

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-80-92>

# Изменения экспрессии генов-регуляторов апоптоза как фактор развития химиорезистентности сарком мягких тканей

Т.И. Фетисов<sup>1</sup>, С.А. Хазанова<sup>1</sup>, П.А. Штомпель<sup>1</sup>, Е.С. Трапезникова<sup>1</sup>, А.А. Тарарыкова<sup>1</sup>, В.Ю. Зиновьева<sup>1</sup>, В.И. Маршалл<sup>1</sup>, А.А. Ловенгер<sup>1</sup>, И.С. Купаева<sup>1</sup>, Д.В. Рогожин<sup>1</sup>, А.Ю. Бохян<sup>1</sup>, Г.А. Белицкий<sup>1</sup>, М.Г. Якубовская<sup>1</sup>, К.И. Кирсанов<sup>1,2</sup>

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

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

**Контакты:** Тимур Игоревич Фетисов [TimkaTryam@yandex.ru](mailto:TimkaTryam@yandex.ru)

**Введение.** Активное использование высокотоксичной химиотерапии в лечении сарком мягких тканей определяет необходимость поиска критериев и маркеров хеморезистентности пациентов к проводимой терапии.

**Цель исследования** – изучение взаимосвязи резистентности опухолевых клеток к химиотерапии и уровня экспрессии белков-регуляторов апоптоза (PUMA, PMAIP-1, PIDD-1, AIFM-2, Вах, GADD45а) в первичных культурах сарком мягких тканей.

**Материалы и методы.** Для получения первичных культур сарком мягких тканей использовалось ферментативное выделение, для определения клеточной гибели – резазуриновый тест. Экспрессия генов оценена с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени, количество белка – методом иммуноблоттинга.

**Результаты.** Получены 73 первичные культуры сарком мягких тканей, для которых с помощью резазуринового теста на цитотоксичность определена хемочувствительность к доксорубину, ифосфамиду, доцетакселу, гемцитабину, пазопанибу и их комбинациям. Обнаружены положительные связи экспрессии гена *AIFM-2* с резистентностью к пазопанибу, доксорубину и его комбинации с ифосфамидом в липосаркомах, синовиальных и недифференцированных плеоморфных саркомах. Кроме того, выявлена ассоциация экспрессии генов *Вах*, *PUMA*, *PMAIP-1*, *GADD45а* и *PIDD-1* с резистентностью к исследуемым препаратам в различных нозологических подгруппах сарком. Результаты исследования количества белка показали, что недифференцированные плеоморфные и синовиальные саркомы с низким содержанием GADD45а наиболее резистентны к исследуемым препаратам. Липосаркомы с высокой экспрессией Вах чувствительнее к доцетакселу и гемцитабину, в то время как синовиальные саркомы с высокой экспрессией Вах – к доксорубину и ифосфамиду, но не к доцетакселу и гемцитабину.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о взаимосвязи активности исследуемых генов-регуляторов апоптоза и резистентности к препаратам, применяемым в терапии сарком мягких тканей.

**Ключевые слова:** саркома мягких тканей, химиотерапия, апоптоз, хеморезистентность, прогноз индивидуальной чувствительности и развития лекарственной резистентности

**Для цитирования:** Фетисов Т.И., Хазанова С.А., Штомпель П.А. и др. Изменения экспрессии генов-регуляторов апоптоза как фактор развития химиорезистентности сарком мягких тканей. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(4):80–92.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-80-92>

## Changes in the expression of genes that regulate apoptosis as a factor in the development of chemoresistance in soft tissue sarcoma

T.I. Fetisov<sup>1</sup>, S.A. Khazanova<sup>1</sup>, P.A. Shtompel<sup>1</sup>, E.S. Trapeznikova<sup>1</sup>, A.A. Tararykova<sup>2</sup>, V.Yu. Zinovyeva<sup>1</sup>, V.I. Marshall<sup>1</sup>, A.A. Lowenger<sup>1</sup>, I.S. Kupaeva<sup>1</sup>, D.V. Rogozhin<sup>1</sup>, A.Yu. Bokhyan<sup>1</sup>, G.A. Belitsky<sup>1</sup>, M.G. Yakubovskaya<sup>1</sup>, K.I. Kirsanov<sup>1,2</sup>

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

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

**Contacts:** Timur Igorevich Fetisov [TimkaTryam@yandex.ru](mailto:TimkaTryam@yandex.ru)

**Introduction.** The active use of highly toxic chemotherapy in the treatment of soft tissue sarcomas determines the need to search for criteria and markers of chemoresistance of patients to the therapy.

