

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-46-54>

Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов, компонентов сигнального пути АКТ/mTOR, рецепторов и лигандов программируемой клеточной гибели ткани меланомы

К.В. Никульников¹, В.А. Богданова², Л.В. Спирина^{1, 2}, С.Ю. Чижевская^{1, 2}, И.В. Кондакова¹,
Е.Л. Чойнзонов^{1, 2}, В.И. Чернов¹

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

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

Контакты: Константин Валерьевич Никульников Kast10sha91@mail.ru

Введение. Меланома представляет собой опасное новообразование кожи, характеризующееся злокачественным и агрессивным течением. Транскрипционные и ростовые факторы, компоненты сигнального пути АКТ/mTOR (mTOR – мишень рапамицина млекопитающих), рецепторы и лиганды программируемой клеточной гибели задействованы в значимых процессах онкогенеза.

Цель исследования – изучение экспрессии компонентов сигнального пути АКТ/mTOR, транскрипционных и ростовых факторов, AMPK, LC3B, рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1) и его лигандов PD-L1 и PD-L2 в тканях опухолей кожи и слизистых.

Материалы и методы. В исследование включены 21 пациент с верифицированной меланомой кожи различных локализаций и слизистых оболочек полости носа T1a–4bN0M0 (I–IV стадий) и 18 пациентов с базально-клеточным раком кожи различных локализаций T1–4N0M0 (I–VIA стадий) в возрасте от 45 до 72 лет, проходившие лечение в отделении опухолей головы и шеи Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра и имеющие разный инвазивный потенциал. Наличие изъязвления опухоли выявляли путем проведения микроскопии и регистрации истинного отсутствия эпидермиса над новообразованием. Экспрессию компонентов сигнального пути АКТ/mTOR, транскрипционных и ростовых факторов, AMPK, LC3B, PD-1, PD-L1 и PD-L2 в ткани опухоли определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. В тканях меланом выявлено повышение экспрессии 70 S6 киназы и VHL по сравнению с базально-клеточным раком. При этом наличие признаков изъязвления ассоциировано с низким уровнем матричной РНК (мРНК), c-Raf, транскрипционного ядерного фактора каппа В (NF-κB) p50 и фактора, индуцируемого гипоксией 1 (HIF-1), на фоне роста экспрессии фактора, индуцируемого гипоксией 2 (HIF-2). Исследование молекулярных особенностей новообразований в связи с толщиной опухоли по Бреслоу позволило выявить вклад в опухолевую прогрессию транскрипционных и ростовых факторов, интенсивности процессов внутриклеточного сигналинга, модификации микроокружения опухоли, процессов аутофагии и неоангиогенеза.

Заключение. Выявлены молекулярные и биологические особенности меланом, связанные с инвазивным ростом опухоли. Для злокачественных новообразований кожи характерно повышение экспрессии 70 S6 киназы и VHL. Признаки изъязвления и инвазия опухоли ассоциированы с изменением транскрипционных факторов, индукцией ключевых маркеров онкогенеза, что способствует формированию инвазивного потенциала опухоли.

Ключевые слова: меланома, компоненты сигнального пути АКТ/mTOR, транскрипционный ядерный фактор каппа В, фактор, индуцируемый гипоксией 1, фактор, индуцируемый гипоксией 2, AMPK, LC3B, рецептор программируемой клеточной гибели 1, лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1, лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 2

Для цитирования: Никульников К.В., Богданова В.А., Спирина Л.В. и др. Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов, компонентов сигнального пути АКТ/mTOR, рецепторов и лигандов программируемой клеточной гибели ткани меланомы. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):46–54. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-46-54>

Transcriptional, growth factors, components of the AKT/mTOR signaling pathway, receptors and ligands of programmed cell death expression in melanoma

K.V. Nikulnikov¹, V.A. Bogdanova², L.V. Spirina^{1,2}, S.Yu. Chizhevskaya^{1,2}, I.V. Kondakova¹, E.L. Choyznzonov^{1,2}, V.I. Chernov¹

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 the Russia; 2 Moskovsky Tract, Tomsk 634050, Russia

Contacts: Konstantin Valerievich Nikulnikov Kast10sha91@mail.ru

Introduction. Melanoma is the most dangerous neoplasm of the skin, characterized by a malignant and aggressive course. Transcriptional and growth factors, components of the AKT/mTOR signaling pathway, receptors and ligands of programmed cell death are involved in significant processes of oncogenesis.

Aim. To study the expression of components of the AKT/mTOR (mTOR – mammalian target of rapamycin) signaling pathway, transcription and growth factors, expression of AMPK, LC3B, programmed cell death 1 (PD-1), programmed death-ligand 1 PD-L1 and programmed death-ligand 2 (PD-L2) in skin and mucosal tumor tissues.

Materials and methods. The study included 21 patients with a verified diagnosis of melanoma of the skin of various localizations and mucous membranes of the nasal cavity T1a–4bN0M0 (I–IV stages) and 18 patients with basal cell carcinoma of the skin of various localizations T1–4N0M0 (I–VIA stages), aged 45 to 72 years old, who were treated in the department of head and neck tumors of the Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center. The presence of tumor ulceration was determined by microscopy and registration of the true absence of the epidermis over the tumor or due to traumatization of the epidermis. Expression of components of the AKT/mTOR signaling pathway, transcription and growth factors, expression of AMPK, LC3B, PD-1, PD-L1 and PD-L2 in the tumor tissue was determined by real-time polymerase chain reaction.

