЦОК с разными вариантами коэкспрессии маркеров стволовости не различался в группах с наличием и отсутствием ранних признаков апоптоза в группе как без HAXT, так и с HAXT (рис. 1).

Экспрессия N-cadh – признак мезенхимального фенотипа ЭМП. В таком состоянии клетка приобретает резистентность к апоптозу. В связи с этим ранние признаки апоптоза могли проявляться с разной частотой среди ЦОК с экспрессией N-cadh и ее отсутствием. Рассмотрены варианты сочетаний ранних проявлений апоптоза (AnnV+7-AAD-) и экспрессии N-cadh независимо от признаков стволовости. Как и при оценке связи ранних проявлений апоптоза с признаками стволовости, экспрессия N-cadh определялась в тех же 4 группах (AnnV-7-AAD-HAXT-, AnnV+7-AAD-HAXT-, AnnV-7-AAD-HAXT+ и AnnV+7-AAD-HAXT+). Сумма N-cadh+ и N-cadh- ЦОК

в каждой из групп принималась за 100 %. Оказалось, что различия в частоте проявления ранних признаков апоптоза в зависимости от экспрессии N-cadh в сравниваемых группах отсутствовали. Не было выявлено и различий в частоте признаков апоптоза при сравнении групп с HAXT и без нее как среди ЦОК с N-cadh-, так и ЦОК с N-cadh+ (рис. 2).

Таким образом, результаты оценки ассоциации проявлений стволовости и ЭМП в ЦОК с наличием и отсутствием ранних признаков апоптоза дали в определенной степени малоожидаемые результаты, поскольку равновероятно встречались в этих группах. Отсутствовали и различия в группах с HAXT и без нее.

Характеристика фенотипических признаков циркулирующих опухолевых клеток в зависимости от наличия ранних и поздних признаков апоптоза. В 1-ю группу были включены 8 фенотипов ЦОК, которые не имели признаков клеточной гибели (фенотипы 1–8; см. табл. 2), во 2-ю – 3 фенотипа ЦОК (фенотипы 9–11; см. табл. 2), которые имели только признаки некроза (AnnV-7-AAD+). Третья группа, самая многочисленная, включала 25 популяций ЦОК в 2 состояниях (всего 50 фенотипов – фенотипы 12–61; см. табл. 2): без признаков апоптоза и с его ранними признаками (AnnV-7-AAD-). В 4-ю группу были включены 6 фенотипов ЦОК, которые могли быть в 4 состояниях: без признаков апоптоза (AnnV-7-AAD-), с ранними (AnnV+7-AAD-), поздними (AnnV+7-AAD+) признаками апоптоза

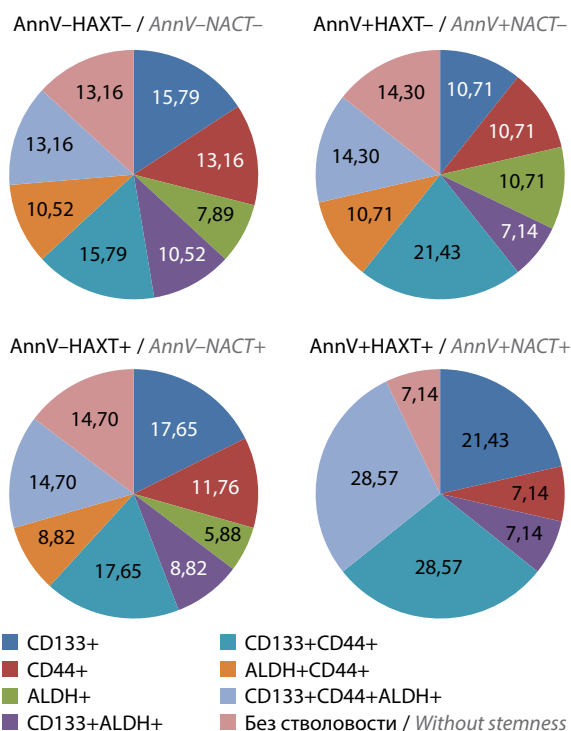


Рис. 1. Наличие признаков апоптоза (по окрашиванию аннексином V (AnnV)) в циркулирующих опухолевых клетках с разной коэкспрессией маркеров стволовости в зависимости от проведения неoadъювантной химиотерапии (HAXT)

Fig. 1. Features of apoptosis (annexin-V (AnnV) positive/negative staining) in circulating tumor cells with different co-expression of stemness markers depending on neoadjuvant chemotherapy (NACT)

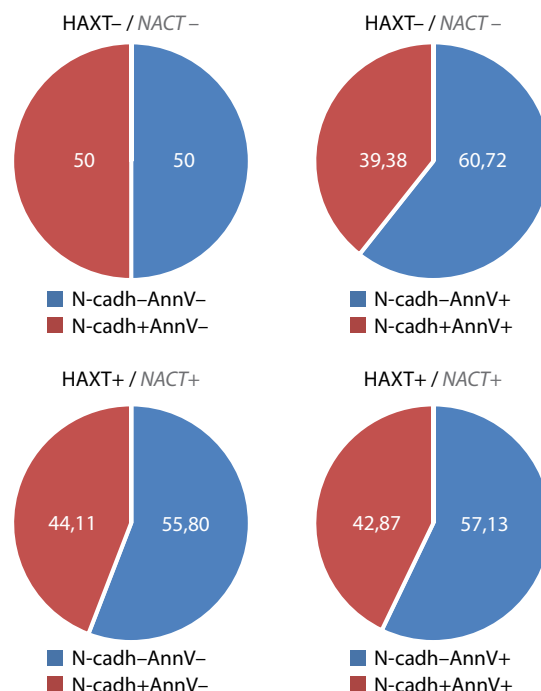


Рис. 2. Доля циркулирующих опухолевых клеток с ранними признаками апоптоза и различной экспрессией N-кадгерина в зависимости от проведения неoadъювантной химиотерапии (HAXT), %. N-cadh – N-кадгерин; AnnV – аннексин V

Fig. 2. Proportion of apoptotic circulating tumor cells with different expression of N-cadherin depending on NAC treatment, %. N-cadh – N-cadherin; AnnV – annexin-V

или некроза (AnnV-7-AAD+) – всего 17 состояний ЦОК (фенотипы 62–78; см. табл. 2).

Фенотипические различия между группами, сформированными по проявлениям апоптоза циркулирующих опухолевых клеток. Проводилось сравнение фенотипов ЦОК 1-й группы (фенотипы 1–8) с фенотипами 3-й (фенотипы 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 58, 60) и 4-й (фенотипы 62, 64, 67, 69, 73, 76) групп (см. табл. 2). Из всех вариантов сравнения фенотипических признаков ЦОК, исследованных как в группе без НАХТ, так и в группе с НАХТ после лечения, различия между группами обнаружены по сочетанию экспрессии СК7/8, CD133 и CD44/CD24.

У пациенток 1-й группы, не получавших НАХТ, преобладали фенотипы ЦОК с коэкспрессией СК7/8 и CD133, но без экспрессии CD44 (СК7/8+CD44–CD24–CD133+), в то время как в 3-й группе среди

фенотипов с коэкспрессией СК7/8 и CD133 чаще обнаруживались ЦОК с фенотипом СК7/8+CD44+CD24–CD133+ (рис. 3, I, а; $p_{1-3} = 0,025$). В отличие от 1-й и 3-й групп, в 4-й группе отсутствовали фенотипы с коэкспрессией СК7/8 и CD133, поэтому сравнение по частоте встречаемости описываемых фенотипов не проводили. Кроме 8 фенотипов с коэкспрессией СК7/8 и CD133 в 3-ю группу вошли 16 фенотипов, включающих другие варианты экспрессии СК7/8, CD133 и CD44, но без их коэкспрессии (СК7/8–CD44–CD24–CD133–, СК7/8+CD44–CD24–CD133–, СК7/8–CD44–CD24–CD133+, СК7/8–CD44+CD24–CD133–, СК7/8+CD44+CD24–CD133–, СК7/8–CD44+CD24–CD133+). В 4-й группе все 6 фенотипов имели только такие варианты экспрессии обсуждаемых маркеров (без коэкспрессии СК7/8, CD133 и CD44) (см. табл. 2). Данных фенотипических вариантов ЦОК в 3-й и 4-й группах было

