

Анализ экспрессии генов семейства ABC-транспортёров в опухоли молочной железы: связь с эффективностью химиотерапии и прогнозом заболевания

М.М. Цыганов¹, М.К. Ибрагимова¹, А.М. Певзнер^{1,2}, К.А. Гаптулбарова^{1,2},
Е.Ю. Гарбуков¹, Е.М. Слонимская¹, Е.А. Усынин¹, Н.В. Литвяков¹

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

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»;
Россия, 634050 Томск, проспект Ленина, 36

Контакты: Матвей Михайлович Цыганов TsyganovMM@yandex.ru

Введение. Одной из основных причин неэффективности химиотерапии по-прежнему считают формирование фенотипа множественной лекарственной устойчивости опухоли за счет экспрессии энергозависимых белков ABC-транспортёров. Результаты предыдущих наших исследований для некоторых генов ABC позволили установить, что экспрессия данных генов коррелирует с эффективностью неoadъювантной химиотерапии (НХТ). Стоит отметить, что некоторые из клинических исследований указывают на то, что ABC-транспортёры могут влиять не только на формирование химиорезистентности в опухоли, но также на прогрессию, инвазию и метастазирование опухолевого узла.

Цель исследования — оценка уровня транскриптов всех известных 49 генов ABC в опухоли молочной железы до и после проведения лечения и их прогностической значимости.

Материалы и методы. В исследование была включена 31 пациентка с диагнозом рака молочной железы IIA–IIIB стадий. РНК выделяли из парных образцов опухолевой ткани до и после НХТ. Проведено микроматричное исследование всех образцов опухоли на микрочипах Clariom™ S Assay, human. С помощью микроматричного исследования изучена экспрессия 49 генов семейства ABC-транспортёров. Анализ данных микрочипа осуществляли с использованием программы Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0.

Результаты. Установлено, что изменение экспрессии (повышение/снижение в процессе НХТ) генов ABCA5, ABCA7, ABCB1, ABCB4, ABCB11, ABCC1, ABCC10, ABCC11, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, ABCG8 статистически значимо связано с ответом на НХТ. Кроме этого, установлена прогностическая значимость экспрессии генов ABCB1 и ABCB4. Анализ выживаемости продемонстрировал, что показатели 5-летней выживаемости у больных с высокой экспрессией генов ABCB1 и ABCB4 ниже по сравнению таковыми у пациенток с низкой экспрессией данных генов (log-rank-тест $p = 0,001$ и $0,04$ соответственно).

Заключение. Получены данные о связи экспрессии генов семейства ABC-транспортёров с эффективностью НХТ у больных раком молочной железы и исходом заболевания. Установлен прогностический потенциал генов ABCB1 и ABCB4 у больных раком молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, микроматричные исследования, транскриптом, ABC-транспортёры, неoadъювантная химиотерапия, прогноз

Для цитирования: Цыганов М.М., Ибрагимова М.К., Певзнер А.М. и др. Анализ экспрессии генов семейства ABC-транспортёров в опухоли молочной железы: связь с эффективностью химиотерапии и прогнозом заболевания. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(2):29–38.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-2-29-38



Gene expression analysis of ABC transporter family in breast tumors: relationship with chemotherapy effect and disease prognosis

М.М. Tsyganov¹, М.К. Ibragimova¹, А.М. Pevzner^{1,2}, К.А. Gaptulbarova^{1,2}, Е.Ю. Garbukov¹,
Е.М. Slonimskaya¹, Е.А. Usynin¹, Н.В. Litviakov¹

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

²Tomsk State University; 36 Prospekt Lenina, Tomsk 634050, Russia

Background. One of the main reasons of the ineffectiveness of chemotherapy is still considered to be the formation of the multidrug resistance phenotype of the tumor due to the expression of energy-dependent proteins of ABC transporters. Our previous studies for some ABC genes have established that the expression of these genes correlates with the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy (NAC). Some of the clinical studies indicate that ABC transporters can influence not only the formation of chemoresistance in the tumor, but also the progression, invasion and metastasis of the tumor node.

Objective: to evaluate the level of transcription of all 49 known ABC genes in a breast tumor before and after treatment and their prognostic significance.

Materials and methods. The study included 31 patients with a diagnosis of stage IIA – IIIB breast cancer. RNA was isolated from paired samples of tumor tissue before and after NAC. A microarray study of all tumor samples was performed on Clariom™ S Assay, human microarrays. Using microarray studies, the expression of 49 genes of the ABC transporter family was studied. Analysis of the microchip data was carried out using the program Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0.

Results. It was found that changes in the expression (increase/decrease during NAC) of the ABCA5, ABCA7, ABCB1, ABCB4, ABCB11, ABCC1, ABCC10, ABCC11, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, ABCG8 genes are statistically significantly associated with the response to NAC. In addition, the prognostic significance of ABCB1 and ABCB4 gene expression was established. Survival analysis showed that 5-year survival rates in patients with high gene expression of ABCB1 and ABCB4 are lower compared to patients with low expression of these genes (log-rank-test $p = 0.001$ and 0.04 respectively).

Conclusion. Data were obtained on the relationship of gene expression of the ABC transporter family with the effect of NAC in patients with breast cancer and the outcome of the disease. The prognostic potential of the ABCB1 and ABCB4 genes in patients with breast cancer has been established.

Key words: breast cancer, microarray, transcript, ABC transporters, neoadjuvant chemotherapy, prognosis

For citation: Tsyganov M.M., Ibragimova M.K., Pevzner A.M. et al. Gene expression analysis of ABC transporter family in breast tumors: relationship with chemotherapy effect and disease prognosis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2020;7(2):29–38. (In Russ.).