Results. An increase in the expression of 70 S6 kinase and VHL was found in melanoma tissues compared to basal cell carcinoma. At the same time, the presence of signs of ulceration was associated with a low level of c-RAF, nuclear factor kappa B (NF-κB) p50 and hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) matrix RNA (mRNA) against the background of an increase in the expression of the hypoxia-inducible factor 2 (HIF-2) transcription factor. The study of the molecular features of neoplasms in relation to the tumor thickness according to Breslow revealed the contribution of transcription and growth factors, the intensity of intracellular signaling processes, modification of the microenvironment, autophagy and neoangiogenesis.

Conclusion. The molecular and biological features of melanomas associated with invasive tumor growth have been identified. An increase in the expression of 70 S6 kinase and VHL are characteristic of a malignant skin tumor. The presence of signs of ulceration and tumor invasion were associated with a change in the transcriptional characteristics of factors with the induction of key markers, oncogenesis, which contributes to the formation of the invasive potential of the tumor.

Keywords: melanoma, components of the AKT/mTOR signaling pathway, nuclear factor kappa B, hypoxia-inducible factor 1, hypoxia-inducible factor 2, AMPK, LC3B, programmed cell death 1, programmed death-ligand 1, programmed death-ligand 2

For citation: Nikulnikov K.V., Bogdanova V.A., Spirina L.V. et al. Transcriptional, growth factors, components of the AKT/mTOR signaling pathway, receptors and ligands of programmed cell death expression in melanoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(1):46–54. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-46-54>

ВВЕДЕНИЕ

Меланома представляет собой опасное новообразование кожи, характеризующееся злокачественным и агрессивным течением. Согласно исследованию, которое проводилось на основе данных GLOBOCAN, если показатели заболеваемости меланомой в 2020 г. останутся стабильными, то к 2040 г. они увеличатся примерно в 1,5 раза [1]. В 2020 г. в России частота встречаемости этой патологии составила чуть больше 14 % случаев всех злокачественных новообразований кожи, при этом она стала причиной смерти 70 % больных с данной опухолью [2, 3].

Меланома развивается в результате нескольких генетических изменений, при этом ультрафиолетовое излучение часто выступает в качестве мутагенного

фактора риска [4]. Глубокое знание разнообразия молекулярных сигнальных путей различных типов меланомы позволяет лучше охарактеризовать их и предоставляет инструменты для разработки методов лечения, основанных на воздействии сигналов, продвигаемых этими каскадами [5]. К основным молекулярно-генетическим маркерам данной опухоли относится мутация *BRAF*, распространенность которой составляет 60–80 % всех злокачественных опухолей кожи [6, 7].

В последние годы значительные успехи в лечении пациентов с меланомой связаны с применением ингибиторов тирозинкиназы *BRAF/MEK* [8]. В эпоху молекулярно-таргетной терапии точное выявление мутации *BRAF* при данном заболевании становится все более важным с учетом влияния гетерогенности *BRAF*,

возникающей на разных этапах развития опухоли, на выживаемость больных [9]. В настоящее время полагают, что вариабельность поведения опухоли опосредована гетерогенностью молекулярных каскадов, задействованных в развитии меланомы, гиперактивацией сигнальных путей АКТ/mTOR (mTOR — мишень рапамицина млекопитающих), MAPK, а также ключевыми процессами онкогенеза аутофагии и апоптоза [10, 11]. Белок LC3B (MAP1LC3B) является центральным белком в пути аутофагии, где он участвует в выборе субстрата, а также киназы AMPK и mTOR [12], определяющих особенности агрессивного роста опухоли, в том числе в случае мутации *BRAF*.

Еще одним подходом в изучении молекулярных особенностей опухоли является изменение экспрессии транскрипционных и ростовых факторов, которые связаны с развитием меланомы [13]. Недавние исследования показали, что транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией 1 α (HIF-1 α) способствует прогрессированию меланомы, активируя сигнальные пути АКТ/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, транскрипционного ядерного фактора каппа В (NF- κ B) и др. [14]. Отмечается, что ингибирование сигналов NF- κ B способно подавлять рост и прогрессирование злокачественных новообразований [15]. Также перспективными маркерами являются состояние рецепторов и лигандов апоптоза [16], гиперэкспрессия которых наблюдается в ткани меланомы, и эпигенетические изменения их генов [17].

В целом отсутствуют значимые данные о состоянии показателей сигнальных каскадов, экспрессии транскрипционных и ростовых факторов в формировании инвазивного и метастатического потенциалов меланом кожи и слизистых.