**Aim.** To study the connection between tumor cell resistance to chemotherapy and expression levels of apoptosis-regulating proteins (*PUMA*, *PMAIP-1*, *PIDD-1*, *AIFM-2*, *Bax*, *GADD45a*) in primary cultures of soft tissue sarcomas.

**Materials and methods.** Primary cultures of soft tissue sarcomas were obtained using enzymatic digestion, cell death was evaluated using resazurine assay. Gene expression was measured using real-time polymerase chain reaction, protein levels using immunoblotting assay.

**Results.** 73 primary cultures of soft tissue sarcomas were obtained, for which chemosensitivity to doxorubicin, ifosfamide, docetaxel, gemcitabine, pazopanib and their combinations was determined using a resazurin cytotoxicity test. Associations of *AIFM-2* gene expression with resistance to pazopanib, doxorubicin and its combination with ifosfamide were found in liposarcoma, synovial and undifferentiated pleomorphic sarcomas. In addition, associations between the expression of the *Bax*, *PUMA*, *PMAIP-1*, *GADD45a* and *PIDD-1* genes and resistance to the studied drugs in various nosological subgroups of sarcomas were identified. When studying the amount of protein, it was revealed that undifferentiated pleomorphic and synovial sarcomas with a low content of *GADD45a* are more resistant to the studied drugs. Liposarcomas with high *Bax* expression are more resistant to docetaxel and gemcitabine, while synovial sarcomas with high *Bax* expression are more sensitive to doxorubicin and ifosfamide.

**Conclusion.** The data obtained indicate a relationship between the activity of the studied genes-regulators of apoptosis and resistance to drugs used in the treatment of soft tissue sarcomas.

**Keywords:** soft tissue sarcoma, chemotherapy, apoptosis, chemoresistance, prognosis of individual sensitivity and development of drug resistance

**For citation:** Fetisov T.I., Khazanova S.A., Shtompel P.A. et al. Changes in the expression of genes that regulate apoptosis as a factor in the development of chemoresistance in soft tissue sarcoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(4):80–92. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-80-92>

## ВВЕДЕНИЕ

Саркомы мягких тканей (СМТ) – гетерогенная группа злокачественных новообразований. По частоте возникновения данная патология занимает 5-е место среди всех онкологических заболеваний [1]. Эта группа опухолей включает более 70 гистологических подтипов, развивающихся из клеток-предшественниц жировой, мышечной и мезенхимальной тканей [2]. Широкое иссечение опухоли является основным методом лечения СМТ, однако опухоли высокой степени злокачественности требуют многокомпонентной терапии, которая включает хирургическое вмешательство, лучевую и химиотерапию (ХТ) [3].

Несмотря на значительное расширение спектра химиотерапевтических/таргетных препаратов, применяемых в онкологической практике в последние годы, ХТ СМТ не претерпела особых изменений и в основном включает классические химиопрепараты, используемые чаще всего при высокозлокачественных опухолях [3]. Развитие резистентности к этим лекарственным средствам является основной причиной неэффективности лечения и быстрого рецидивирования СМТ.

В настоящее время выделен ряд механизмов, способствующих развитию лекарственной устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам, включая нарушение метаболизма лекарственных средств, изменение свойств цитоплазматической мембраны, активацию выброса лекарственного средства

из клетки, дерегуляцию процессов репарации ДНК, приобретение опухолевыми клетками свойств стволовых клеток и ингибирование путей гибели [4]. Dereгуляция путей апоптоза является одной из ключевых характеристик опухолевых клеток [5], а снижение его активности тесно связано с возникновением резистентности [3]. Ранее для СМТ была продемонстрирована связь наличия мутаций в р53-зависимом пути активации апоптоза с развитием резистентности к ХТ [6]. Однако СМТ не относятся к опухолям с высокой мутационной нагрузкой, частота встречаемости мутаций в р53-зависимом пути активации апоптоза относительно низкая [6, 7]. Тем не менее для этих новообразований характерны значительные эпигенетические перестройки, приводящие к изменению активности генов, вовлеченных в канцерогенез, и развитие резистентности к ХТ.