Введение

На сегодняшний день системная химиотерапия является важным компонентом комплексного лечения больных раком молочной железы (РМЖ), при этом в качестве стандарта используются различные схемы химиотерапии на основе препаратов антрациклинового ряда, 5-фторурацила, препаратов платины, растительного происхождения и т.д. [1]. Как правило, использование химиотерапии для лечения РМЖ ограничено индивидуальной вариабельностью пациентов и опухоли в ответе на лекарственное лечение и развитием резистентности опухолевых клеток. Хорошо известно, что ксенобиотики, в том числе противоопухолевые препараты, интенсивно метаболизируются в организме посредством различных механизмов, в частности процесса биотрансформации [2], который обусловлен экспрессией группы энергозависимых ABC-транспортеров (ATP-Binding Cassette transporter), играющих решающую роль в развитии лекарственной устойчивости опухолевых клеток [3]. Текущий уровень современных исследований показывает, что экспрессия генов ABC связана с эффективностью лекарственного лечения [4, 5]. Причем данный факт установлен не только в клинической практике, но и на клеточных линиях и животных моделях [6]. Важно отметить, что результаты некоторых клинических исследований указывают на то, что ABC-транспортеры могут оказывать влияние не только на формирование множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, но и на прогрессию, инвазию и метастазирование опухоли [5, 7]. В подавляющем большинстве случаев исследования ABC-транспортеров на клиническом материале ограничиваются 5–10 из 49 генов этого семейства, для которых показано значение для формирования множественной лекарственной устойчивости. Однако значение других генов семейства ABC-транспортеров также нельзя полностью исключать.

Цель исследования — оценка уровня транскриптов всех известных 49 генов ABC в опухоли молочной железы до и после проведения лечения и их прогностического потенциала.

Материалы и методы

В исследование был включен 31 больной люминальным В типом РМЖ стадий IIA–IIIC с морфологически верифицированным диагнозом в возрасте 25–68 ($49,1 \pm 2$) лет. Больные находились на лечении в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2006 по 2017 г.

В соответствии с рекомендациями Консенсусной конференции по неoadъювантной химиотерапии (НХТ) при раке молочной железы (26–28 апреля 2003 г. Филадельфия, Пенсильвания) [8] все больные получали 4–8 курсов НХТ по схемам AC (фторурацил, доксорубицин, циклофосфан), CAH (циклофосфан, доксорубицин, капецитабин) или монотерапию таксотером. Затем выполняли операцию, далее больным проводили 2 курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC, а лучевую терапию и/или гормональное лечение назначали по показаниям. Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (исправленной в 2013 г.), получено разрешение локального этического комитета НИИ онкологии Томского НИМЦ. Использовали биопсийные опухолевые образцы ($\sim 10 \text{ мм}^3$), взятые до лечения под ультразвуковым контролем, а также операционный материал ($\sim 60\text{--}70 \text{ мм}^3$) после НХТ (через 4–5 нед после последнего курса НХТ). Образцы опухоли помещали в раствор RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, США) и сохраняли при температуре -80°C (после 24-часовой инкубации при $+4^\circ \text{C}$) для дальнейшего выделения РНК.

Выделение РНК. РНК выделяли из 31 парного образца до лечения и после НХТ с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию

Таблица 1. Клинико-патологические параметры больных раком молочной железы
Table 1. Clinical and pathological parameters of patients with breast cancer

Клинико-патологический параметр Clinical and pathological parameter	Число больных, n (%) The number of patients, n (%)
Возраст, лет: Age, years:	
≤45	9 (29,0)
>45	22 (71,0)
Менструальный статус: Menstrual status:	
пременопауза premenopause	16 (51,6)
постменопауза postmenopause	15 (48,4)
Гистологический тип: Histological type:	
инвазивный протоковый рак invasive ductal carcinoma	17 (54,8)
инвазивный дольковый рак invasive lobular carcinoma	14 (45,2)
Размер опухоли: Tumor size:	
T1	2 (6,5)
T2	26 (83,9)
T3	1 (3,2)
T4	2 (6,5)
Лимфогенное метастазирование: Lymphogenic metastasis:	
N0	12 (38,7)
N1	13 (41,9)
N2	3 (9,7)
N3	3 (9,7)
Стадия: Stage:	
IIA	13 (41,9)
IIB	11 (35,5)
IIIA	3 (9,7)
IIIB	1 (3,2)
IIIC	3 (9,7)
Гистологическая форма: Histological form:	
уницентрическая unicentric	18 (58,1)
мультицентрическая multicentric	13 (41,9)
Схема неoadъювантной химиотерапии: Neoadjuvant chemotherapy scheme:	
CAH	11 (35,5)
AC	14 (45,2)
таксотер taxotere	6 (19,4)
Эффективность неoadъювантной химиотерапии: Reply to the neoadjuvant chemotherapy:	
полная регрессия complete regression	2 (6,5)
частичная регрессия partial regression	18 (58,1)
стабилизация stabilization	10 (32,3)
прогрессирование progression	1 (3,2)

Примечание. CAH — циклофосфан, доксорубин, капецитабин; AC — фторурацил, доксорубин, циклофосфан.

Note. CAH — cyclophosphamide, doxorubicin, capecitabine; AC — fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide.

и чистоту выделения РНК оценивали на флуориметре Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Для РНК концентрация составила 80–250 нг/мкл. Целостность РНК оценивали с помощью капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, США). Номер целостности РНК (RIN) составил 6,4–8,1.

Исследование экспрессии генов семейства ABC-транспортеров. Анализ экспрессии 49 генов семейства ABC-транспортеров проводили на микроматричной платформе Clariom™ S Assay, human (ThermoFisher Scientific, США). Данная микроматрица позволяет проанализировать экспрессию более 20 тыс. основных генов человека. Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, США). Анализ данных микрочипа осуществляли с помощью программы Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0. Уровень экспрессии для каждой пациентки выражали в виде логарифма по основанию 2. Нормализацию данных экспрессии выполняли, как описано в статье [9].

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Для проверки нормальности выборки применяли критерий Шапиро–Уилка. Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое и среднюю квадратичную ошибку. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни. Для коррекции уровней значимости на множественные сравнения применяли поправку Бонферрони, рассчитанную как отношение 0,05/49, где 49 — количество анализируемых генов. Уровень p считали статистически значимым с учетом поправки на множественные сравнения при значении 0,001. Для анализа показателей общей и безметастатической выживаемости (БМВ) использовали кривые выживаемости, построенные по методу Каплана–Майера, и \log -rank-тест. Для оценки различий в частотах снижения и повышения экспрессии генов в группах с объективным ответом на НХТ и без ответа на нее использовали χ^2 -критерий (<http://vassarstats.net/index.html>).