Цель исследования — изучение экспрессии компонентов сигнального пути АКТ/mTOR, транскрипционных, ростовых факторов, экспрессии AMPK, LC3B, рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1) и его лигандов (PD-L1 и PD-L2) в ткани опухолей кожи и слизистых.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 21 пациент с верифицированной меланомой кожи различных локализаций и слизистых оболочек полости носа T1a–4bN0M0 (I–IV стадий) и 18 пациентов с базально-клеточным раком кожи различных локализаций T1–4N0M0 (I–IVA стадий) в возрасте от 45 до 72 лет (13 (62 %) мужчин и 8 (38 %) женщин), проходившие лечение в отделении опухолей головы и шеи Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра. Группа сравнения выбрана с учетом различий в инвазивном потенциале опухолей разного происхождения, так как базально-клеточный рак не метастазирует. Проведено хирургическое лечение в объеме широкого иссечения опухоли кожи с биопсией сторожевого лимфатического узла, а в случае меланомы полости носа — широкое

иссечение опухоли с резекцией носовых раковин, хрящей и костей полости носа открытым путем с биопсией сторожевого лимфатического узла. Заболевание стадии T1aN0M0 выявлено у 4 (19 %) пациентов, T1bN0M0 — у 5 (23,5 %), T2bN0M0 — у 1 (5 %), T3aN0M0 — у 5 (23,5 %), T3bN0M0 — у 1 (5 %), T4aN0M0 — у 4 (19 %), T4bN0M0 — у 1 (5 %).

Исязвление опухоли отмечалось у 9 (53 %) больных, отсутствовало — у 8 (47 %). Уровень инвазии I степени по Кларку не был зафиксирован, II степени отмечен у 6 (35 %) пациентов, III степени — у 6 (35 %), IV степени — у 1 (6,5 %), V степени — у 4 (23,5 %).

Опухоль толщиной по Бреслоу <0,75 мм зафиксирована у 2 (12 %) пациентов, от 0,75 до 1,5 мм — у 7 (41 %), от 1,51 до 3 мм — у 1 (6 %), от 3 до 4 мм — у 2 (12 %), от 4,01 мм и более — у 5 (29 %).

Все пациенты имели отрицательный статус по мутации *BRAF*^{V600E}. В контрольную группу вошли 6 больных базалиомой. Все процедуры с участием пациентов проведены в соответствии с протоколом Хельсинкской декларации по правам человека (1964 г.).

Материалом исследования являлись образцы пораженной опухолью и неизменной кожи, полученные при оперативном лечении и находящиеся на расстоянии не менее 1 см от границы опухоли, которые после забора замораживались и хранились при температуре –80 °C.

Выделение РНК. РНК выделяли с помощью набора RNeasy mini Kit, содержащего ДНКазу I (Qiagen, Германия). Для оценки количества выделенной РНК на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США) оценивали концентрацию и чистоту выделенной РНК. Концентрация РНК составила 80–250 нг/мкл; A260/A280 = 1,95–2,05; A260/A230 = 1,90–2,31. Целостность РНК определяли с помощью капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, США) и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies, США). Индекс целостности РНК (RNA integrity number, RIN) составил 5,6–7,8.

Количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Уровень экспрессии генов оценивали с помощью количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией (RT-qPCR) с использованием красителя SYBR Green на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, США; ЦКП «Медицинская генетика»). Для получения комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора реактивов m-MuLV-RH («БиоЛабмикс», Россия) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией производителя. Полимеразную цепную реакцию ставили в 3 репликах в объеме 25 мкл, содержащем 12,5 мкл БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue («БиоЛабмикс», Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров и 50 нг кДНК: CAIX — 5'-GTTGCTGTCTCGCTTGGA-3',

R5'-CAGGGTGTTCAGAGAGGGTGT-3'; HIF-1 α — F5'-CAAGAACCTACTGCTAATGCCA-3', R5'-TTTGGTGAGGCTGTCCGA-3'; EPAS1 — F5'-TG GAGTATGAAGAGCAAGCCT-3', R5'-GGGAACCTGCTCTTGCTGT-3'; NF- κ B — F5'-CGTGTAACCAAAGCCCTAAA-3', R5'-AACCAAGAAAGGAAGCCAAGT-3'; RELA — F5'-GGAGCACAGATACCACCAAGA-3', R5'-GGGTTGTTGTTGGTCTGGAT-3'; VEGFA — F5'-AGGGCAGAATCATCAGGAA-3', R5'TCTTGCTCTATCTTTCTTTGGTCT-3'; KDR — F5'AAACACAGCAGGAATCAGTCA-3' R5'-GTGGTGTCTGTGTCATCGGA-3'; 4-BP1 — F5'-CAGCCCTTTCTCCCTCACT-3', R5'-TTCCCAAGCACATCAACCT-3'; AKT1 — F5'-CGAGGACGCCAAGGAGA-3', R5'-GTCATCTTGGTCAGGTGGTGT-3v; C-RAF — F5'-TG GTGTGTCTCTGCTCCCT-3', R5'-ACTGCCTGCTACCTTACTTCCT-3'; GSK3 β — F5'-AGACAAGGACGGCAGCAA-3', R5'-TGAGAGTAGAAGAAATAACGCAAT-3'; 70 S6 киназа: F5'-CAGCACAGCAAATCCTCAGA-3', R5'-ACACATCTCCCTCTCCACCTT-3'; mTOR — F5'-CCAAAGGCAACAAGCGAT-3', R5'-TTCACCAAACCGTCTCCAA-3'; PDK1 — F5'-TCACCAGGACAGCCAATACA-3', R5'-CTCCTCGGTCACTCATCTTCA-3'; VHL — F5'-GGCAGGCGAATCTCTTGA-3', R5'-CTATTTCTTTACTCAGCACCATT-3'; PD-L2 — F5'-GTTCCACATACCTCAAGTCCAA-3', R5'-ATAGCACTGTTCACTTCCCTCTT-3'; PD-L1 — F5'-AGGGAGAATGATGGATGTGAA-3', R5'-ATCATTCACAACCACACTCACAT-3'; PD — F5'-CTGGGCGGTGTCTACAACCT-3', R5'-CTTCTGCCCTTCTCTGTCA-3'; AMPK — F5'-AAGATGTCCATTGGATGCACT-3', R5'-TGAGGTGTTGAGGAACCAGAT-3'; LC3B — F5'-CCCAAACCGCAGACACAT-3', R5'-ATCCCACCAGCCAGCAC-3'; GAPDH — F5'-GG AAGTCAGGTGGAGCGA-3', R5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGA-3'.