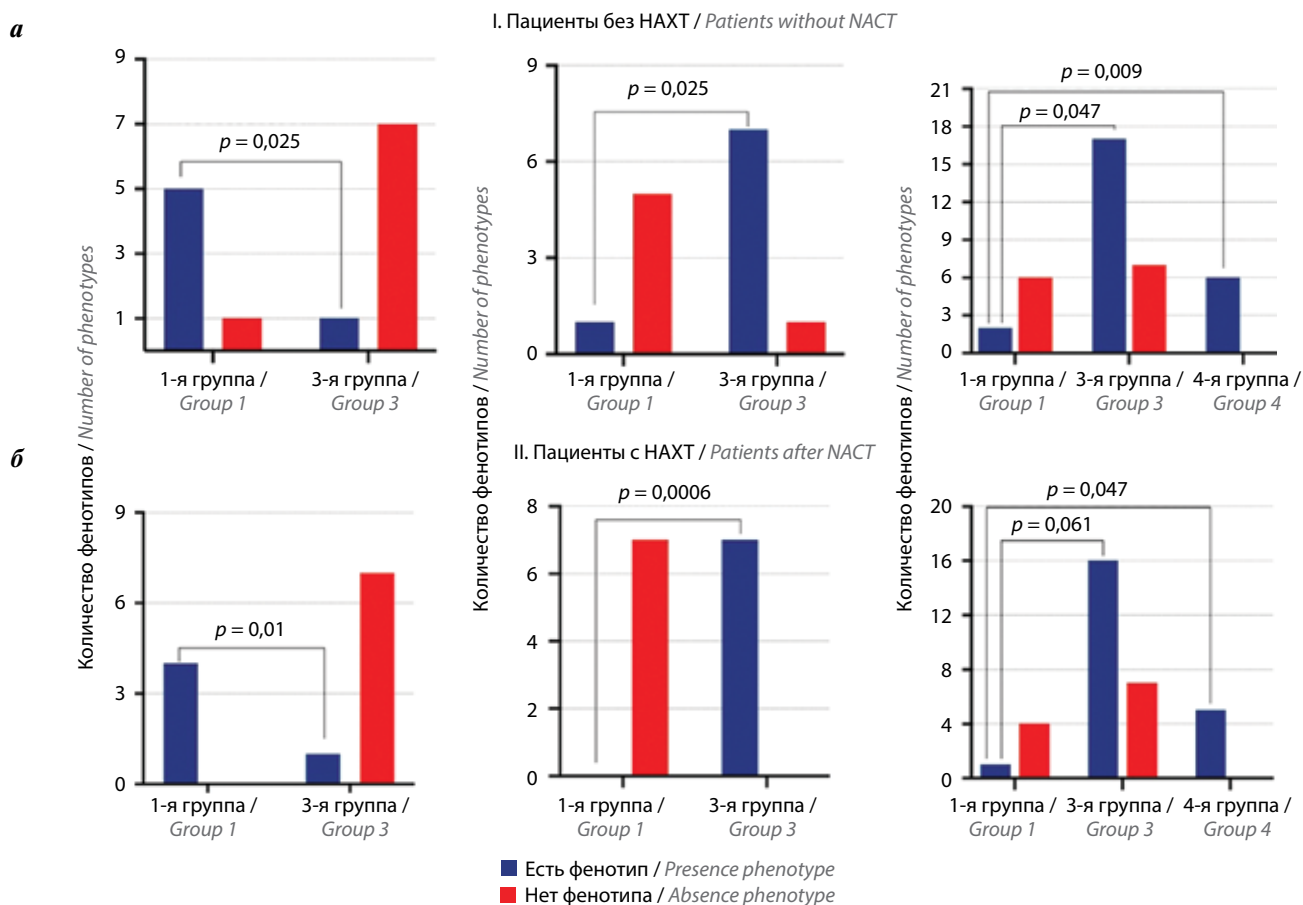


Рис. 3. Различия количества фенотипов циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) с вариантами коэкспрессии эпителиальных маркеров и маркеров стволовости в группах, сформированных по проявлениям апоптоза: а – фенотипы ЦОК с коэкспрессией СК7/8 и CD133 без экспрессии CD44 (СК7/8+CD44–CD24–CD133+); б – фенотипы ЦОК с коэкспрессией СК7/8 и CD133 с экспрессией CD44 (СК7/8+CD44+CD24–CD133+); в – фенотипы ЦОК без коэкспрессии СК7/8 и CD133 с любым вариантом экспрессии CD44 (СК7/8–CD44–CD24–CD133–, СК7/8+CD44–CD24–CD133–, СК7/8–CD44–CD24–CD133+, СК7/8+CD44–CD24–CD133+, СК7/8–CD44+CD24–CD133–, СК7/8+CD44+CD24–CD133–, СК7/8–CD44+CD24–CD133+, СК7/8+CD44+CD24–CD133+). НАХТ – неоадьювантная химиотерапия

Fig. 3. Differences in the number of circulating tumor cells (CTCs) phenotypes with co-expression variants of epithelial markers and stemness markers in groups formed by apoptosis manifestations: а – CTCs phenotypes with co-expression of CK7/8 and CD133 without CD44 expression (CK7/8+CD44–CD24–CD133+); б – CTCs phenotypes with co-expression of CK7/8 and CD133 with CD44 expression (CK7/8+CD44+CD24–CD133+); в – CTCs phenotypes without co-expression of CK7/8 and CD133 with any expression of CD44 (CK7/8–CD44–CD24–CD133–, CK7/8+CD44–CD24–CD133–, CK7/8–CD44–CD24–CD133+, CK7/8+CD44–CD24–CD133+, CK7/8–CD44+CD24–CD133–, CK7/8+CD44+CD24–CD133–, CK7/8–CD44+CD24–CD133+, CK7/8+CD44+CD24–CD133+). NACT – neoadjuvant chemotherapy

больше, чем в 1-й группе ($p_{1-3} = 0,047$; $p_{1-4} = 0,009$ соответственно) (см. рис. 3, I, в). Описанные различия встречаемости обсуждаемых фенотипических признаков ЦОК в 1-й, 3-й и 4-й группах сохраняются и у пациенток после проведения НАХТ (см. рис. 3, II).

Влияние неoadъювантной химиотерапии на фенотипический состав циркулирующих опухолевых клеток. В группе больных, не получавших НАХТ, из 78 состояний ЦОК, выявленных в общей группе наблюдения, отсутствовали 4 фенотипа. Среди 15 пациенток, получавших НАХТ, из 78 состояний ЦОК не было 26. Среди 4 состояний ЦОК, отсутствующих в группе без НАХТ, 1 имело ранние признаки апоптоза, 2 — признаки необратимого апоптоза/некроза (окрашивание 7-AAD). Из 26 состояний ЦОК, отсутствовавших после проведения НАХТ, в 21 (образцы 9, 11, 13, 15, 17, 21, 27, 31, 33, 39, 41, 45, 49, 51, 53, 57, 65, 66, 68, 71, 78; табл. 2) наблюдались различные признаки клеточной гибели: из них в 15 — ранние признаки апоптоза, в 2 — его поздние признаки, в 4 — признаки некроза. Поскольку среди не выявленных после проведения НАХТ состояний ЦОК преобладали варианты с признаками клеточной гибели, можно предположить, что отсутствие фенотипов ЦОК в определенных состояниях после НАХТ (по сравнению со спектром состояний ЦОК у пациенток без НАХТ) не случайно. Это могло быть обусловлено тем, что опухолевые клетки с проявлениями апоптоза более чувствительны к химиотерапии. Однако среди ЦОК, которые обнаруживались в крови пациенток, получавших НАХТ,

18 состояний (фенотипы 10, 19, 23, 25, 29, 35, 37, 43, 47, 55, 59, 61, 63, 70, 72, 74, 75, 77; см. табл. 2) тоже характеризовались ранними или поздними признаками апоптоза/некроза.

Для поиска фенотипических признаков, которые могли быть связаны с резистентностью или чувствительностью ЦОК с признаками апоптоза к НАХТ, сравнивали 18 состояний ЦОК с признаками апоптоза, сохранившихся после НАХТ, с 21 состояниями ЦОК с признаками апоптоза, не обнаруженных после проведения НАХТ. Оказалось, что варианты фенотипических признаков, включающих экспрессию СК7/8 и различные сочетания маркеров стволовости, характерных для ЦОК с разными проявлениями апоптоза, с одинаковой частотой встречались как в группе состояний ЦОК, сохранившихся после НАХТ, так и отсутствующих после проведения НАХТ (рис. 4).

Кроме того, в сравниваемых группах фенотипов оценивалась частота экспрессии каждого из исследованных маркеров. Оказалось, что по большинству маркеров различия отсутствовали. Исключение составляет экспрессия CD133. Она чаще встречается в 18 фенотипах ЦОК, сохранившихся после НАХТ ($p = 0,0104$) (рис. 5). Эти результаты позволяют предположить, что, вероятно, после НАХТ ЦОК, в которых уже были начальные или поздние признаки апоптоза, но отсутствовала экспрессия CD133, с большей вероятностью погибают в периферической крови.