Результаты

В результате проведенного исследования с помощью микроматрицы оценена экспрессия 49 генов семейства ABC-транспортеров. На 1-м этапе был проведен анализ связи эффективности НХТ с основными клинико-патологическими характеристиками пациенток (возраст, менструальный статус, гистологический тип, размер опухоли, лимфогенное метастазирование, гистологическая форма) (табл. 1). Установлено, что ни один из параметров не оказывает статистически значимое влияние на эффективность НХТ (данные не представлены). Далее мы оценили связь экспрессии генов ABC-транспортеров

с основными клинико-патологическими характеристиками пациенток. Статистически значимые различия экспрессии были установлены только для пациенток с разным размером опухоли и эффективностью химиотерапии. Показано, что уровень экспрессии генов *ABCB1*, *ABCB8*, *ABCC2*, *ABCC4*, *ABCD1*, *ABCG4*, *ABCG8* выше в группе пациенток с Т3–4 по сравнению с таковым у пациенток с Т1–2 ($p < 0,05$) (данные не представлены).

Интересный результат показан для эффективности химиотерапии. В табл. 2 представлены данные о связи экспрессии с эффективностью НХТ.

У всех пациенток в группе с объективным ответом на НХТ уровень экспрессии генов *ABCB1*, *ABCB2*, *ABCB3*, *ABCB7*, *ABCC3*, *ABCC5*, *ABCF1*, *ABCF3*, *ABCG4* в опухоли до лечения статистически значимо выше, чем в группе больных с отсутствием ответа на НХТ (см. табл. 2). Однако при использовании поправки Бонферрони на множественные сравнения ни по одному гену статистическая значимость не достигалась. Важно отметить, что полученный результат согласуется с данными наших предыдущих исследований, а также с данными литературы. Установлено, что исходный уровень экспрессии исследуемых генов слабо связан

Таблица 2. Связь начального уровня экспрессии генов ABC с эффективностью неoadъювантной химиотерапии

Table 2. Relationship of the initial level of ABC gene expression with the effect of neoadjuvant chemotherapy

Ген Gene	Полная и частичная регрессия (n = 20) Full and partial regression (n = 20)	Прогрессирование и стабилизация (n = 11) Progression and stabilization (n = 11)	p
<i>ABCA1</i>	10,14 ± 0,37	9,22 ± 0,51	0,23
<i>ABCA2</i>	7,31 ± 0,20	7,34 ± 0,23	0,93
<i>ABCA3</i>	7,98 ± 0,30	7,69 ± 0,34	0,57
<i>ABCA4</i>	6,76 ± 0,19	6,19 ± 0,38	0,40
<i>ABCA5</i>	9,95 ± 0,33	9,57 ± 0,51	0,86
<i>ABCA6</i>	7,25 ± 0,20	7,08 ± 0,27	0,50
<i>ABCA7</i>	9,64 ± 0,39	8,76 ± 0,49	0,17
<i>ABCA8</i>	7,95 ± 0,32	7,56 ± 0,38	0,56
<i>ABCA9</i>	7,60 ± 0,26	7,05 ± 0,32	0,15
<i>ABCA10</i>	6,48 ± 0,28	5,70 ± 0,31	0,14
<i>ABCA11P</i>	8,77 ± 0,34	7,88 ± 0,43	0,11
<i>ABCA12</i>	9,67 ± 0,54	9,07 ± 0,96	0,40
<i>ABCA13</i>	6,87 ± 0,30	6,59 ± 0,40	0,71
<i>ABCB1</i>	6,44 ± 0,23	5,76 ± 0,33	0,01
<i>ABCB2</i>	10,30 ± 0,35	9,38 ± 0,38	0,02
<i>ABCB3</i>	8,66 ± 0,26	7,33 ± 0,36	0,007
<i>ABCB4</i>	6,78 ± 0,29	6,57 ± 0,38	0,50
<i>ABCB5</i>	7,32 ± 0,46	6,27 ± 0,57	0,13
<i>ABCB6</i>	5,83 ± 0,18	5,33 ± 0,27	0,06
<i>ABCB7</i>	9,80 ± 0,37	8,55 ± 0,48	0,04
<i>ABCB8</i>	6,36 ± 0,17	5,75 ± 0,26	0,07
<i>ABCB9</i>	6,55 ± 0,26	6,03 ± 0,26	0,24
<i>ABCB10</i>	8,42 ± 0,23	7,71 ± 0,44	0,11
<i>ABCB11</i>	5,86 ± 0,31	5,51 ± 0,42	0,39
<i>ABCC1</i>	8,65 ± 0,33	8,44 ± 0,37	0,82
<i>ABCC2</i>	5,26 ± 0,26	5,29 ± 0,59	0,95
<i>ABCC3</i>	9,30 ± 0,50	7,58 ± 0,43	0,03
<i>ABCC4</i>	7,49 ± 0,20	7,20 ± 0,42	0,32
<i>ABCC5</i>	8,51 ± 0,28	7,51 ± 0,33	0,01
<i>ABCC6</i>	8,53 ± 0,21	8,10 ± 0,35	0,20
<i>ABCC7</i>	5,64 ± 0,25	5,14 ± 0,35	0,26
<i>ABCC8</i>	6,18 ± 0,19	5,74 ± 0,24	0,12
<i>ABCC9</i>	7,48 ± 0,21	6,82 ± 0,43	0,06
<i>ABCC10</i>	8,48 ± 0,25	8,11 ± 0,34	0,44
<i>ABCC11</i>	8,57 ± 0,37	7,98 ± 0,76	0,14
<i>ABCC12</i>	7,42 ± 0,20	7,65 ± 0,52	0,93
<i>ABCD1</i>	6,93 ± 0,19	6,90 ± 0,26	0,83
<i>ABCD2</i>	7,55 ± 0,23	6,72 ± 0,41	0,07
<i>ABCD3</i>	7,02 ± 0,24	6,51 ± 0,26	0,50
<i>ABCD4</i>	6,62 ± 0,19	6,20 ± 0,25	0,16
<i>ABCE1</i>	11,68 ± 0,40	11,48 ± 0,51	0,62
<i>ABCF1</i>	9,01 ± 0,25	8,35 ± 0,26	0,01
<i>ABCF2</i>	6,94 ± 0,20	6,85 ± 0,34	0,91
<i>ABCF3</i>	6,43 ± 0,16	5,82 ± 0,22	0,01
<i>ABCG1</i>	8,02 ± 0,35	7,35 ± 0,46	0,23
<i>ABCG2</i>	6,92 ± 0,24	6,97 ± 0,79	0,38
<i>ABCG4</i>	5,92 ± 0,25	5,08 ± 0,28	0,02
<i>ABCG5</i>	5,19 ± 0,25	4,78 ± 0,30	0,40
<i>ABCG8</i>	4,91 ± 0,22	4,77 ± 0,31	0,95