Двухшаговая программа амплификации включала: 1 цикл — 94 °C, предварительная денатурация 10 мин; 40 циклов — 1-й шаг 94 °C, 10 с, 2-й шаг 20 с при температуре 60 °C. Праймеры подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>).

В качестве референсного гена применяли ген «домашнего хозяйства» фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Уровень экспрессии каждого целевого гена нормализовали по отношению к экспрессии GAPDH. Количественный анализ экспрессии проводили по 2 $\Delta\Delta$ Ct по отношению к конститутивно-экспрессируемому гену-рефери этого фермента.

Получение гомогенатов. Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали 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 g и 4 °C.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 12.0. Для оценки нормальности использовали критерий Колмогорова—Смирнова. Результаты определения экспрессии генов представлены как медиана (Q₁; Q₃). Значимость различий независимых параметров оценивали по U-критерию Манна—Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. При сравнении различий в более чем двух исследуемых группах применяли непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскела—Уоллиса).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования в ткани меланомы выявлено повышение экспрессии 70 S6 киназы и VHL в 33,3 и 7,14 раза соответственно по сравнению с образцами ткани базально-клеточного рака кожи (табл. 1), что свидетельствует об активации компонентов внутриклеточных сигнальных каскадов при развитии злокачественной опухоли кожи.

Наличие признаков изъязвления ассоциировано со снижением уровня мРНК c-RAF, NF- κ B p50 и HIF-1 в 2,17; 1,76 и 4 раза соответственно по сравнению с опухолями без признаков изъязвления. При этом отмечено увеличение экспрессии HIF-2, которая возросла в 2 раза при наличии изъязвлений (см. табл. 2).

Полученные результаты показали связь изучаемых молекулярных показателей с толщиной опухоли по Бреслоу (табл. 3). Пациенты 3-й и 4-й групп (с опухолью толщиной 1,51–3 и 3–4 мм соответственно) были объединены из-за небольшого количества. Отмечено, что экспрессия c-RAF волнообразно изменялась в зависимости от толщины опухоли. При этом самые низкие уровни мРНК наблюдались у пациентов 3-й и 4-й групп с опухолью толщиной 1,51–3 и 3–4 мм.

Выявлено изменение экспрессии 70 S6 киназы и PD-L1: уровень мРНК 70 S6 киназы во 2-й, 3–4-й и 5-й группах снижался в 4,5; 5,68 и 5 раз соответственно по сравнению с пациентами с опухолью толщиной <0,75 мм, а уровень экспрессии PD-L1 — в 10,6; 3,8 и 5 раз соответственно.

Кроме того, отмечалось снижение экспрессии mTOR у пациентов с опухолью толщиной 0,75–1,5, 1,51–3, 3–4 мм в 4,75 и 2,69 раза соответственно по сравнению с больными с опухолью толщиной <0,75 мм. Аналогичные изменения зафиксированы для экспрессии PD-L2 и AMPK: наблюдалось уменьшение уровня их мРНК. У больных с толщиной опухоли 0,75–1,5 мм и >4,0 мм отмечалось снижение уровня экспрессии

Таблица 1. Экспрессия транскрипционных и ростовых факторов, компонентов сигнального пути AKT/mTOR, рецепторов и лигандов программируемой клеточной гибели ткани меланомы по сравнению с базально-клеточным раком кожи, у. е., Me (Q1; Q3)

Table 1. Expression of transcription and growth factors, components of the AKT/mTOR signaling pathway, receptors and ligands of programmed cell death in melanoma compared to basal cell carcinoma, a. u., Me (Q1; Q3)