Наряду с описанными отличиями сравниваемых групп 3 фенотипа CD45—EpCam—СК7/8+CD44+

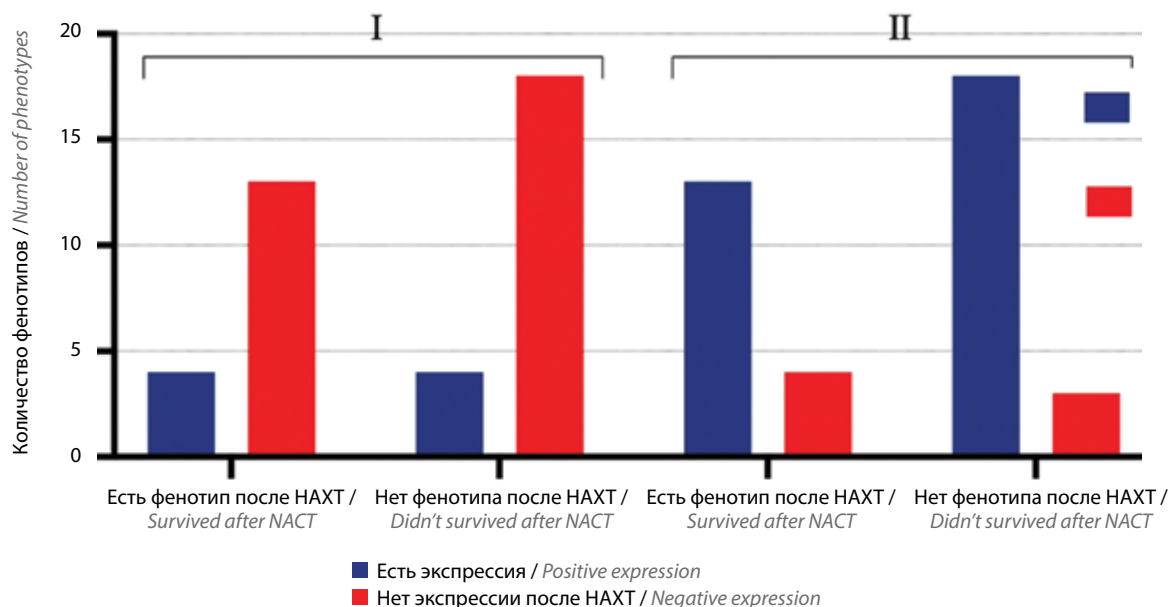


Рис. 4. Различия количества фенотипов циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) с коэкспрессией и с отсутствием коэкспрессии эпителиальных маркеров и маркеров стволовости, сохранившихся и не сохранившихся после неoadъювантной химиотерапии (НАХТ): I — фенотипы ЦОК с экспрессией СК7/8+, CD44+CD24-, CD133+; II — фенотипы ЦОК с вариантами экспрессии СК7/8—CD44—CD24—CD133-, СК7/8+CD44—CD24—CD133-, СК7/8—CD44—CD24—CD133+, СК7/8—CD44+CD24—CD133-, СК7/8+CD44+CD24—CD133-, СК7/8—CD44+CD24—CD133+

Fig. 4. Differences in the number of circulating tumor cells (CTCs) phenotypes with and without coexpression of epithelial markers and stemness markers in cells which were survived/didn't survived after neoadjuvant chemotherapy (NACT) treatment: I — CTC phenotypes with expression of CK7/8+, CD44+CD24-, CD133+; II — CTC phenotypes with expression variants are listed below: CK7/8—CD44—CD24—CD133-, CK7/8+CD44—CD24—CD133-, CK7/8—CD44—CD24—CD133+, CK7/8—CD44+CD24—CD133-, CK7/8+CD44+CD24—CD133-, CK7/8—CD44+CD24—CD133+

CD24–N-cadh+ALDH–CD133+7-AAD–AnnV– ($\chi^2 = 3,6$; $p = 0,05$), CD45–EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH+CD133+7-AAD–AnnV– ($\chi^2 = 5,9$; $p = 0,01$) и CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133+7-AAD–AnnV– ($\chi^2 = 4,40$; $p = 0,034$) выявлялись чаще у больных, получавших НАХТ. Все эти фенотипы характеризовались отсутствием ранних и поздних признаков апоптоза, а также наличием признаков стволовости по экспрессии CD133+, которая либо была единственным признаком стволовости, либо сочеталась с CD44+/CD24– и/или ALDH.

Таким образом, разделение обнаруженных у пациентов 78 субпопуляций ЦОК в зависимости от отсутствия/наличия у них ранних признаков апоптоза или поздних признаков апоптоза/некроза позволило выявить фенотипические признаки ЦОК, резистентных или склонных к развитию апоптоза и некроза. Более резистентными к апоптозу оказались CK7/8+CD44–CD24–CD133+–ЦОК. Напротив, если наряду с коэкспрессией CK7/8 и CD133 у ЦОК присутствовали признаки стволовости CD44+CD24– или отсутствовала коэкспрессия CK7/8 и CD133 независимо от экспрессии CD44, ЦОК имели признаки апоптоза. По-видимому, ЦОК, в которых уже были начальные или поздние признаки апоптоза, но отсутствовала экспрессия CD133, с большей вероятностью погибают в периферической крови. Напротив, фенотипы с признаками раннего апоптоза, но с экспрессией CD133, судя по их наличию в крови, более резистентны к НАХТ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основная цель исследования состояла в выявлении связи фенотипических признаков ЦОК с проявлениями апоптоза. Результаты исследования продемонстрировали выраженную фенотипическую гетерогенность ЦОК по экспрессии маркеров эпителия (EpCam, CK7/8), стволовости (CD44+/CD24–, CD133 и ALDH) и мезенхимного фенотипа ЭМП (N-cadh). Из-за значительного разнообразия не удалось сгруппировать исследуемые случаи по общности фенотипов ЦОК, отражающих разные проявления апоптоза. В каждом случае количество состояний фенотипов варьировало от 2 до 31.

В связи с этим исследуемые фенотипы ЦОК были разделены на группы по объединяющим их признакам. В основу группировки было положено наличие/отсутствие ранних или поздних признаков апоптоза/некроза. Сорок два выявленных фенотипа были разделены на 4 группы. Восемь фенотипов ЦОК встречались только в жизнеспособном состоянии, 3 – были только в 1 состоянии (имели проявления некроза). Шесть фенотипов характеризовались как отсутствием признаков апоптоза, так и наличием ранних или поздних его признаков. В самой многочисленной группе (25 фенотипов) ЦОК обнаруживались в 2 состояниях: без признаков апоптоза и с ранними его признаками.

В соответствии с целью исследования основное внимание было уделено определению связи проявлений апоптоза с фенотипическими признаками ЦОК. Прежде всего сравнивалась частота обнаружения 1, 2 или 3 маркеров стволовости в ЦОК с наличием/отсутствием признаков апоптоза. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что стволовые клетки более устойчивы к развитию апоптоза. Это показано для стволовых клеток, экспрессирующих CD44+/CD24(–/low) [12].

Высокую степень резистентности к апоптозу клеток опухоли, экспрессирующих CD44+, связывают с более высокой экспрессией Bcl-2 [20]. CD133 также обладает способностью ингибировать развитие апоптоза [10]. Например, показано, что экспрессия CD133 подавляет гибель клеток рака толстой кишки через активацию Akt-опосредованного пути, препятствующего апоптозу [21]. Ингибирует апоптоз и экспрессия ALDH в клетках. Блокирование ALDH усиливает индукцию апоптоза в клетках карциномы яичников [11]. Остается неизвестным, как соотносится способность CD133 и ALDH ингибировать апоптоз в стволовых клетках с экспрессией разных маркеров стволовости или их различных сочетаний.

Результаты исследования демонстрируют более сложные отношения между характеристиками стволовости ЦОК и проявлениями апоптоза. Против ожидания признаки стволовости по 1 маркеру (или CD44+/CD24–, или CD133, или ALDH) или по различным вариантам коэкспрессии маркеров стволовости с равной вероятностью встречались как в ЦОК без признаков апоптоза, так и в ЦОК с ранними его признаками.