Примечание. Жирным шрифтом обозначены статистически значимые различия.

Note. Statistically significant differences are indicated in bold.

с эффективностью НХТ при РМЖ [4, 10–12]. Однако отмечено, что именно изменение экспрессии в процессе лечения определяет ответ на проводимую химиотерапию [4].

На основании этого мы сравнили уровень экспрессии до и после НХТ у больных с разным ответом на НХТ. Оказалось, что в группе больных с объективным ответом на химиотерапию (полная и частичная регрессия) статистически значимо снижается экспрессия 28 (57 %) из 49 исследованных генов (при $2 \times 10^{-5} < p < 0,04$). В данную группу вошли следующие гены: *ABCA2*, *ABCA3*, *ABCA5*, *ABCA6*, *ABCA7*, *ABCA11P*, *ABCA12*, *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCB4*, *ABCB7*, *ABCB10*, *ABCB11*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC6*, *ABCC9*, *ABCC10*, *ABCC11*, *ABCC12*, *ABCD2*, *ABCE1*, *ABCF1*, *ABCG1*, *ABCG2*, *ABCG4*, *ABCG5*, *ABCG8* (табл. 3). Статистически значимое повышение экс-

прессии наблюдается у 10 (21 %) из 49 генов и у 11 (22 %) генов экспрессия не изменяется. В группе больных со стабилизацией и прогрессией опухоли наблюдается повышение экспрессии большинства исследуемых генов ABC. Всего экспрессия повышается у 35 (71 %) из 49 генов, а статистически значимо повышается у 19 (38 %) генов (при $0,001 < p < 0,01$): *ABCA4*, *ABCA5*, *ABCA7*, *ABCA8*, *ABCB1*, *ABCB4*, *ABCB11*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC7*, *ABCC8*, *ABCC10*, *ABCC11*, *ABCF2*, *ABCG1*, *ABCG2*, *ABCG4*, *ABCG5*, *ABCG8*. Сравнение частот повышения и снижения экспрессии исследуемых генов у пациенток с разным ответом на НХТ показало статистически значимые различия по χ^2 -критерию ($\chi^2 = 13,93$; $p = 0,0009$). Важно отметить, что экспрессия генов *ABCA5*, *ABCA7*, *ABCB1*, *ABCB4*, *ABCB11*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC10*, *ABCC11*, *ABCG1*, *ABCG2*, *ABCG4*, *ABCG5*,

Таблица 3. Экспрессии генов ABC-транспортёров у больных раком молочной железы до и после проведения НХТ в зависимости от эффективности НХТ

Table 3. Expression of ABC transporter genes in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy, depending on the effect of NAC

Ген Gene	Полная и частичная регрессия (n = 20) Full and partial regression (n = 20)			p	Прогрессирование и стабилизация (n = 11) Progression and stabilization (n = 11)			p
	до лечения before treatment	после НХТ after NAC	изменение expression change		до лечения before treatment	после НХТ after NAC	изменение expression change	
<i>ABCA1</i>	10,14 ± 0,37	9,28 ± 0,37	Снижение Decline	0,11	9,22 ± 0,51	8,88 ± 0,25	Снижение Decline	0,54
<i>ABCA2</i>	7,31 ± 0,20	5,02 ± 0,20	Снижение Decline	1×10^{-4}	7,34 ± 0,23	4,68 ± 0,25	Снижение Decline	0,002
<i>ABCA3</i>	7,98 ± 0,30	5,69 ± 0,30	Снижение Decline	0,003	7,69 ± 0,34	5,97 ± 0,34	Снижение Decline	0,22
<i>ABCA4</i>	6,76 ± 0,19	10,10 ± 0,19	Повышение Increase	7×10^{-4}	6,19 ± 0,38	10,10 ± 0,54	Повышение Increase	0,001
<i>ABCA5</i>	9,95 ± 0,33	5,52 ± 0,33	Снижение Decline	2×10^{-5}	9,57 ± 0,51	10,77 ± 0,18	Повышение Increase	0,001
<i>ABCA6</i>	7,25 ± 0,20	6,39 ± 0,20	Снижение Decline	0,01	7,08 ± 0,27	8,44 ± 0,15	Повышение Increase	0,07
<i>ABCA7</i>	9,64 ± 0,39	8,40 ± 0,39	Снижение Decline	0,003	8,76 ± 0,49	10,75 ± 0,29	Повышение	0,01
<i>ABCA8</i>	7,95 ± 0,32	11,88 ± 0,32	Повышение Increase	2×10^{-5}	7,56 ± 0,38	11,08 ± 0,33	Повышение Increase	0,001
<i>ABCA9</i>	7,60 ± 0,26	9,13 ± 0,26	Повышение Increase	0,01	7,05 ± 0,32	7,70 ± 0,25	Повышение Increase	0,54
<i>ABCA10</i>	6,48 ± 0,28	5,89 ± 0,28	Снижение Decline	0,82	5,70 ± 0,31	5,98 ± 0,43	Повышение Increase	0,54
<i>ABCA11P</i>	8,77 ± 0,34	5,05 ± 0,34	Снижение Decline	2×10^{-5}	7,88 ± 0,43	5,99 ± 0,27	Снижение Decline	0,07
<i>ABCA12</i>	9,67 ± 0,54	6,55 ± 0,54	Снижение Decline	7×10^{-4}	9,07 ± 0,96	6,77 ± 0,23	Снижение Decline	0,22
<i>ABCA13</i>	6,87 ± 0,30	8,32 ± 0,30	Повышение Increase	0,01	6,59 ± 0,40	7,65 ± 0,22	Повышение Increase	0,07
<i>ABCB1</i>	6,44 ± 0,23	5,23 ± 0,27	Снижение Decline	0,001	5,76 ± 0,33	7,43 ± 0,23	Повышение Increase	0,007