Показатель Parameter	Базалиома (n = 18) Basal cell carcinoma (n = 18)	Меланома (n = 21) Melanoma (n = 21)
4EBP1	1,00 (0,02; 3,62)	2,10 (0,16; 31,21)
AKT	0,42 (0,00; 1,91)	1,00 (0,37; 4,52)
c-RAF	0,43 (0,01; 1,00)	0,50 (0,29; 3,72)
GSK-3β	0,13 (0,02; 0,52)	0,85 (0,25; 4,34)
70 S6 киназа 70 S6 kinase	0,03 (0,03; 0,24)	1,00* (0,56; 1,93)*
m-TOR	0,97 (0,95; 8,00)	1,95 (0,92; 6,75)
PDK1	1,53 (0,52; 2,30)	0,95 (0,49; 2,94)
PTEN	0,01 (0,00; 9,88)	0,72 (0,34; 1,75)
NF-kB p65	0,20 (0,17; 1,00)	0,56 (0,06; 3,89)
NF-kB p50	0,05 (0,01; 0,84)	1,02 (0,28; 2,85)
VEGFR2	1,84 (0,50; 3,47)	1,00 (0,34; 1,92)
VEGF	1,00 (0,20; 1,47)	1,50 (0,30; 3,27)
CAIX	0,13 (0,01; 0,17)	1,30 (0,46; 3,9)
HIF-1	0,26 (0,07; 3,03)	1,18 (0,31; 8,00)
HIF-2	0,81 (0,25; 104,80)	1,06 (0,19; 3,00)
VHL	0,14 (0,02; 0,22)	1,00 (0,55; 3,07)*
PD-1	1,15 (0,37; 6,87)	1,70 (0,44; 3,19)
PD-L1	0,60 (0,25; 0,69)	1,30 (0,15; 3,12)
PD-L2	1,34 (1,00; 2,48)	0,66 (0,14; 2,00)
AMPK	0,00 (0,00; 0,36)	1,00 (0,39; 4,00)
LC3B	0,50 (0,03; 2,01)	1,00 (0,13; 20,55)

*Значимость различий по сравнению с пациентами с базалиомой, $p < 0,05$.
*Significance of the differences compared to patients with basal cell carcinoma, $p < 0.05$.

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; NF-kB – транскрипционный ядерный фактор каппа В; GSK-3β – киназа-3 β-гликогенсинтазы; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; HIF-1 – фактор, индуцируемый гипоксией 1; HIF-2 – фактор, индуцируемый гипоксией 2; PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели 1; PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1; PD-L2 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 2.
Note. Here and in Tables 2, 3: mTOR – mammalian target of rapamycin; NF-kB – transcription nuclear factor kappa B; GSK-3β – glycogen synthase kinase-3 β; VEGF – vascular endothelial growth factor; HIF-1 – hypoxia-inducible factor 1; HIF-2 – hypoxia-inducible factor 2; PD-1 – programmed cell death receptor 1; PD-L1 – programmed cell death-ligand 1; PD-L2 – programmed cell death-ligand 2.

PD-L2 в 11,2 и 18,95 раза соответственно по сравнению с больными с толщиной опухоли <0,75 мм. Уровень мРНК AMPK у данных пациентов в этих условиях снижался в 4,13 и 10 раз соответственно.

Выявлено также уменьшение экспрессии NF-kB p50 в 3–4-й и 5-й группах в 17,77 и 4,44 раза соответственно по сравнению с 1-й группой. Для опухолей

толщиной 1,51–3 и 3–4 мм характерны самые низкие уровни мРНК 4EBP1, c-RAF, PTEN, HIF-1 и LC3B, которые были ниже в 9,37; 15,92; 7,35; 36,0 и 206,25 раза соответственно по сравнению с больными с опухолью толщиной <0,75 мм.

У больных с опухолью толщиной >4 мм зафиксировано снижение экспрессии HIF-2 и киназы-3

Таблица 2. Экспрессия транскрипционных и ростовых факторов, компонентов сигнального пути АКТ/мTOR, рецепторов и лигандов программируемой клеточной гибели ткани меланомы в зависимости от наличия изъязвления опухоли, у.е., Ме (Q1; Q3)

Table 2. Expression of transcription and growth factors, components of the АКТ/мTOR signaling pathway, receptors and ligands of programmed cell death in melanoma tissue depending on the presence of tumor ulceration, a.u., Ме (Q1; Q3)

Показатель Parameter	Отсутствие изъязвления (n = 8) Without ulceration (n = 8)	Наличие изъязвления (n = 9) With ulceration (n = 9)
4EBP1	2,21 (0,50; 30,42)	0,18 (0,15; 3,78)
АКТ	0,71 (0,33; 4,00)	1,00 (0,91; 2,00)
c-RAF	0,50 (0,44; 4,00)	0,23 (0,07; 0,47)*
GSK-3β	0,78 (0,04; 1,03)	1,50 (0,50; 7,18)
70 S6 киназа 70 S6 kinase	1,22 (0,25; 2,00)	0,66 (0,63; 1,00)
m-TOR	1,35 (0,03; 6,85)	2,00 (1,90; 3,10)
PKD1	0,80 (0,10; 2,93)	1,97 (1,00; 2,95)
PTEN	1,00 (0,39; 1,22)	0,37 (0,31; 0,50)
NF-kB p65	0,28 (0,06; 1,00)	0,65 (0,06; 3,79)
NF-kB p50	1,22 (1,00; 3,70)	0,69 (0,40; 1,00)*
VEGFR2	1,00 (0,04; 1,39)	0,57 (0,50; 4,00)
VEGF	1,00 (0,03; 4,00)	2,00 (0,91; 2,00)
CAIX	1,00 (0,01; 2,00)	1,00 (0,67; 2,00)
HIF-1	2,00 (0,18; 16,00)	0,50 (0,45; 0,50)*
HIF-2	0,99 (0,00; 1,00)	2,00 (1,13; 4,00)*
VHL	1,00 (0,68; 4,05)	0,86 (0,58; 2,00)
PD-1	0,50 (0,38; 1,99)	2,00 (0,50; 2,95)
PD-L1	1,60 (0,00; 8,00)	0,76 (0,75; 3,73)
PD-L2	0,39 (0,02; 2,00)	0,83 (0,50; 1,44)
AMPK	1,00 (0,00; 4,00)	1,00 (0,87; 3,97)
LC3B	1,00 (0,04; 32,00)	0,13 (0,13; 0,25)