В то же время в определенных условиях проявлялась протективная по отношению к апоптозу роль CD133. Это было обнаружено при сопоставлении 4 групп фенотипов ЦОК. Результаты сравнения 1-й группы фенотипов, не имеющих признаков апоптоза, с 3-й и 4-й группами фенотипов (как без признаков апоптоза, так и с разными его проявлениями) позволяют предположить, что коэкспрессия CD133 с CK7/8 может рассматриваться в качестве одного из существенных факторов, повышающих резистентность к апоптозу. Этот феномен трудно объяснить стволовыми свойствами клеток, экспрессирующих CD133, поскольку в клетках, экспрессирующих CD133, но не экспрессирующих CK7/8, наблюдались проявления апоптоза. Почему коэкспрессия CK7/8 с CD133 сообщает описанные признаки? Если о связи экспрессии цитокератинов 8/18 с апоптозом имеется информация, то данных о связи экспрессии CK7 с апоптозом нет. Поскольку в нашем наблюдении в некоторых фенотипах коэкспрессия CK7/8 и CD133 сочеталась с отсутствием в ЦОК экспрессии EpCam – признака ЭМП, сохранение экспрессии CK7/8 можно рассматривать как проявление эпителиального фенотипа ЭМП, который в сочетании с экспрессией CD133, вероятно, сообщает клеткам опухоли устойчивость к апоптозу.

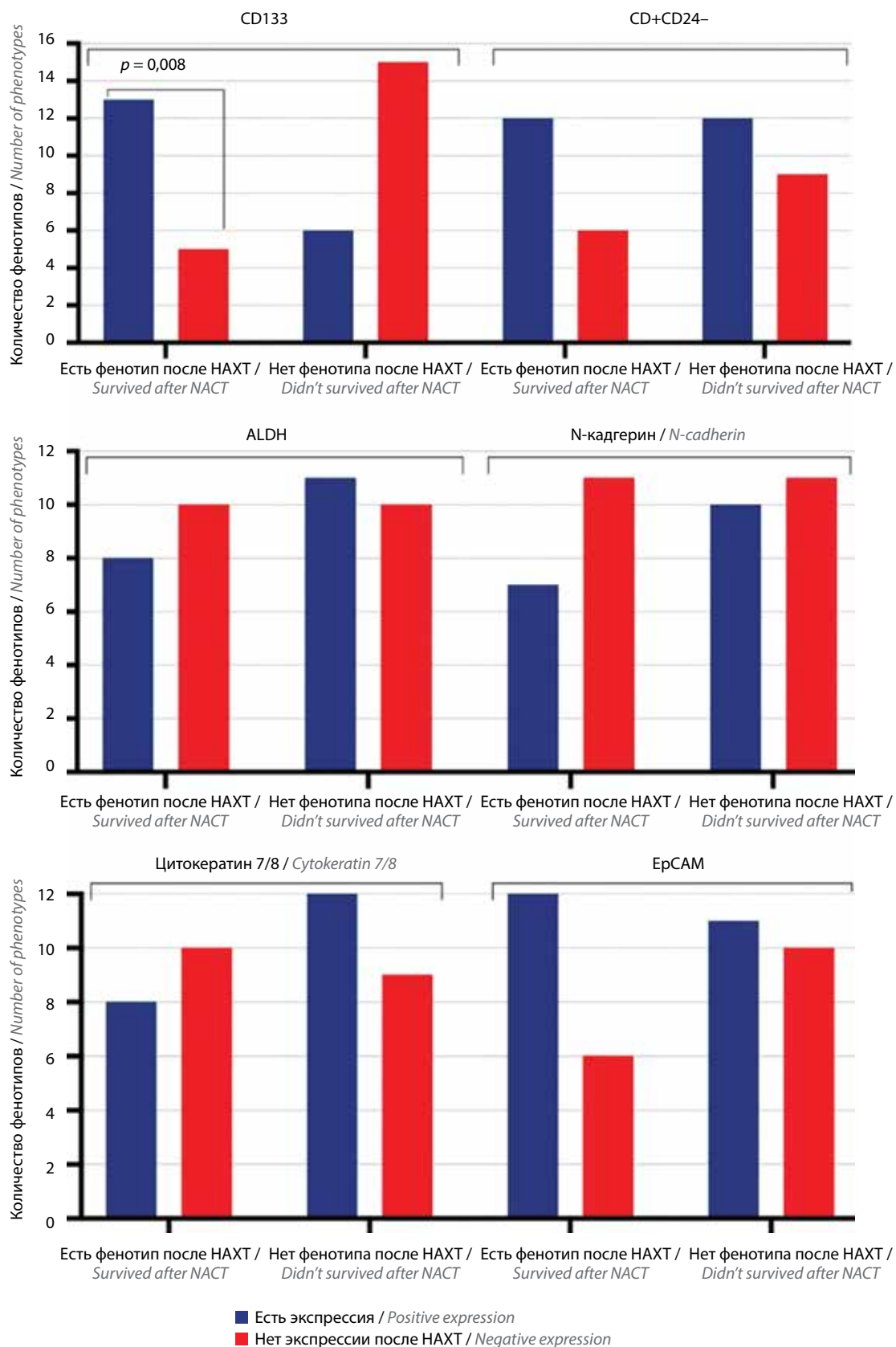


Рис. 5. Различия количества фенотипов циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) с экспрессией CD133, CD44+CD24-, ALDH, N-кадгерина, цитокератина 7/8 и EpCAM, сохранившихся и не сохранившихся после неoadъювантной химиотерапии (НАХТ)

Fig. 5. Differences in the number of circulating tumor cells (CTCs) phenotypes with expression of CD133, CD44+CD24-, ALDH, N-cadherin, cytokeratin 7/8 and EpCAM in cells which were survived/didn't survived after neoadjuvant chemotherapy (NACT)

Вместе с тем, по-видимому, CD133 ассоциирован с резистентностью ЦОК с проявлениями апоптоза при НАХТ. Такое предположение можно сделать после сопоставления фенотипов ЦОК с признаками апоптоза, которые обнаруживались или отсутствовали после НАХТ. Оказалось, что ЦОК с признаками апоптоза, исчезнувшие после НАХТ, в отличие от сохранившихся в циркуляции характеризовались редкостью экспрессии CD133. Эти факты позволяют предположить, что экспрессия CD133 в опухолевых клетках с ранними признаками апоптоза способствует их выживанию в условиях НАХТ и что ЦОК, в которых уже были начальные или поздние признаки апоптоза, но отсутствовала экспрессия CD133, с большей вероятностью погибают в периферической крови.

Сложный характер связи с проявлениями апоптоза имели наиболее изученные маркеры стволовости CD44+/CD24-. Если отсутствие этого признака ЦОК при коэкспрессии СК7/8 и CD133 было ассоциировано с отсутствием признаков апоптоза, то фенотипы ЦОК с вариантом экспрессии СК7/8+CD44+/CD24-CD133+ находились в 2 состояниях: без признаков апоптоза и с наличием только ранних его признаков. Отсутствие таких фенотипических проявлений в 4-й группе фенотипов, которые были представлены разными состояниями (как без признаков апоптоза, так с ранними и поздними признаками апоптоза/некроза), позволяет предположить, что наличие стволовости по CD44+/CD24 при коэкспрессии СК7/8 и CD133 не препятствует инициации апоптоза, но может иметь отношение к его обратимости.

Следует отметить, что в соответствии с результатами исследования не только проявления стволовости в ЦОК сочетались с проявлениями апоптоза, но и определенные признаки ЭМП. Одни и те же фенотипы ЦОК в состояниях без и с наличием ранних признаков апоптоза с одинаковой частотой экспрессировали N-cadh (признак мезенхимного фенотипа ЭМП), и, следовательно, проявления апоптоза не сочетались с экспрессией N-cadh, хотя известна его способность ингибировать апоптоз [22].

Представляется, что противоречия, связанные с сочетанием разных вариантов проявления стволовости и ЭМП с наличием признаков апоптоза, могут быть поняты с позиций обратимости ранних проявлений апоптоза. Возможность его обратимости иллюстрируется данными, согласно которым клетки карциномы молочной железы с индуцированным апоптозом могут восстанавливаться. При этом среди реверсированных клеток наблюдался большой процент стволовых клеток (CD44+/CD24-), которые обладали повышенной туморогенностью и метастазировали в лимфатические узлы [17, 23]. В свете этих данных в наших исследованиях экспрессию CD44+/CD24- можно рассматривать как фактор, не только не препятствующий появлению признаков апоптоза, но и имеющий отношение к его обратимости. Близок

к понятию «обратимый апоптоз» феномен «неудачного апоптоза» (failed apoptosis) с ограниченной активацией каспаз и повреждением генома, но с отсутствием гибели клеток. Выжившие клетки также приобретают агрессивные фенотипы с высокой частотой появления стволовоподобных свойств, повышенной подвижностью и увеличенной выживаемостью. Описанный феномен свойственен карциномам молочной железы с экспрессией рецепторов к эстрогенам и рассматривается как потенциальный механизм, с помощью которого неудавшийся апоптоз способствует агрессивному течению рака [18]. Судя по представленным результатам, можно предположить, что стволовость, проявляющаяся экспрессией разных ее маркеров, неодинаково сопряжена как с устойчивостью к апоптозу, так и с вероятностью его обратного развития.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценка ЦОК с точки зрения анализа проявлений апоптоза в клетках с разными вариантами стволовости и ЭМП, несмотря на выраженную фенотипическую и межперсональную гетерогенность, позволила выявить фенотипические признаки ЦОК, сопряженные с большей или меньшей вероятностью развития апоптоза. Коэкспрессия СК7/8 и CD133 при отсутствии экспрессии CD44 более характерна для группы фенотипов ЦОК без признаков апоптоза. Напротив, клетки с коэкспрессией СК7/8 и CD133 ЦОК с маркерами стволовости CD44+CD24-, как и клетки с отсутствием коэкспрессии СК7/8 и CD133, могли иметь признаки апоптоза.