Продолжение табл. 3

Continuation of table 3

Ген Gene	Полная и частичная регрессия ($n = 20$) Full and partial regression ($n = 20$)			p	Прогрессирование и стабилизация ($n = 11$) Progression and stabilization ($n = 11$)			p
	до лечения before treatment	после НХТ after NAC	изменение expression change		до лечения before treatment	после НХТ after NAC	изменение expression change	
ABCB2	10,30 ± 0,35	9,92 ± 0,35	Снижение Decline	0,11	9,38 ± 0,38	8,29 ± 0,33	Снижение Decline	0,07
ABCB3	8,66 ± 0,26	8,14 ± 0,26	Снижение Decline	0,003	7,33 ± 0,36	7,35 ± 0,31	Повышение Increase	1,00
ABCB4	11,78 ± 0,29	9,24 ± 0,26	Снижение Decline	2×10^{-5}	9,57 ± 0,38	10,41 ± 0,29	Повышение Increase	0,01
ABCB5	7,32 ± 0,46	6,43 ± 0,24	Снижение Decline	0,11	6,27 ± 0,57	7,45 ± 0,46	Повышение Increase	0,22
ABCB6	5,83 ± 0,18	8,10 ± 0,18	Повышение Increase	0,003	5,33 ± 0,27	7,33 ± 0,42	Повышение Increase	0,22
ABCB7	9,80 ± 0,37	7,00 ± 0,37	Снижение Decline	7×10^{-4}	8,55 ± 0,48	7,28 ± 0,33	Снижение Decline	0,07
ABCB8	6,36 ± 0,17	6,50 ± 0,17	Повышение Increase	0,82	5,75 ± 0,26	6,65 ± 0,33	Повышение Increase	1,00
ABCB9	6,55 ± 0,26	6,09 ± 0,26	Снижение Decline	0,82	6,03 ± 0,26	5,68 ± 0,13	Снижение Decline	0,07
ABCB10	8,42 ± 0,23	7,74 ± 0,18	Снижение Decline	0,003	7,71 ± 0,44	7,94 ± 0,23	Повышение Increase	0,07
ABCB11	5,86 ± 0,31	3,37 ± 0,26	Снижение Decline	1×10^{-4}	5,51 ± 0,42	8,07 ± 0,31	Повышение Increase	0,002
ABCC1	8,65 ± 0,33	6,82 ± 0,33	Снижение Decline	7×10^{-4}	8,44 ± 0,37	10,01 ± 0,28	Повышение Increase	0,01
ABCC2	5,26 ± 0,26	4,09 ± 0,26	Снижение Decline	0,003	5,29 ± 0,59	7,30 ± 0,22	Повышение Increase	0,01
ABCC3	9,30 ± 0,50	9,30 ± 0,35	Снижение Decline	0,11	7,58 ± 0,43	8,68 ± 0,50	Повышение Increase	0,07
ABCC4	7,49 ± 0,20	7,15 ± 0,20	Снижение Decline	0,50	7,20 ± 0,42	7,41 ± 0,21	Повышение Increase	0,54
ABCC5	8,51 ± 0,28	7,85 ± 0,28	Снижение Decline	0,50	7,51 ± 0,33	7,56 ± 0,17	Повышение Increase	0,54
ABCC6	8,53 ± 0,21	6,01 ± 0,21	Снижение Decline	2×10^{-5}	8,10 ± 0,35	6,04 ± 0,28	Снижение Decline	0,07
ABCC7	5,64 ± 0,25	10,09 ± 0,25	Повышение Increase	2×10^{-5}	5,14 ± 0,35	9,32 ± 0,36	Повышение Increase	0,002
ABCC8	6,18 ± 0,19	9,96 ± 0,19	Повышение Increase	2×10^{-5}	5,74 ± 0,24	8,58 ± 0,32	Повышение Increase	0,002
ABCC9	7,48 ± 0,21	5,64 ± 0,21	Снижение Decline	1×10^{-4}	6,82 ± 0,43	5,24 ± 0,18	Снижение Decline	0,01
ABCC10	8,48 ± 0,25	6,83 ± 0,25	Снижение Decline	1×10^{-4}	8,11 ± 0,34	9,91 ± 0,23	Повышение Increase	0,01
ABCC11	8,57 ± 0,37	6,99 ± 0,37	Снижение Decline	0,01	7,98 ± 0,76	9,04 ± 0,20	Повышение Increase	0,01
ABCC12	7,42 ± 0,20	6,22 ± 0,20	Снижение Decline	0,01	7,65 ± 0,52	10,13 ± 0,34	Повышение Increase	0,07