*Значимость различий по сравнению с пациентами без признаков изъязвления, $p < 0,05$.
*Significance of differences compared to patients without signs of ulceration, $p < 0.05$.

β-гликогенсинтазы (GSK-3β); уровень мРНК данных показателей уменьшился в 1,57 и 1,61 раза соответственно. При этом для опухолей толщиной 1,51–3 и 3–4 мм отмечено снижение экспрессии 4EBP1, PTEN, NF-kB p50 и HIF-1 в 10,84; 4,09; 9,04 и 3,48 раза соответственно по сравнению с опухолью толщиной 0,75–1,5 мм. Высокие показатели экспрессии выявлены для опухолей толщиной >4,0 мм: наблюдалось повышение уровня экспрессии 4EBP1, c-RAF, PTEN, NF-kB p50, HIF-1 и LC3B в 1,34; 12,78; 2,94; 4,0; 32,0 и 29,88 раза соответственно

по сравнению с опухолями толщиной 1,51–3 и 3–4 мм. Полученные данные свидетельствуют о наличии особенностей транскрипционного профиля ростовых факторов, их рецепторов, а также компонентов сигнальных каскадов, которые характерны для опухолей с высоким инвазивным потенциалом.

В целом результаты исследования свидетельствуют о связи толщины опухоли по Бреслоу (глубины инвазии трансформированных клеток) с изменением экспрессии молекулярных факторов.

Таблица 3. Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов, компонентов сигнального пути АКТ/мTOR, рецепторов и лигандов программируемой клеточной гибели ткани меланомы в зависимости от толщины опухоли по Бреслоу, у.е., Me (Q1; Q3)

Table 3. Expression of transcription and growth factors, components of the АКТ/мTOR signaling pathway, receptors and ligands of programmed cell death in melanoma tissue depending on the Breslow's depth, Me (Q1; Q3), a.u.

Показатель Parameter	1-я группа (<0,75 мм) (n = 2) Group 1 (<0.75 mm) (n = 2)	2-я группа (0,75–1,5 мм) (n = 7) Group 2 (0.75–1.5 mm) (n = 7)	3-я (1,51–3,00 мм) и 4-я группы (3–4 мм) (n = 3) Groups 3 (1.51–3.00 mm) and 4 (3–4 mm) (n = 3)	5-я группа (>4,0 мм) (n = 5) Group 5 (>4.0 mm) (n = 5)
	Критерий Краскела–Уоллиса, p < 0,05 Kruskal–Wallis test, p < 0.05			
4EBP1	15,46 (0,50; 30,42)	17,89 (2,06; 67,00)	1,65 (0,15; 0,18)*. **	2,21 (2,00; 2,58)***
АКТ	32,06 (0,13; 64,00)	0,95 (0,66; 1,00)	2,63 (0,21; 5,05)	0,71 (0,33; 4,00)
c-RAF	4,30 (0,50; 8,10)	0,73 (0,18; 32,55)	0,27 (0,07; 0,47)*	3,45 (0,50; 4,00)***
GSK-3β	16,02 (0,04; 32,00)	1,26 (0,76; 19,13)	3,82 (0,47; 7,18)	0,78 (0,26; 1,00)**
70 S6 киназа 70 S6 kinase	5,00 (2,00; 8,00)	1,11 (0,83; 1,93)*	0,88 (0,63; 1,13)*	1,00 (0,25; 1,87)*
mTOR	6,75 (6,66; 6,85)	1,42 (0,43; 2,23)*	2,51 (1,90; 3,12)*	1,35 (1,00; 8,00)
PDK1	4,50 (1,00; 8,00)	0,75 (0,30; 1,48)	1,79 (0,64; 2,95)	0,80 (0,49; 2,93)
PTEN	2,50 (1,00; 4,00)	1,39 (0,44; 3,14)	0,34 (0,31; 0,37)*. **	1,00 (0,50; 1,22)***
NF-kB p65	0,36 (0,25; 0,48)	0,35 (0,06; 2,96)	1,92 (0,06; 3,79)	1,00 (0,28; 2,00)
NF-kB p50	4,62 (2,00; 7,24)	2,35 (0,84; 17,85)	0,26 (0,13; 0,40)*. **	1,04 (1,00; 1,22)*. ***
VEGFR2	1,50 (1,00; 2,00)	0,59 (0,11; 2,50)	11,64 (0,57; 22,71)	1,31 (1,00; 1,39)
VEGF	3,24 (2,48; 4,00)	1,27 (0,28; 33,00)	1,73 (0,91; 2,55)	1,00 (0,07; 4,68)
CAIX	6,28 (0,25; 12,31)	0,83 (0,34; 8,50)	2,94 (0,08; 5,80)	1,61 (1,00; 2,00)
HIF-1	9,00 (2,00; 16,00)	0,87 (0,34; 128,62)	0,25 (0,06; 0,45)*. **	8,00 (1,40; 16,00)***
HIF-2	4,50 (1,00; 8,00)	1,56 (0,58; 9,00)	9,17 (0,35; 17,99)	0,99 (0,00; 1,00)*. **
VHL	16,34 (0,68; 32,00)	3,02 (1,43; 4,52)	1,19 (0,28; 2,10)	1,00 (1,00; 1,20)
PD-1	2,64 (1,85; 3,43)	1,25 (0,44; 3,00)	4,84 (0,27; 9,42)	0,50 (0,50; 1,99)
PD-L1	8,00 (8,00; 8,00)	0,75 (0,37; 1,38)*	2,01 (0,29; 3,73)*	1,60 (0,02; 2,00)*
PD-L2	7,39 (2,00; 12,79)	0,66 (0,26; 4,41)*	2,96 (1,44; 4,48)	0,39 (0,25; 1,75)*
AMPK	10,00 (4,00; 16,00)	2,42 (0,43; 3,98)*	6,82 (0,06; 13,59)	1,00 (1,00; 3,75)*
LC3B	16,50 (1,00; 32,00)	0,31 (0,14; 32,19)	0,08 (0,04; 0,13)*	2,39 (1,00; 64,00)***