Данное исследование сфокусировано на оценке экспрессии ряда генов р53-зависимого пути активации апоптоза (*PUMA*, *PMAIP-1*, *PIDD-1*, *Bax*, *AIFM-2*, *GADD45a*) в клетках СМТ с различным уровнем резистентности. Белки, кодируемые генами *Bax*, *PUMA*, *PMAIP-1* и *GADD45a*, являются положительными регуляторами митохондриального пути апоптоза [8], белок, кодируемый геном *PIDD-1*, взаимодействует с каспазой 2, что приводит к активации апоптоза [9], белок, кодируемый геном *AIFM-2*, осуществляет Вах-независимую активацию апоптоза [10]. Ранее была продемонстрирована связь активности этих генов

с развитием резистентности к ХТ при различных формах опухолей [11–13]. Для некоторых из них выявлено изменение экспрессии при СМТ [14, 15].

**Цель исследования** — изучение взаимосвязи уровня резистентности опухолевых клеток к химиопрепаратам и уровней экспрессии генов р53-зависимой активации апоптоза ((*PUMA*, *PMAIP-1*, *PIDD-1*, *Bax*, *AIFM-2*, *GADD45a*) в переживающих культурах СМТ.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Опухолевые образцы.** Все процедуры проводились в соответствии с Международным кодексом медицинской этики Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association). С ноября 2022 г. по март 2024 г. из хирургического отделения Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина получено 73 образца СМТ. В исследование вошли образцы СМТ, подтвержденные гистологически.

**Применяемые препараты.** В исследовании использовали доксорубин (Докс) (РОНЦ, Россия), доцетаксел (Доц) (ООО «Натива», Россия) и гемцитабин (Гем) (Biocad, Россия). Поскольку ифосфамид (Ифо) является пролекарством и требует активации в печени *in vivo*, был использован его активный метаболит — 4-гидроперокси-ифосфамид (4-ОН-Ифо) (Niomech, Германия).

**Измерение хемочувствительности.** Тест на определение хемочувствительности проводили непосредственно после получения опухолевого образца. Образцы забирали во время операции и с помощью скальпеля разделяли на фрагменты (1 мм<sup>3</sup>), которые затем диссоциировали путем инкубации в 5–10 мл стерильной смеси коллагеназ в течение 2–3 ч при 37 °С на шейкере для приготовления суспензии одиночных клеток. После доведения клеточной суспензии до концентрации 1–2 × 10<sup>5</sup> клеток/мл в каждую лунку 96-луночного микропланшета добавляли по 100 мкл суспензии клеток. Отдельные агенты протестированы при 6 различных стандартных концентрациях лекарственных средств, в частности, в 6,25; 12,5; 25; 50; 100 и 200 % пиковой концентрации лекарственного средства в плазме, как было предложено Р.Е. Andreotti и соавт. [16] (табл. 1).

Планшеты инкубировали в течение 6 дней при стандартных условиях (температура — 37 °С, влажность — 95 %, концентрация CO<sub>2</sub> — 5 %). Жизнеспособность клеток измеряли с помощью анализа на основе резазурина, как описано ранее [17]. Результаты теста интерпретировали с использованием индекса резистентности (ИР), рассчитываемого по формуле: ИР = 600 — сумма % ингибирования при 200, 100, 50, 25, 12,5 и 6,25 % стандартных концентрациях лекарственных средств [16].