Фенотипы с признаками раннего апоптоза, но с экспрессией CD133, в отличие от ЦОК без экспрессии CD133 более резистентны к НАХТ. Кажущиеся противоречия, связанные с наличием в части фенотипов ЦОК признаков апоптоза, несмотря на экспрессию маркеров стволовости или N-cadh, по-видимому, разрешатся, если рассматривать результаты с учетом вероятности обратимости ранних проявлений апоптоза или развития «неудачного апоптоза». Это делает актуальным поиск признаков (маркеров) обратимости ранних проявлений апоптоза.

На наш взгляд, результаты исследования позволяют предполагать, что: 1) коэкспрессия CD133 и СК7/8 сопряжена или причинно-следственно связана с резистентностью к апоптозу; 2) ЦОК с предшествующей в первичной опухоли инициацией апоптоза при отсутствии экспрессии CD133 при проведении НАХТ менее устойчивы к гибели; 3) экспрессия CD133 в ЦОК с ранними признаками апоптоза делает клетки более резистентными к НАХТ; 4) экспрессия по маркерам CD44+CD24- может быть связана с обратимостью ранних проявлений апоптоза.

Можно заключить, что существуют фенотипические признаки ЦОК, сопряженные со склонностью или устойчивостью к апоптозу. Дальнейшие исследования,

направленные на сопоставление связи маркеров склонности или резистентности к апоптозу, обратимости апоптоза, с одной стороны, с непосредственно-

ми отсроченными эффектами химио/радиотерапии, с другой, позволяя выделить эффективные прогностические маркеры с целью оптимизации терапии РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Vismara M., Reduzzi C., Daidone M.G. et al. Circulating tumor cells (CTCs) heterogeneity in metastatic breast cancer: different approaches for different needs. *Adv Exp Med Biol* 2020;1220: 81–91. DOI: 10.1007/978-3-030-35805-1_6
2. Савельева О.Е., Таширева Л.А., Булдаков М.А. и др. Экспрессия CXCR4 в различных популяциях циркулирующих и одиночных опухолевых клеток рака молочной железы. *Сибирский онкологический журнал* 2018;17(4):75–80. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-4-75-80
Savelieva O.E., Tashireva L.A., Buldakov M.A. et al. CXCR4 expression in different subsets of CTCs and single (detached) breast cancer cells. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2018;17(4):75–80. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-4-75-80
3. Krog B.L., Henry M.D. Biomechanics of the circulating tumor cell microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 2018;1092:209–33. DOI: 10.1007/978-3-319-95294-9_11
4. Meng S., Tripathy D., Frenkel E.P. et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8152–62. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1110
5. Aceto N., Bardia A., Miyamoto D.T. et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 2014;158(5):1110–22. DOI: 10.1016/j.cell.2014.07.013
6. Weinberg R.A. Leaving home early: reexamination of the canonical models of tumor progression. *Cancer Cell* 2008;14(4):283–4. DOI: 10.1016/j.ccr.2008.09.009
7. Buchheit C.L., Weigel K.J., Schafer Z.T. Cancer cell survival during detachment from the ECM: multiple barriers to tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2014;14(9):632–41. DOI: 10.1038/nrc3789
8. Yu T., Wang C., Xie M. et al. Heterogeneity of CTC contributes to the organotropism of breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2021;137:111314. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111314
9. Barzegar Behrooz A., Syahir A., Ahmad S. CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. *J Drug Target* 2019;27(3):257–69. DOI: 10.1080/1061186X.2018.1479756
10. Guo F., Yang Z., Sehouli J. et al. Blockade of ALDH in cisplatin-resistant ovarian cancer stem cells in vitro synergistically enhances chemotherapy-induced cell death. *Curr Oncol* 2022;29(4):2808–22. DOI: 10.3390/currenol29040229
11. Chen C., Zhao S., Karnad A. et al. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol* 2018;11(1):64. DOI: 10.1186/s13045-018-0605-5
12. Cao Z.-Q., Wang Z., Leng P. Aberrant N-кадгерин expression in cancer. *Biomed Pharmacother* 2019;118:109320. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109320
13. Jordan N.V., Bardia A., Wittner B.S. et al. HER2 expression identifies dynamic functional states within circulating breast cancer cells. *Nature* 2016;537(7618):102–6. DOI: 10.1038/nature19328
14. Kallergi G., Konstantinidis G., Markomanolaki H. et al. Apoptotic circulating tumor cells in early and metastatic breast cancer patients. *Mol Cancer Ther* 2013;12(9):1886–95. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1167
15. Spiliotaki M., Mavroudis D., Kapranou K. et al. Evaluation of proliferation and apoptosis markers in circulating tumor cells of women with early breast cancer who are candidates for tumor dormancy. *Breast Cancer Res* 2016;18(6):485. DOI: 10.1186/s13058-014-0485-8
16. Jansson S., Bendahl P.O., Larsson A.M. et al. Prognostic impact of circulating tumor cell apoptosis and clusters in serial blood samples from patients with metastatic breast cancer in a prospective observational cohort. *BMC Cancer* 2016;16:433. DOI: 10.1186/s12885-016-2406-y
17. Pandya V., Githaka J.M., Patel N. et al. BIK drives an aggressive breast cancer phenotype through sublethal apoptosis and predicts poor prognosis of ER-positive breast cancer. *Cell Death Dis* 2020;11(6):448. DOI: 10.1038/s41419-020-2654-2
18. Xu Y., So C., Lam H.M. et al. Flow cytometric detection of newly-formed breast cancer stem cell-like cells after apoptosis reversal. *J Vis Exp* 2019;143. DOI: 10.3791/58642
19. Zimmermann M., Meyer N. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. *Methods Mol Biol* 2011;740:57–63. DOI: 10.1007/978-1-61779-108-6_8
20. Madjd Z., Mehrjerdi A.Z., Sharifi A.M. et al. CD44+ cancer cells express higher levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in breast tumours. *Cancer Immun* 2009;9:4.
21. Mori Y., Takeuchi A., Miyagawa K. et al. CD133 prevents colon cancer cell death induced by serum deprivation through activation of Akt-mediated protein synthesis and inhibition of apoptosis. *FEBS Open Bio* 2021;11(5):1382–94. DOI: 10.1002/2211-5463.13145
22. Nguyen P.T., Nguyen D., Chea C. et al. Interaction between N-cadherin and decoy receptor-2 regulates apoptosis in head and neck cancer. *Oncotarget* 2018;9(59):31516–30. DOI: 10.18632/oncotarget.25846
23. Xu Y., So C., Lam H.M. et al. Apoptosis reversal promotes cancer stem cell-like cell formation. *Neoplasia* 2018;20(3):295–303. DOI: 10.1016/j.neo.2018.01.005

Вклад авторов

Е.С. Григорьева, Л.А. Таширева, В.В. Алифанов: сбор данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи; В.М. Перельмутер, М.В. Завьялова, О.Е. Савельева, С.В. Вторушин, Е.Л. Чойнзонов, Н.В. Чердынцева: обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи.