*Значимость различий с 1-й группой, p < 0,05. **Значимость различий со 2-й группой, p < 0,05. ***Значимость различий с 3-й и 4-й группами, p < 0,05.

*Significance of differences compared to the 1st group, p < 0.05. **Significance of differences compared to the 2nd group, p < 0.05. ***Significance of differences compared to the 3rd and 4th groups, p < 0.05.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования выявлены молекулярные особенности меланом, определяющие характер развития заболевания, в частности рост экспрессии 70 S6 киназы и VHL, что свидетельствует об активации сигнального каскада АКТ/мTOR и процессов неоангиогенеза. При этом наличие признаков изъязвления опухоли ассоциировано с низким уровнем мРНК c-RAF, NF-kB

p50 и HIF-1 на фоне повышения экспрессии HIF-2. Вероятно, активное распространение опухоли происходит из-за развития гипоксии, которая является главным индуктором роста и развития новых сосудов [18].

Исследование молекулярных особенностей опухоли в связи с толщиной опухоли по Бреслоу позволило выявить влияние транскрипционных и ростовых факторов на интенсивность процессов внутриклеточ-

ного сигналинга, модификации микроокружения, процессов аутофагии и неоангиогенеза. При анализе данных показателей отмечался вариабельный характер течения заболевания. Самые низкие уровни экспрессии 4EBP1, c-RAF, 70 S6 киназы и PTEN выявлены для опухолей толщиной 1,51–3 и 3–4 мм, при этом увеличение данных показателей зафиксировано у больных с опухолью толщиной >4 мм. Вероятно, активность процессов онкогенеза опосредуется за счет модификации экспрессии компонентов сигнальных каскадов, транскрипционных и ростовых факторов.

Данные, полученные в настоящем исследовании, подтверждают большую роль биологических характеристик опухоли в формировании ее клинических особенностей. Значимость сигнального каскада АКТ/ mTOR отмечена для меланом при отсутствии мутации *BRAF*^{V600E}. С учетом гетерогенности данной мутации значимыми для онкогенеза становятся процессы аутофагии [8, 9]. Показано, что рост экспрессии LC3B — ключевого белка аутофагосом [10, 11] — может определять особенности агрессивного роста опухоли.