**Выделение РНК и полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.** Тотальную РНК выделяли с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Для синтеза комплементарной ДНК использовали набор реагентов для

**Таблица 1.** Испытываемые препараты и их 100 % стандартные концентрации, использованные в тестах *in vitro*

Table 1. Studied pharmaceuticals and their 100 % standard concentrations using in *in vitro* assays

Препарат/комбинация Pharmaceutical/combination	100 % стандартная концентрация, мг/мл 100 % standard concentration, mg/mL
Доксорубин Doxorubicin	3,0
Ифосфамид (4-hydroxy-ифосфамид) Ifosfamide (4-hydroxy-ifosfamide)	3,0
Доксорубин + ифосфамид Doxorubicin + ifosfamide	3,0 + 3,0
Доцетаксел Docetaxel	11,3
Гемцитабин Gemcitabine	25,0
Доцетаксел + гемцитабин Docetaxel + gemcitabine	11,3 + 25,0
Пазопаниб Pazopanib	3,2

обратной транскрипции MMLV RT kit («Евроген», Россия). Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили с помощью интеркалирующего флуоресцентного агента SYBR Green I («Евроген», Россия) и ДНК-полимеразы Taq («Евроген», Россия) на приборе CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Программа амплификации: 95 °С, 3 мин (95 °С — 10 с, 60 °С — 10 с, 72 °С — 30 с) — 39 циклов, кривая плавления — 65–95 °С. Последовательности праймеров выбраны в PrimerBank. Результаты нормализовали по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства *RPLP0*. Использованные пары праймеров представлены в табл. 2.

**Вестерн-блоттинг.** Выделение общей фракции белка проводили лизис-буфером RIPA, инкубировали 40 мин с постоянным перемешиванием при 4 °С, затем центрифугировали (5 мин, 1500 об/мин, 20 °С). Вертикальный электрофорез проводили в 10 % полиакриламидном геле, для разделения использовали трис-глициновый буфер с добавлением додецилсульфата натрия (1 %). Форез выполняли в течение 30 мин при комнатной температуре и напряжении 60 В, затем 20 мин при 80 В, после чего напряжение увеличивали до 100 В — до тех пор, пока 3 нижних маркерных белка не разошлись на 5 мм друг от друга.

Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (0,22 мкм, Bio-Rad, США) выполняли при 100 В в течение 1 ч во льду — в трис-глициновом растворе. Контроль переноса осуществляли с помощью раствора

**Таблица 2.** *Использованные пары праймеров*Table 2. *Primer pairs used*

Ген Gene	Последовательность праймера Primer sequence
<i>GADD45</i>	hGADD45_F: GAGAGCAGAAGACCCGAAAGGA hGADD45_R: CACAACACCACGTTATCGGG
<i>BAX</i>	hBAX_F: TCATGGGCTGGACATTGGAC hBAX_R: GCGTCCCAAAGTAGGAGAGG
<i>PUMA</i>	hPUMA_F: GACGACCTCAACGCACAGTA hPUMA_R: TAATTGGGCTCCATCTCGGG
<i>PMAIP-1</i>	hPMAIP1_F: CCAGCCGCCAGTCTAATCA hPMAIP1_R: GTGCCCTTGGAAACGGAAGA
<i>PIDD-1</i>	hPIDD-1_F: CCATCCCTGCCAATATCCCG hPIDD-1_R: CGTCCGAATCCTCTGAAGCA
<i>AIFM-2</i>	hAIFM2_F: AGACAGGGTTTCGCCAAAAGA hAIFM2_R: CAGGTCTATCCCCACTACTAGC
<i>RPLP0</i>	RPLP0_F: CCTTCTCCTTTGGGCTGGTCAATCA RPLP0_R: CAGACACTGGCAACATTGCGGACAC

красителя Ponceau. Мембраны блокировали в растворе обезжиренного сухого молока в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего проводили гибридизацию первичными антителами ABclonal PUMA, PMAIP-1, PIDD-1, BAX, AIFM-2, GADD45a и контрольными антителами к актину в течение 16 ч при 4 °С.

Нормирование результатов выполняли с помощью иммуноблоттинга с антителами к  $\beta$ -актину. Для детекции белков использовали проявляющий реагент Clarity™ Western ECL Substrate и систему цифровой обработки изображений ImageQuant LAS 500. Денситометрический анализ проводили в программе ImageJ Fiji (National Institutes of Health, США).