Окончание табл. 3

End of table 3

Ген Gene	Полная и частичная регрессия ($n = 20$) Full and partial regression ($n = 20$)			p	Прогрессирование и стабилизация ($n = 11$) Progression and stabilization ($n = 11$)			p
	до лечения before treatment	после НХТ after NAC	изменение expression change		до лечения before treatment	после НХТ after NAC	изменение expression change	
<i>ABCD1</i>	6,93 ± 0,19	8,94 ± 0,19	Повышение Increase	1×10^{-4}	6,90 ± 0,26	8,34 ± 0,40	Повышение Increase	0,07
<i>ABCD2</i>	7,55 ± 0,23	4,77 ± 0,23	Снижение Decline	2×10^{-5}	6,72 ± 0,41	6,10 ± 0,21	Снижение Decline	0,22
<i>ABCD3</i>	7,02 ± 0,24	7,71 ± 0,24	Повышение Increase	0,11	6,51 ± 0,26	7,56 ± 0,19	Повышение Increase	0,07
<i>ABCD4</i>	6,62 ± 0,19	6,49 ± 0,19	Снижение Decline	1,00	6,20 ± 0,25	6,07 ± 0,16	Снижение Decline	0,54
<i>ABCE1</i>	11,68 ± 0,40	8,93 ± 0,40	Снижение Decline	0,01	11,48 ± 0,51	8,92 ± 0,37	Снижение Decline	0,07
<i>ABCF1</i>	9,01 ± 0,25	7,72 ± 0,25	Снижение Decline	7×10^{-4}	8,35 ± 0,26	7,10 ± 0,30	Снижение Decline	0,01
<i>ABCF2</i>	6,94 ± 0,20	8,56 ± 0,20	Повышение Increase	2×10^{-5}	6,85 ± 0,34	8,83 ± 0,20	Повышение Increase	0,01
<i>ABCF3</i>	6,43 ± 0,16	7,68 ± 0,16	Повышение Increase	7×10^{-4}	5,82 ± 0,22	7,48 ± 0,25	Повышение Increase	0,07
<i>ABCG1</i>	8,02 ± 0,35	7,04 ± 0,40	Снижение Decline	0,04	7,35 ± 0,46	8,65 ± 0,35	Повышение Increase	0,001
<i>ABCG2</i>	6,92 ± 0,24	5,02 ± 0,46	Снижение Decline	7×10^{-4}	6,97 ± 0,79	7,89 ± 0,24	Повышение Increase	0,001
<i>ABCG4</i>	5,92 ± 0,25	3,11 ± 0,30	Снижение Decline	2×10^{-5}	5,08 ± 0,28	8,03 ± 0,25	Повышение Increase	0,001
<i>ABCG5</i>	5,19 ± 0,25	3,04 ± 0,26	Снижение Decline	2×10^{-5}	4,78 ± 0,30	7,28 ± 0,25	Повышение Increase	0,001
<i>ABCG8</i>	4,91 ± 0,22	3,06 ± 0,24	Снижение Decline	2×10^{-5}	4,77 ± 0,31	7,42 ± 0,22	Повышение Increase	0,001

Примечание. НХТ — неоадьювантная химиотерапия. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия в уровне экспрессии генов ABC до и после НХТ в зависимости от ответа на лечение. В группе пациенток с объективным ответом (полная и частичная регрессия) выделено только статистически значимое снижение экспрессии; в группе пациенток без ответа на лечение (прогрессирование и стабилизация) — только статистически значимое повышение экспрессии. Жирным шрифтом и курсивом выделены статистически значимые различия в уровне экспрессии генов ABC до и после НХТ в зависимости от ответа на лечение с учетом поправки Бонферрони.

Note. NAC — neoadjuvant chemotherapy. In bold, statistically significant differences in the level of ABC gene expression before and after NAC are shown in bold type depending on the response to treatment. In the group of patients with an objective response (full and partial regression), only a statistically significant decrease in expression was identified; in the group without response to treatment (progression and stabilization) — only a statistically significant increase in expression. Bold and italics indicate statistically significant differences in the level of ABC gene expression before and after NAC depending on the response to treatment, taking into account the Bonferroni correction.

ABCG8 статистически значимо изменялась и была связана с ответом на НХТ в обеих группах пациенток (см. табл. 3).

Далее с использованием метода Каплана—Майера была оценена связь показателей БМВ с экспрессией ABC-транспортеров. Для выявления связи показателей экспрессии с выживаемостью мы воспользовались статистическими характеристиками нашей выборки по медиане экспрессии исследуемых генов. Это сделано для того, чтобы было равное число пациенток в 2 противоположных группах. Соответственно группу с высоким уровнем экспрессии составили пациентки, у которых экспрессия генов выше значения медианы,

группу с низким уровнем — те, у кого значения медианы ниже. В результате установлено, что только при высоком уровне экспрессии генов *ABCB1* и *ABCB4* после НХТ наблюдаются низкие показатели БМВ (см. рисунок). Показатели 5-летней выживаемости в группе больных с высокой экспрессией гена *ABCB1* составили 43 % против 92 % в противоположной группе (*log-rank*-тест $p = 0,001$). Для гена *ABCB4* показан аналогичный результат: в группе с высоким уровнем экспрессии гена показатели 5-летней БМВ сравнительно невысокие — 58 %, а в группе с низким уровнем — 87 % (*log-rank*-тест $p = 0,04$).

Статистически значимых различий в показателях БМВ у пациенток с экспрессией других генов