В то же время известно, что модификация иммуногенности опухоли и влияние гипоксии способны изменять агрессивные свойства опухоли [13, 14, 17]. Это связано с вовлеченностью большого количества иммунокомпетентных клеток в процессы онкогенеза и изменения мишени для активации противоопухолевого иммунитета. Данные факты были также подтверждены в настоящем исследовании. Выявлено повышение экспрессии транскрипционных факторов HIF-1 и HIF-2, а также снижение экспрессии рецептора PD-1 и его лигандов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлены молекулярные и биологические особенности меланом, связанные с инвазивным ростом опухоли. Увеличение экспрессии 70 S6 киназы и VHL характерно для злокачественных опухолей кожи. Изменение экспрессии транскрипционных характеристик факторов и ключевых маркеров онкогенеза связано с формированием инвазивного потенциала опухоли.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Arnold M., Singh D., Laversanne M. et al. Global burden of cutaneous melanoma in 2020 and projections to 2040. *JAMA Dermatol* 2022;158(5):495–503. DOI: 10.1001/jamadermatol.2022.0160
2. Rabbie R., Ferguson P., Molina-Aguilar C. et al. Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. *J Pathol* 2019;247(5):539–51. DOI: 10.1002/path.5213
3. Tehranian C., Fankhauser L., Harter P.N. et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway as a preventive target in melanoma brain metastasis. *Neuro Oncol* 2022;24(2):213–25. DOI: 10.1093/neuonc/noab159
4. Ito T., Hashimoto H., Kaku-Ito Y. et al. Nail apparatus melanoma: current management and future perspectives. *J Clin Med* 2023; 12(6):2203. DOI: 10.3390/jcm12062203
5. Manzano J.L., Martin-Liberal J., Fernández-Morales L.A. et al. Adjuvant dabrafenib and trametinib for patients with resected BRAF-mutated melanoma: DESCRIBE-AD real-world retrospective observational study. *Melanoma Res* 2023;33(5):388–97. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000888
6. Johnson D.B., Menzies A.M., Zimmer L. et al. Acquired BRAF inhibitor resistance: a multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms. *Eur J Cancer* 2015;51(18):2792–9. DOI: 10.1016/j.ejca.2015.08.022
7. Schadendorf D., van Akkooi A.C.J., Berking C. et al. Melanoma. *Lancet* 2018;392(10151):971–84. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31559-9
8. Teixeira C., Castillo P., Martinez-Vila C. et al. Molecular markers and targets in melanoma. *Cells* 2021;10(9):2320. DOI: 10.3390/cells10092320
9. Ito T., Tanaka Y., Murata M. et al. BRAF heterogeneity in melanoma. *Curr Treat Options Oncol* 2021;22(3):20. DOI: 10.1007/s11864-021-00818-3
10. Long J., Pi X. Polyphyllin I promoted melanoma cells autophagy and apoptosis via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Biomed Res Int* 2020;2020:5149417. DOI: 10.1155/2020/5149417
11. Zhang Z., Richmond A., Yan C. Immunomodulatory properties of PI3K/AKT/mTOR and MAPK/MEK/ERK inhibition augment response to immune checkpoint blockade in melanoma and triple-negative breast cancer. *Int J Mol Sci* 2022;23(13):7353. DOI: 10.3390/ijms23137353
12. Спирина Л.В., Чижевская С.Ю., Кондакова И.В. Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/М-ТОР сигнального пути в ткани папиллярного рака щитовидной железы. *Проблемы эндокринологии* 2018;64(4):208–15. DOI: 10.14341/probl9310
13. Spirina L.V., Chizhevskaya S.Yu., Kondakova I.V. Expression of transcription, growth factors and components of the AKT/MTOR signaling pathway in papillary thyroid cancer tissue. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology* 2018;64(4):208–15. (In Russ.). DOI: 10.14341/probl9310
14. Deng G., Zeng F., Su J. et al. BET inhibitor suppresses melanoma progression via the noncanonical NF-κB/SPP1 pathway. *Theranostics* 2020;10(25):11428–43. DOI: 10.7150/thno.47432
15. Malekan M., Ebrahimzadeh M.A., Sheida F. The role of hypoxia-inducible factor-1α and its signaling in melanoma. *Biomed Pharmacother* 2021;141:111873. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111873
16. Das R., Mehta D.K., Dhanawat M. Medicinal plants in cancer treatment: contribution of nuclear factor-kappa B (NF-κB) inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 2022;22(15):1938–62. DOI: 10.2174/1389557522666220307170126
17. Chen G., Huang A.C., Zhang W. et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 2018;560(7718):382–6. DOI: 10.1038/s41586-018-0392-8
18. Nanamori H., Sawada Y. Epigenetic modification of PD-1/PD-L1-mediated cancer immunotherapy against melanoma. *Int J Mol Sci* 2022;23(3):1119. DOI: 10.3390/ijms23031119
19. Finger E.C., Cheng C.F., Williams T.R. et al. CTGF is a therapeutic target for metastatic melanoma. *Oncogene* 2014;33(9):1093–100. DOI: 10.1038/onc.2013.47

Вклад авторов

К.В. Никульников, С.Ю. Чижевская, В.И. Чернов: сбор и анализ клинических данных;
В.А. Богданова, Л.В. Спирина: проведение лабораторных исследований, написание текста статьи;
Е.Л. Чойнзонов, И.В. Кондакова: финансовое сопровождение.

Author's contribution

K.V. Nikulnikov, S.Yu. Chizhevskaya, V.I. Chernov: collection and analysis of clinical data;
V.A. Bogdanova, L.V. Spirina: conducting laboratory research, article writing;
E.L. Choinzonov, I.V. Kondakova: financial support.

ORCID авторов / ORCID authors

К.В. Никульников / K.V. Nikulnikov: <https://orcid.org/0009-0004-7211-7686>
В.А. Богданова / V.A. Bogdanova: <https://orcid.org/0009-0003-8473-4182>
Л.В. Спирина / L.V. Spirina: <https://orcid.org/0000-0002-5269-736X>
С.Ю. Чижевская / S.Yu. Chizhevskaya: <https://orcid.org/0000-0003-2974-4778>
И.В. Кондакова / I.V. Kondakova: <https://orcid.org/0000-0002-0947-8778>
Е.Л. Чойнзонов / E.L. Choinzonov: <https://orcid.org/0000-0002-3651-0665>
В.И. Чернов / V.I. Chernov: <https://orcid.org/0000-0001-8753-7916>

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was conducted without sponsorship.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института онкологии ФГБУ «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 Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences.

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