**Статистический анализ.** Анализ различий между группами проведен с помощью расчета U-критерия Манна–Уитни. Для количественной оценки степени корреляции между параметрами рассчитан коэффициент корреляции Спирмена. Для анализа групп с различными типами гистологии использовали критерий Краскала–Уоллиса. Все расчеты проведены в GraphPad Prism 6.0 (США). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$  (двусторонний критерий).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Характеристика пациентов, вошедших в исследование.** Получены 73 образца от пациентов с СМТ. Средний возраст больных составил 52 года (диапазон 19–87 лет). В выборке незначительно преобладали пациенты женского пола (43 (59 %) случая). У 39 (53 %) больных диагноз установлен впервые. Наиболее частой локализацией СМТ были конечности (49 (66 %) случаев). В основном встречались опухоли нижних конечностей (30 (61 %) случаев). Наиболее распространенными

в нашей выборке оказались липосаркомы (ЛПС) (13 (18 %) случаев), чаще всего дедифференцированного типа (6 (46 %) случаев). Преобладали СМТ G<sub>3</sub> (55 (75 %) случаев).

Характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в табл. 3.

Для каждого выделенного образца проведен анализ химиорезистентности к Докс, Ифо, Гем, Доц и их комбинациям, а также к пазопанибу (Пазо). Полученные опухолевые культуры были более устойчивы к Ифо, Гем и Пазо. Комбинации Докс + Ифо и Доц + Гем оказались эффективнее препаратов, используемых в монорежиме. При этом не наблюдалось статистически значимой разницы между резистентностью клеток к каждой из комбинаций. Резистентны к обеим комбинациям оказались 36 % протестированных культур, в то время как 23 % были чувствительны к ним. Полученные в тесте ИР<sub>Докс</sub> и ИР<sub>Ифо</sub> положительно коррелировали между собой и сильно коррелировали с ИР<sub>Доц + Ифо</sub> ( $r = 0,31$ ;  $r = 0,86$  и  $r = 0,52$  соответственно;  $p < 0,001$ ). ИР<sub>Доц</sub> и ИР<sub>Гем</sub> не коррелировали друг с другом и умеренно коррелировали с ИР<sub>Доц + Гем</sub> ( $r = 0,78$  и  $r = 0,47$  соответственно;  $p < 0,0001$ ). Кроме того, ИР<sub>Доц + Гем</sub> и ИР<sub>Докс + Ифо</sub> положительно коррелировали друг с другом ( $r = 0,39$ ;  $p < 0,001$ ), а ИР<sub>Пазо</sub> – с ИР<sub>Ифо</sub>, ИР<sub>Докс + Ифо</sub> и ИР<sub>Гем</sub> ( $r = 0,53$ ;  $r = 0,25$  и  $r = 0,32$  соответственно;  $p < 0,01$ ).

**Анализ экспрессии генов, p53-зависимой активации апоптоза в исследуемой группе сарком мягких тканей.** В образцах СМТ выявлена наиболее высокая экспрессия генов *PUMA*, *Bax* и *GADD45a* (рис. 1). Результаты исследования взаимосвязи экспрессии генов p53-зависимой активации апоптоза (*PUMA*, *PMAIP-1*, *PIDD-1*, *Bax*, *AIFM-2*, *GADD45a*) в 62 переживающих культурах СМТ

**Таблица 3.** Характеристика пациентов, включенных в исследование

Table 3. Characteristics of the patients included in the study

Показатель Parameter	Абс. (%) Abs. (%)
Пол: Sex:	
женский female	43 (59)
мужской male	30 (41)
Возраст, лет: Age, years:	
<40	17 (23)
>40	56 (77)
Степень злокачественности: Malignancy grade:	
G <sub>1-2</sub>	18 (25)
G <sub>3</sub>	55 (75)
Локализация опухоли: Tumor location:	
конечности limbs	49 (66)
туловище trunk	14 (19)
забрюшинное пространство retroperitoneal space	9 (12)
другие органы other organs	2 (3)
Вид опухоли: Tumor type:	
впервые выявленная primary	39 (53)
рецидив recurrent	34 (47)
Химиотерапия: Chemotherapy:	
не проводилась was performed	43 (58)
проводилась was not performed	30 (42)
Гистологический тип опухоли: Histological type of the tumor:	
липосаркома liposarcoma	13 (18)
синовиальная саркома synovial sarcoma	12 (16)
миксофибросаркома myxofibrosarcoma	12 (16)
лейомиосаркома leiomyosarcoma	10 (14)
недифференцированная плеоморфная саркома undifferentiated pleiomorphic sarcoma	8 (11)
другой other	18 (25)