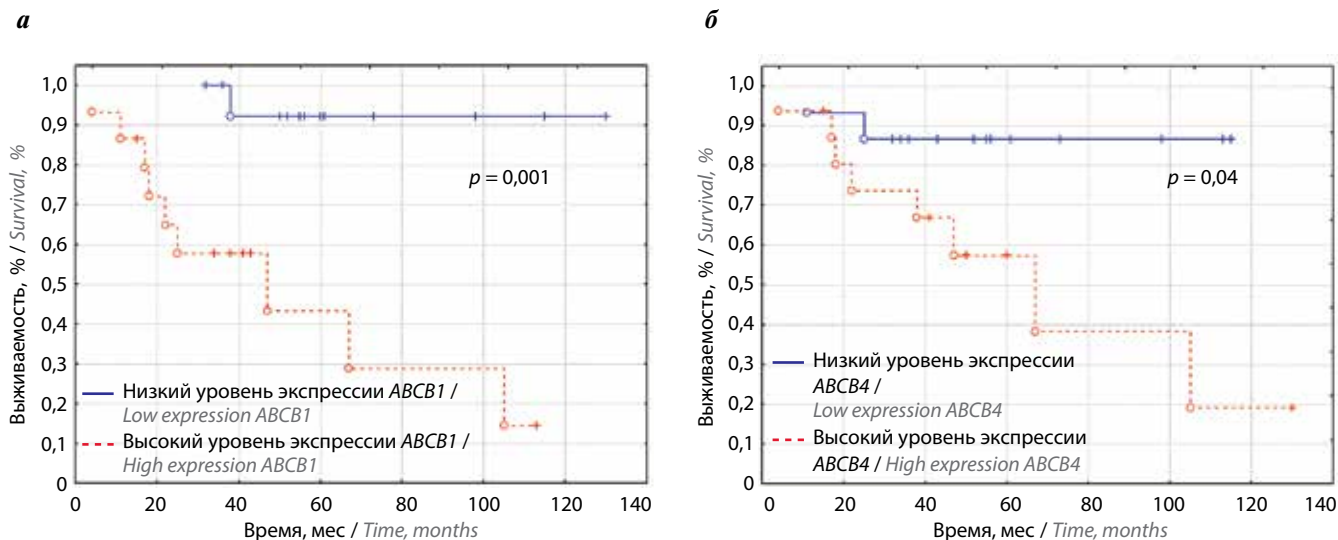


График выживаемости Каплана–Майера, представляющий связь безметастатической выживаемости с уровнем экспрессии генов *ABCB1* (а) и *ABCB4* (б) после неoadъювантной химиотерапии. В качестве группирующей переменной использовалась медиана экспрессии: для *ABCB1* – 7,6; *ABCB4* – 10,1.

Kaplan–Meyer survival graph representing the relationship between metastatic survival and the level of gene expression of *ABCB1* (a) and *ABCB4* (b) after neoadjuvant chemotherapy. The expression median was used as a grouping variable: for *ABCB1* – 7.6; *ABCB4* – 10.1.

ABC-транспортеров как до лечения, так и после НХТ не установлено.

Обсуждение

В настоящее время существует немало исследований экспрессии генов ABC-транспортеров при различных злокачественных новообразованиях. Были выделены основные гены ABC, участвующие в транспорте лекарственных препаратов при раке, к которым были отнесены такие гены, как *ABCA1*, *ABCA2*, *ABCA3*, *ABCB1*, *ABCB4*, *ABCB5*, *ABCB11*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5*, *ABCC6*, *ABCC10*, *ABCC11*, *ABCG2* [3]. Интересно, что если связь экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1*, *ABCG2* и некоторых других с эффективностью НХТ показана во многих исследованиях [13–15], то для генов подсемейства *ABCA* связь весьма неочевидна. Тем не менее было продемонстрировано, что высокая экспрессия *ABCA2* и *ABCA3* коррелирует с плохим химиотерапевтическим ответом [16]. Результаты предыдущего нашего исследования показали, что изменение экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2* коррелирует с ответом на НХТ, что согласуется с полученными результатами данного исследования [4]. На сегодняшний день остается непонятной роль гена *ABCF1*, поскольку он не имеет трансмембранного домена и его функция отличается от большинства ABC-транспортеров [17]. Тем не менее мы показали, что снижение экспрессии данного гена в опухоли молочной железы связано с химиочувствительностью. Аналогичный результат был показан при гепатоцеллюлярной карциноме [18]. Примечательно, что уровень экспрессии *ABCA9*, *ABCA10* и *ABCC9* был связан с безрецидивной выживаемостью [19]. Мы установили, что гиперэкспрессия гена *ABCB4* после химиотерапии связана с эффективностью лечения и низкими показателями БМВ.

Это в определенной мере объясняет результаты исследования J. F. Huang и соавт. на клеточных линиях РМЖ, в котором было показано, что гиперэкспрессия гена *ABCB4* связана с резистентностью к доксорубину и, как следствие, может определять ответ опухоли на химиотерапевтическое лечение [20]. Установлено, что *ABCB4* локализуется на мембране гепатоцитов, секретирующих фосфатидилхолин в желчь, для защиты гепатобилиарного эпителия от повреждения свободными желчными кислотами. При этом нарушения в *ABCB4* вызывают редкие заболевания желчевыводящих путей [21]. Тем не менее точная функция, а также потенциальные механизмы гена *ABCB4* детально не определены. Однако установлено, что гиперэкспрессия *ABCB4* связана с химиорезистентностью при лечении 5-фторурацилом и сопряжена с низкими показателями безрецидивной и общей выживаемости [21], связана с химиорезистентностью при лечении доксорубином [22] и др.

Связь гена *ABCB1* с прогнозом в основном показана для полиморфизмов данного гена [23, 24] и для направления изменения его экспрессии в процессе НХТ [7].

Заключение

Результаты проведенного исследования позволили подтвердить результаты исследований прошлых лет и получить новые данные о связи новых генов ABC-транспортеров с эффективностью НХТ и прогнозом заболевания. Основываясь на этих результатах, мы предполагаем, что выявленные гены могут быть новыми предиктивными и прогностическими маркерами при РМЖ.