Authors' contribution

E.S. Grigorieva, L.A. Tashireva, V.V. Alifanov: data collection for analysis, review of publications on the topic of the article, article writing; V.M. Perelmuter, M.V. Zavyalova, O.E. Savelyeva, S.V. Vtorushin, E.L. Choyznzonov, N.V. Cherdyntseva: review of publications on the topic of the article, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.М. Перельмутер / V.M. Perelmuter: <https://orcid.org/0000-0002-7633-9620>

Е.С. Григорьева / E.S. Grigorieva: <https://orcid.org/0000-0003-4737-8951>

М.В. Завьялова / M.V. Zavyalova: <https://orcid.org/0000-0001-9429-9813>

Л.А. Таширева / L.A. Tashireva: <https://orcid.org/0000-0003-2061-8417>

В.В. Алифанов / V.V. Alifanov: <https://orcid.org/0000-0002-3025-4445>

О.Е. Савельева / O.E. Saveleva: <https://orcid.org/0000-0002-0301-8455>

С.В. Вторушин / S.V. Vtorushin: <https://orcid.org/0000-0002-1195-4008>

Е.Л. Чойнзонов / E.L. Choyznzonov: <https://orcid.org/0000-0002-3651-0665>

Н.В. Чердынцева / N.V. Cherdyntseva: <https://orcid.org/0000-0003-1526-9013>

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 № 19-75-30016). В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук.

Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 19-75-30016). The equipment of the Center for Collective Use "Medical Genomics" of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences was used in the work.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным комитетом Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук.

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 Scientific Research Institute of Oncology of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences.

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

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-112-116



Сигнальный путь микроРНК-484/Akt в регуляции чувствительности клеток рака молочной железы к противоопухолевым препаратам

О.Е. Андреева, Д.В. Сорокин, А.М. Щербаков, Ю.Ю. Щеголев, М.В. Гудкова, М.А. Красильников*Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24***Контакты:** Михаил Александрович Красильников krasilnikovm1@yandex.ru

Развитие приобретенной резистентности злокачественных опухолей к препаратам направленного действия, таким как таргетные и гормональные препараты, сопряжено с перестройкой внутриклеточной сигнальной сети и активацией незаблокированных путей передачи ростового сигнала. Непосредственное участие в развитии и поддержании подобных изменений принимают эпигенетические регуляторы, в частности некодирующие микроРНК, контролирующие уровень экспрессии конкретных сигнальных белков. Ранее мы показали, что развитие резистентности клеток рака молочной железы к ингибиторам mTOR (mammalian target of rapamycin) и блокаторам эстрогенового сигналинга сопровождается конститутивной активацией протеинкиназы Akt – основного антиапоптотического белка клеток. **Цель настоящей работы** – исследование роли отдельных микроРНК в регуляции экспрессии Akt и формировании резистентного фенотипа клеток рака молочной железы.

Мы показали, что повышение активности протеинкиназы Akt в сублиниях MCF-7, резистентных к тамоксифену или рапамицину, ассоциировано со снижением уровня микроРНК-484 – одного из супрессоров Akt. Трансфекция в клетки MCF-7 микроРНК-484 не влияет на активность эстрогенового сигналинга, но приводит к выраженному снижению экспрессии Akt и сопровождается повышением чувствительности клеток к тамоксифену и рапамицину. Полученные данные свидетельствуют об участии сигнального пути микроРНК-484/Akt в сенситизации клеток рака молочной железы к действию таргетных и гормональных препаратов, что позволяет рассматривать микроРНК-484 в качестве перспективного кандидата для разработки на его основе новых противоопухолевых соединений.

Ключевые слова: рак молочной железы, микроРНК, протеинкиназа Akt, тамоксифен, рапамицин, резистентность**Для цитирования:** Андреева О.Е., Сорокин Д.В., Щербаков А.М. и др. Сигнальный путь микроРНК-484/Akt в регуляции чувствительности клеток рака молочной железы к противоопухолевым препаратам. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(4):112–6. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-112-116

MicroRNA-484/Akt axis in the regulation of breast cancer cells sensitivity to antitumor drugs

O.E. Andreeva, D.V. Sorokin, A.M. Scherbakov, Y.Y. Shchegolev, M.V. Gudkova, M.A. Krasil'nikov*Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia***Contacts:** Mikhail Aleksandrovich Krasil'nikov krasilnikovm1@yandex.ru

The development of acquired resistance of malignant tumors to specific drugs, such as target and hormonal drugs, is usually associated with a rearrangement of the intracellular signaling network and activation of unblocked growth pathways. Epigenetic regulators, in particular, non-coding miRNAs that control the level of expression of specific signaling proteins, are directly involved in the development and maintenance of such changes. We have previously shown that the development of resistance of breast cancer cells to mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitors and hormonal drugs is accompanied by constitutive activation of protein kinase Akt, the key anti-apoptotic protein.

Aim. To study the role of microRNAs in the regulation of Akt expression and the formation of a resistant phenotype of breast cancer cells.

We have shown that Akt activation in the tamoxifen- or rapamycin-resistant MCF-7 sublines is associated with a decrease in the level of miRNA-484, one of the Akt suppressors. Transfection of microRNA-484 into MCF-7 cells does not affect the activity of estrogen signaling, but leads to a marked decrease in Akt expression and is accompanied by an increase in cell sensitivity to tamoxifen and rapamycin. The obtained data demonstrate the involvement of the miRNA-484/Akt axis

in the breast cancer cells' sensitization to target and hormonal drugs, which allows us to consider miRNA-484 as a potential candidate for drug development to cure resistant cancers.

Keywords: breast cancer, microRNA, protein kinase Akt, tamoxifen, rapamycin, resistance

For citation: Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2022;9(4):112–6. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-112-116

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, развитие резистентности опухолевых клеток к препаратам направленного действия, таким как таргетные соединения или гормональные препараты, сопряжено с перестройкой сигнальной сети и активацией параллельных, незаблокированных, сигнальных путей. Ранее в экспериментах на культивируемых *in vitro* клетках рака молочной железы (РМЖ) MCF-7 мы показали, что развитие резистентности к ингибиторам mTOR (mammalian target of rapamycin) (рапамицину, метформину) и блокаторам эстрогенового сигналинга (антиэстрогену тамоксифену) в обоих случаях сопровождается конститутивной активацией протеинкиназы Akt — основного антиапоптотического белка [1–3].

Одними из ключевых эпигенетических регуляторов в клетках являются некодирующие микроРНК, изменение содержания которых может во многом определять уровень экспрессии конкретных сигнальных белков. Идентифицированы микроРНК, ответственные за регуляцию экспрессии/активности протеинкиназы Akt, среди которых центральное место занимает микроРНК-484, активно экспрессируемая в клетках РМЖ [4–7]. МикроРНК-484 длиной 22 нуклеотида локализована в промоторной области гена MARF1 (meiosis regulator and mRNA stability factor 1) на хромосоме 16p13.11 в человеческом геноме. Физиологические функции miR-484 у млекопитающих многогранны и включают влияние на стресс эндоплазматического ретикулума, окислительный стресс, воспаление, пролиферацию клеток и апоптоз [8].

Целью настоящей работы явилось дальнейшее изучение роли протеинкиназы Akt в формировании и поддержании резистентного фенотипа клеток и исследование влияния микроРНК-484 на экспрессию протеинкиназы Akt и чувствительность клеток РМЖ к противоопухолевым препаратам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках РМЖ MCF-7 (ATCC HTB-22TM). В работе использовались методы, представленные ниже.

Культивирование клеток. Клетки РМЖ человека линии MCF-7 культивировали в стандартной среде DMEM (ООО «ПанЭко», Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10 % эмбриональной сыворотки телят (FBS HyClone, США) и гентамицин (50 ед./мл) (ООО «ПанЭко», Россия) при 37 °C и 5 % CO₂. Культивирование клеток выполняли в инкубаторе NU-5840E (NuAir,

США). Тамоксифен-резистентная сублиния MCF-7 была получена при длительном культивировании родительских клеток с тамоксифеном, как описано ранее [9]. При анализе скорости роста количество клеток определяли с использованием МТТ-теста, основанного на восстановлении живыми клетками реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2) — 2,5-дифенилтетразол бромида) в кристаллы формазана (нерастворимые в культуральных средах).

Анализ микроРНК. Подготовка библиотек и сиквенс проводились ЗАО «Геноаналитика» (Россия). Экстракция микроРНК выполнялась с помощью наборов PureLink RNA Micro Kit (#12183–016, Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Подготовка библиотек проводилась с помощью наборов NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina (E7330S).

Конструкции микроРНК. В работе использовались следующие конструкции микроРНК (ООО «Синтол», Россия): 1) для проведения контрольной трансфекции — микроРНК scrambled (случайная последовательность): scr. miR forward 5'-P-UUCUCCGAACGUGU-CACGU-OH-3', scr. miR reverse 5'-P-ACGUGACACGU UCGGAGAA-OH-3'; 2) микроРНК-484: hsa-miR-484 forward 5'-P-UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU-OH-3', hsa-miR-484 reverse 5'-P-CCCGGGGGGUGACCCUG GCU-OH-3. РНК растворяли в буфере (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) в концентрации 100 мкМ и проводили отжиг по стандартной методике. Трансфекцию РНК в конечной концентрации 50 нМ выполняли с использованием реагента Lipofectamine 2000 PRO (Thermo Fisher Scientific) по методике производителя.

Репортерный анализ. Для определения транскрипционной активности рецептора эстрогенов проводили трансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген-репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом, любезно предоставленной Dr. George Reid [10]. Для контроля за эффективностью и потенциальной токсичностью процедуры трансфекции применяли котрансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген β-галактозидазы. Активность люциферазы измерялась по стандартному протоколу (Promega, США) на люминометре Tecan Infinite M200 Pro (США). Расчет активности люциферазы проводили в условных единицах (отношение общей активности люциферазы к активности галактозидазы в исследованных образцах).

Иммуноблоттинг. Клетки на стадии формирования 80 % монослоя дважды промывали на чашках (60 мм;

Corning, США) 2 мл фосфатного буфера. Для получения тотального клеточного экстракта к образцам добавляли по 130 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-НСl pH 7,4, 1 % Igepal CA-630, 150 мМ NaCl, 1 мМ тетраацетата этилендиамина, 1 мМ дитиотреитола, 1 мкг/мл апротинина, лейпептина и пепстатина, 1 мМ фторида натрия и ортованадата натрия (Merck, США). Образцы клеточных экстрактов центрифугировали (10 000 g, 10 мин, 4 °С, центрифуга Eppendorf 5417R) и проводили стандартный электрофорез и иммуноблоттинг, как описано ранее [1]. В цитозольных экстрактах исследовали содержание рецептора эстрогена α (ER α), Akt, phospho-Akt (Cell Signaling Technology, США). Для контроля эффективности иммуноблоттинга использовали антитела к α -тубулину (Cell Signaling Technology, США).

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Microsoft Excel. Во всех случаях статистические критерии считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ микроРНК в родительских и резистентных клетках MCF-7. При изучении внутриклеточного пула микроРНК было выявлено более 600 вариантов микроРНК, активно экспрессируемых в клетках MCF-7. Сравнительный анализ профиля микроРНК в клетках MCF-7 и тамоксифен-резистентных клетках MCF-7/T позволил идентифицировать свыше 60 микроРНК, экспрессия которых не менее чем на 50 % снижена в резистентных клетках. Последующий анализ *in silico* биологической активности идентифицированных микроРНК показал присутствие среди микроРНК, экспрессия которых снижена в резистентных клетках MCF-7/T, микроРНК-484, являющейся супрессором Akt и активно синтезируемой клетками РМЖ. В дальнейших экспериментах по трансфекции в клетки MCF-7 микроРНК-484 мы продемонстрировали выраженное подавление экспрессии и активности Akt при накоплении в клетках микроРНК-484 (рис. 1).

МикроРНК-484 и эстрогеновый сигналинг. Для исследования возможного влияния микроРНК-484 на гормональный аппарат клеток был проведен анализ экспрессии и активности рецептора эстрогенов в клетках MCF-7 после трансфекции микроРНК. Как видно из представленных данных, ни экспрессия, ни транскрипционная активность эстрогенового рецептора не снижались в присутствии микроРНК-484, что позволяет исключить непосредственное влияние последней на эстрогеновый сигналинг (рис. 2).

Влияние микроРНК-484 на чувствительность клеток к тамоксифену и рапамицину. Представленные выше данные, а именно: 1) способность микроРНК-484 подавлять экспрессию и активность протеинкиназы Akt и 2) сниженное содержание микроРНК-484, наряду с высокой активностью Akt, в резистентных клетках позволили предположить, что направленное снижение

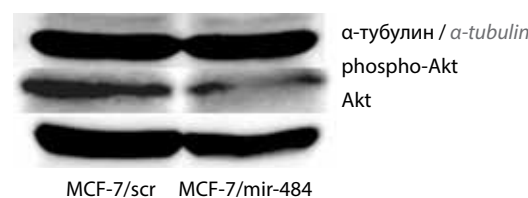


Рис. 1. Иммуноблоттинг образцов клеток MCF-7 после трансфекции микроРНК/scrambled и микроРНК-484. Гибридизация проводилась с антителами к phospho-Akt и Akt, нанесение белков контролировалось по гибридизации с антителами к α -тубулину. Представлены результаты одного из 3 независимых экспериментов

Fig. 1. Immunoblotting of the protein samples from MCF-7 cells transfected with mir/scrambled and mir-484. The hybridization was performed with the antibodies against phospho-Akt and Akt, protein loading was controlled by membrane hybridization with α -tubulin antibodies. The blot represents the results of one of the three similar experiments

активности последней, в том числе через сигнальный путь микроРНК-484/Akt, может приводить к повышению чувствительности клеток РМЖ к противоопухолевым агентам. Для проверки этого предположения были проведены эксперименты по оценке чувствительности клеток MCF-7 к тамоксифену и рапамицину после трансфекции микроРНК-484. Мы обнаружили, что трансфекция последней в клетки приводит к заметному повышению чувствительности клеток к цитостатическому действию обоих препаратов (рис. 3). Это свидетельствует о непосредственном участии микроРНК-484 в регуляции ответа опухолевых клеток на цитостатические агенты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие приобретенной лекарственной устойчивости опухолевых клеток является одним из основных факторов, ограничивающих эффективность применения химиотерапии для лечения злокачественных новообразований. В связи с этим особое внимание в современных онкологических исследованиях уделяется поискам экспериментальных подходов, направленных на повышение чувствительности и преодоление резистентности опухолей к химиопрепаратам [11–13]. В настоящей работе мы показали, что описанное нами ранее повышение активности протеинкиназы Akt в сублиниях MCF-7, резистентных к тамоксифену или рапамицину, ассоциировано со снижением уровня микроРНК-484 — одного из супрессоров Akt. Было продемонстрировано, что трансфекция в клетки MCF-7 микроРНК-484 не влияет на активность эстрогенового сигналинга, но приводит к выраженному снижению экспрессии Akt и сопровождается повышением чувствительности клеток к тамоксифену и рапамицину.

В целом полученные данные свидетельствуют об участии сигнального пути микроРНК-484/Akt в сенсibilизации клеток РМЖ к действию таргетных и гормональных препаратов, что позволяет рассматривать микроРНК-484 в качестве возможного перспективного кандидата для разработки на его основе новых противоопухолевых соединений.

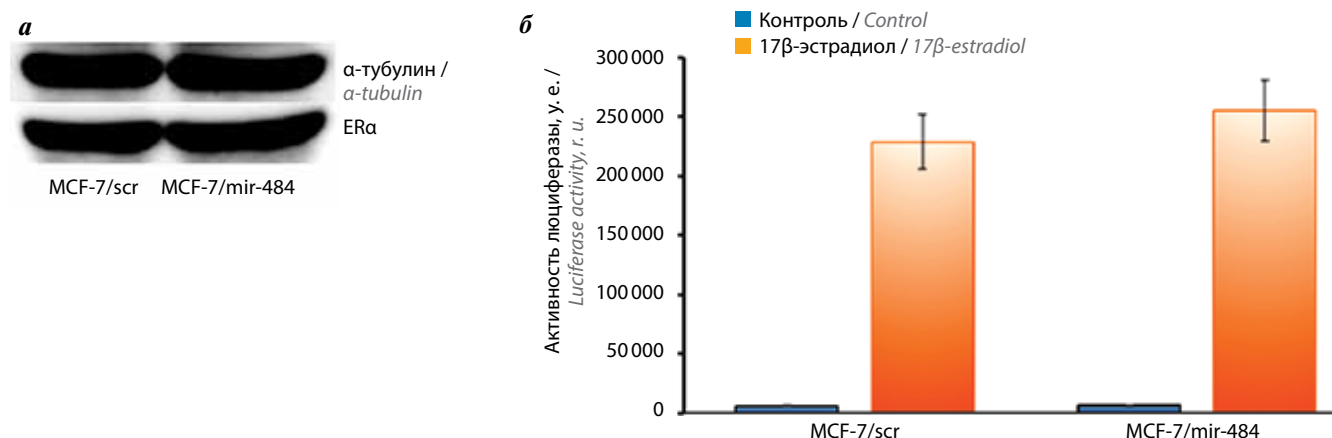


Рис. 2. Экспрессия и транскрипционная активность рецептора эстрогенов α ($ER\alpha$) в клетках MCF-7 после трансфекции микроРНК/scrambled и микроРНК-484: а – иммуноблоттинг образцов клеток с антителами к $ER\alpha$, нанесение белков контролировалось по гибридизации с антителами к α -тубулину. Представлены результаты одного из 3 независимых экспериментов; б – репортерный анализ транскрипционной активности $ER\alpha$. Клетки MCF-7 после трансфекции микроРНК трансфецировали плазмидой, содержащей ген-репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом, и плазмидой, содержащей ген β -галактозидазы. Расчет активности люциферазы проводили в условных единицах (отношение общей активности люциферазы к активности β -галактозидазы в исследованных образцах). Представлены средние значения $\pm$ SD 3 независимых экспериментов