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

1. Семиглазов В.Ф., Горбунова В.А., Тюляндин С.А. Химиотерапия рака молочной железы: современный взгляд на проблему. Медицинский совет 2017;1(6):56–60. DOI:10.21518/2079-701X-2017-6-56-60 [Semiglazov V.F., Gorbunova V.A., Tjuljandin S.A. Chemotherapy for breast cancer: a modern view of the problem. Meditsinskiy sovet = Medical Advice 2017;1(6):56–60. (In Russ.)].
2. Parkinson A., Ogilvie B.W. Biotransformation of xenobiotics. Casarett and Doull's toxicology: Basic Sci Poisons 2008;7(1):161–304.
3. Fletcher J.I., Haber M., Henderson M.J. et al. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. Nat Rev Cancer 2010;10(2):147–56. DOI: 10.1038/nrc278.9.
4. Litviakov N.V., Cherdynitseva N.V., Tsyganov M.M. et al. Changing the expression vector of multidrug resistance genes is related to neoadjuvant chemotherapy response. Cancer Chemother Pharmacol 2013;71(1):153–63. DOI: 10.1007/s00280-012-1992-x.
5. Hlavata I., Mohelnikova-Duchonova B., Václavikova R. et al. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. Mutagenesis 2012;27(2):187–96. DOI: 10.1093/mutage/ger075.
6. Patel A., Li T.W., Anreddy N. et al. Suppression of ABCG2 mediated MDR *in vitro* and *in vivo* by a novel inhibitor of ABCG2 drug transport. Pharmacol Res 2017;121:184–93. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.04.025.
7. Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Слонимская Е.М. и др. Связь безметастатической выживаемости больных раком молочной железы и вектора изменения экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли при проведении НХТ. Вопросы онкологии 2013;59(3):334–40. DOI: <https://doi.org/10.18722/VO2013593334-340>. [Litviakov N.V., Garbukov E.Yu., Slonimskaya E.M. et al. Connection of metastasis-free survival in breast cancer patients and an expression vector of multidrug resistance genes in tumor during neoadjuvant chemotherapy. Voprosy onkologii = Oncology Issues 2013;59(3):334–40. (In Russ.)].
8. 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. Breast J 2004;10(4):273–94.
9. Irizarry R.A., Hobbs B., Collin F. et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics 2003;4(2): 249–64. DOI: 10.1093/biostatistics/4.2.249.
10. Wind N., Holen I. Multidrug resistance in breast cancer – from *in vitro* models to clinical studies. Int J Breast Cancer 2011;2011:1–12. DOI: 10.4061/2011/967419.
11. Kim B., Fatayer H., Hanby A.M. et al. Neoadjuvant chemotherapy induces expression levels of breast cancer resistance protein that predict disease-free survival in breast cancer. PLoS One 2013;8(5):1–8. DOI: 10.1371/journal.pone.0062766.
12. Gillet J.P., Efferth T., Remacle J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. Biochim Biophys Acta 2007;1775(2):237–62. DOI: 10.1016/j.bbcan.2007.05.002.
13. Velaei K., Samadi N., Soltani S. et al. NFκBp65 transcription factor modulates resistance to doxorubicin through ABC transporters in breast cancer. Breast Cancer 2017;24(4):552–61. DOI: 10.1007/s12282-016-0738-8.
14. Patch A.M., Christie E.L., Etemadmoghadam D. et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. Nature 2015;521(7553): 489–94. DOI: 10.1038/nature14410.
15. Wilson C.S., Davidson G.S., Martin S.B. et al. Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction. Blood 2006;108(2):685–96. DOI: 10.1182/blood-2004-12-4633.
16. Steinbach D., Gillet J.P., Sauerbrey A. et al. ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res 2006;12(14):4357–63. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2587.
17. Chen Z., Shi T., Zhang L. et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: a review of the past decade. Cancer Lett 2016;370(1):153–64. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.10.010.
18. Fung S.W., Cheung P.F.Y., Yip C.W. et al. The ATP-binding cassette transporter ABCF1 is a hepatic oncofetal protein that promotes chemoresistance, EMT and cancer stemness in hepatocellular carcinoma. Cancer Lett 2019;457:98–109. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.05.010.
19. Elsnerova K., Mohelnikova-Duchonova B., Cerovska E. et al. Gene expression of membrane transporters: importance for prognosis and progression of ovarian carcinoma. Oncol Rep 2016;35(4):2159–70. DOI: 10.3892/or.2016.4599.
20. Huang J.F., Wen C.J., Zhao G.Z. et al. Overexpression of ABCB4 contributes to acquired doxorubicin resistance in breast cancer cells *in vitro*. Cancer Chemother Pharmacol 2018;82(2):199–210. DOI: 10.1007/s00280-018-3603-y.
21. Hu H., Wang M., Guan X. et al. Loss of ABCB4 attenuates the caspase-dependent apoptosis regulating resistance to 5-Fu in colorectal cancer. Biosci Rep 2018;38(1):BSR20171428. DOI: 10.1042/BSR20171428.
22. Hontecillas-Prieto L., Garcia-Dominguez D.J., Vaca D.P. et al. Multidrug resistance transporter profile reveals MDR3 as a marker for stratification of blastemal Wilms tumour patients. Oncotarget 2017;8(7):11173–86. DOI: 10.18632/oncotarget.14491.
23. Tulsyan S., Mittal R.D., Mittal B. The effect of ABCB1 polymorphisms on the outcome of breast cancer treatment. Pharmacogen Personal Med 2016;9(1):47–58. DOI: 10.2147/PGPM.S86672.
24. Kim H.J., Im S.A., Keam B. et al. ABCB1 polymorphism as prognostic factor in breast cancer patients treated with docetaxel and doxorubicin neoadjuvant chemotherapy. Cancer Sci 2015;106(1): 86–93. DOI: 10.1111/cas.12560.

Вклад авторов

М.М. Цыганов: написание текста рукописи;

М.К. Ибрагимова, А.М. Певзнер, К.А. Гаптулбарова: анализ полученных данных;

Е.Ю. Гарбуков, Е.М. Слонимская: получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи;

Е.А. Усынин, Н.В. Литвяков: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

M.M. Tsyganov: article writing;

M.K. Ibragimova, A.M. Pevzner, K.A. Gaptulbarova: analysis of the obtained data;

E.Yu. Garbukov, E.M. Slonimskaya: obtaining data for analysis, reviewing of publications of the article's theme;

E.A. Usynin, N.V. Litviakov: developing the research design.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.М. Цыганов / M.M. Tsyganov: <https://orcid.org/0000-0001-7419-4512>

М.К. Ибрагимова / M.K. Ibragimova: <https://orcid.org/0000-0001-8815-2786>

А.М. Певзнер / A.M. Pevzner: <https://orcid.org/0000-0002-9657-9058>

К.А. Гаптулбарова / K.A. Gaptulbarova: <https://orcid.org/0000-0003-1091-7528>

Е.Ю. Гарбуков / E.Yu. Garbukov: <https://orcid.org/0000-0002-2917-8158>

Е.М. Слонимская / E.M. Slonimskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4382-5697>

Н.В. Литвяков / N.V. Litviakov: <https://orcid.org/0000-0002-0714-8927>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 18-29-09131 «Феномен «замирания» опухоли в процессе химиотерапии».

Funding. This work was supported by grant number 18-29-09131 Russian Foundation for Basic Research "The phenomenon of tumor "fading" during chemotherapy".

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук». Протокол № 1 от 14.01.2013.

Все пациентки 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 Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences. Protocol No 1 dated 14.01.2013.

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

Статья поступила: 26.05.2020. **Принята к публикации:** 25.06.2020.

Article submitted: 26.05.2020. **Accepted for publication:** 25.06.2020.