Fig. 2. Expression level and transcriptional activity of estrogen receptor ($ER\alpha$) in the MCF-7 cells transfected with mir/scrambled and mir-484: a – immunoblotting of the protein samples with antibodies to $ER\alpha$, protein loading was controlled by membrane hybridization with α -tubulin antibodies. The blot represents the results of one of the three similar experiments; б – reporter analysis of the transcriptional activity of $ER\alpha$. Mir/scrambled and mir-484-transfected MCF-7 cells were transfected with the plasmid containing the luciferase reporter gene under the estrogen-responsive elements, and β -galactosidase plasmid. The relative luciferase activity was calculated in arbitrary units as the ratio of the luciferase to the galactosidase activity. Data represent mean value $\pm$ SD of three independent experiments

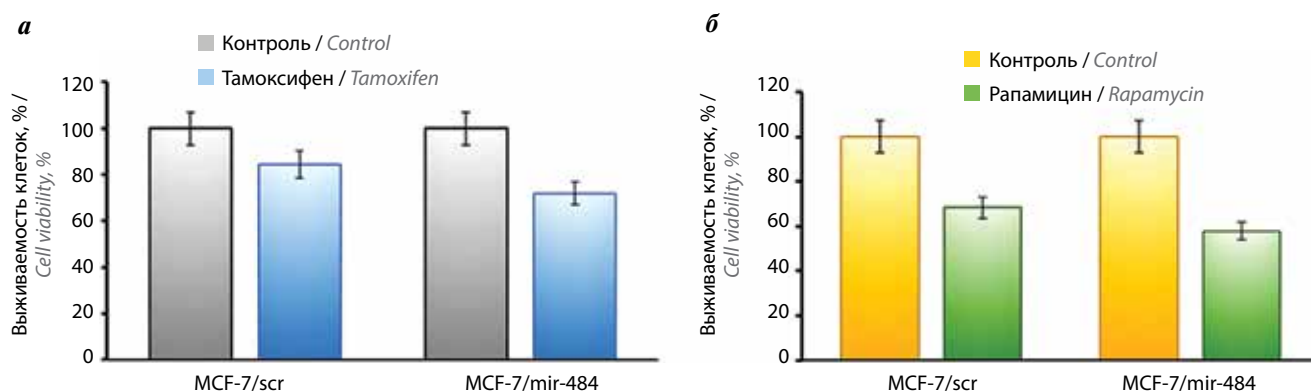


Рис. 3. Чувствительность клеток MCF-7 после трансфекции микроРНК/scrambled и микроРНК-484 к тамоксифену (а) и рапамицину (б). Клетки культивировали в течение 3 сут в присутствии 5 μ M тамоксифена или 1 μ M рапамицина, количество выживших клеток определяли с помощью МТТ-теста. Представлены средние значения $\pm$ SD 3 независимых экспериментов

Fig. 3. The sensitivity of the mir/scrambled and mir-484-transfected MCF-7 cells to tamoxifen (a) and rapamycin (б). The cells were treated with 5 μ M tamoxifen or 1 μ M rapamycin for three days and the cell viability was assessed by the MTT-test. Data represent mean value $\pm$ SD of three independent experiments

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

1. Shchegolev Y., Sorokin D., Scherbakov A. et al. Upregulation of Akt/Raptor signaling is associated with rapamycin resistance of breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2020;330:109243. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109243
2. Semina S.E., Scherbakov A.M., Vnukova A.A. et al. Exosome-mediated transfer of cancer cell resistance to antiestrogen drugs. *Molecules* 2018;23(4):829. DOI: 10.3390/molecules23040829
3. Scherbakov A.M., Sorokin D.V., Tatarskiy V.V. Jr. et al. The phenomenon of acquired resistance to metformin in breast cancer cells: the interaction of growth pathways and estrogen receptor signaling. *IUBMB Life* 2016;68(4):281–92. DOI: 10.1002/iub.1481
4. Liu J., Li S.M. MiR-484 suppressed proliferation, migration, invasion and induced apoptosis of gastric cancer via targeting CCL-18. *Int J Exp Pathol* 2020;101(6):203–14. DOI: 10.1111/iep.12366
5. Holubekova V., Kolkova Z., Grendar M. et al. Pathway analysis of selected circulating miRNAs in plasma of breast cancer patients: a preliminary study. *Int J Mol Sci* 2020;21(19):7288. DOI: 10.3390/ijms21197288
6. Wie Y., Li H., Qu Q. MiR-484 suppresses endocrine therapy-resistant cells by inhibiting KLF4-induced cancer stem cells in estrogen receptor-positive cancers. *Breast Cancer* 2021;28(1):175–86. DOI: 10.1007/s12282-020-01152-6
7. Shi W., Dong F., Jiang Y. et al. Construction of prognostic microRNA signature for human invasive breast cancer by integrated analysis. *Onco Targets Ther* 2019;12:1979–2010. DOI: 10.2147/OTT.S189265
8. Jia Y.Z., Liu J., Wang G.Q., Song Z.F. MiR-484: a potential biomarker in health and disease. *Front Oncol* 2022;12:830420. DOI: 10.3389/fonc.2022.830420
9. Semina S.E., Scherbakov A.M., Kovalev S.V. et al. Horizontal transfer of tamoxifen resistance in MCF-7 cell derivatives: proteome study. *Cancer Invest* 2017;35(8):506–18. DOI: 10.1080/07357907.2017.1368081
10. Reid G., Hubner M.R., Metivier R. et al. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 2003;11:695–707. DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00090-X
11. Xu W., Ye C., Qing X. et al. Multi-target tyrosine kinase inhibitor nanoparticle delivery systems for cancer therapy. *Mater Today Bio* 2022;16:100358. DOI: 10.1016/j.mtbio.2022.100358
12. El Sayed R., El Jamal L., El Iskandarani S. et al. Endocrine and targeted therapy for hormone-receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer: insights to sequencing treatment and overcoming resistance based on clinical trials. *Front Oncol* 2019;9:510. DOI: 10.3389/fonc.2019.00510
13. Gámez-Chiachio M., Sarrió D., Moreno-Bueno G. Novel therapies and strategies to overcome resistance to anti-HER2-targeted drugs. *Cancers (Basel)* 2022;14(18):4543. DOI: 10.3390/cancers14184543

Вклад авторов

О.Е. Андреева: дизайн исследования, репортерный и МТТ-анализ;
 Д.В. Сорокин: электрофорез и Вестерн-блоттинг образцов;
 А.М. Щербаков: статистическая обработка данных, анализ полученных данных;
 Ю.Ю. Щеголев: культуральная работа, МТТ-анализ;
 М.В. Гудкова: культуральная работа, обзор публикаций;
 М.А. Красильников: идея и организация исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions

O.E. Andreeva: research design, reporter and MTT analysis;
 D.V. Sorokin: electrophoresis and Western blotting of the samples;
 A.M. Scherbakov: statistical data analysis; analysis of the experimental data;
 Y.Y. Shchegolev: culture work; MTT analysis;
 M.V. Gudkova: culture work, review of the publications;
 M.A. Krasil'nikov: idea and organization of the study, article writing.

ORCID авторов/ ORCID of authors

О.Е. Андреева / O.E. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0002-6015-6619>
 Д.В. Сорокин / D.V. Sorokin: <https://orcid.org/0000-0002-1264-7405>
 А.М. Щербаков / A.M. Scherbakov: <https://orcid.org/0000-0002-2974-9555>
 Ю.Ю. Щеголев / Y.Y. Shchegolev: <https://orcid.org/0000-0002-1490-6781>
 М.В. Гудкова / M.V. Gudkova: <https://orcid.org/0000-0003-2694-5232>
 М.А. Красильников / M.A. Krasil'nikov: <https://orcid.org/0000-0002-5902-7633>

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 № 19-15-00245) (<https://rscf.ru/project/22-15-35008/>).

Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Scientific Foundation (grant No. 19-15-00245) (<https://rscf.ru/project/22-15-35008/>).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Работа не содержит описания исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Compliance with patients rights and principles of bioethics. This article does not describe any research involving humans or animals as subjects.

Статья поступила: 23.10.2022. **Принята к публикации:** 22.11.2022.

Article submitted: 23.10.2022. **Accepted for publication:** 22.11.2022.