продемонстрировали, что уровни экспрессии генов *PUMA*, *PIDD-1*, *Vax*, *PIDD-1*, *AIFM-2* и *PMAIP-1* положительно коррелируют друг с другом (табл. 4).

Далее проведен анализ уровней экспрессии РНК апоптоз-ассоциированных генов в различных гистологических типах СМТ: ЛПС, синовиальных саркомах (СС), миксофибросаркомах (МФС), недифференцированных плеоморфных саркомах (НПС) и лейомиосаркомах (ЛМС). Статистически значимой разницы в экспрессии исследуемых генов между различными гистологическими типами СМТ выявлено не было, однако на уровне тенденции ЛМС характеризовались более высоким уровнем экспрессии исследуемых генов, а СС – более низким (рис. 2).

Далее проведен корреляционный анализ связи между уровнями экспрессии генов активации апоптоза и ИР, полученными при тестировании *in vitro*. Для всех СМТ выявлена положительная корреляция средней силы уровня экспрессии гена *PIDD-1* с ИР<sub>Пазо</sub> ( $r = 0,35$ ;  $p = 0,009$ ), а также слабая положительная корреляция между уровнями экспрессии *Vax* и ИР<sub>Доц</sub> ( $r = 0,32$ ;  $p = 0,043$ ).

В ходе анализа корреляционных связей между экспрессией генов и ИР к препаратам в различных подгруппах СМТ получены следующие результаты.

**Липосаркомы (12 образцов).** Выявлена сильная корреляция уровня экспрессии *PMAIP-1* с ИР<sub>Ифо</sub> ( $r = -0,66$ ;  $p = 0,044$ ), а в образцах ЛПС G<sub>2</sub> и G<sub>3</sub> ( $n = 8$ ) продемонстрирована сильная положительная корреляция между уровнем экспрессии *AIFM-2* и ИР<sub>Докс + Ифо</sub> ( $r = 0,68$ ;  $p = 0,044$ ), а также между уровнями экспрессии генов *AIFM-2*, *GADD45a* и ИР<sub>Пазо</sub> ( $r = 0,76$  и  $r = 0,79$  соответственно;  $p = 0,04$  и  $p = 0,02$  соответственно).

**Синовиальные саркомы (8 образцов).** Установлена сильная положительная корреляция между уровнями экспрессии генов *AIFM-2* и *PIDD-1* и ИР<sub>Пазо</sub> ( $r = 0,91$  и  $r = 0,73$  соответственно;  $p = 0,005$  и  $p = 0,04$  соответственно).

**Миксофибросаркомы (10 образцов).** Уровень экспрессии гена *Vax* коррелировал с ИР<sub>Докс</sub> и ИР<sub>Доц</sub> ( $r = 0,68$  и  $r = 0,7$  соответственно;  $p = 0,05$  и  $p = 0,043$  соответственно), уровень экспрессии *GADD45a* – с ИР<sub>Гем</sub> ( $r = -0,88$ ;  $p = 0,003$ ), а уровень экспрессии *PIDD-1* – с ИР<sub>Доц</sub> и ИР<sub>Доц + Гем</sub> ( $r = 0,85$  и  $r = 0,78$  соответственно;  $p = 0,006$  и  $p = 0,017$  соответственно).

**Недифференцированные плеоморфные саркомы (8 образцов).** Выявлена сильная положительная корреляция между уровнем экспрессии гена *PUMA* и ИР<sub>Доц</sub> и ИР<sub>Доц + Гем</sub> ( $r = 0,83$  и  $r = 0,71$  соответственно;  $p = 0,015$  и  $p = 0,048$  соответственно), а также между уровнем экспрессии *PIDD-1* и ИР<sub>Доц + Гем</sub> и ИР<sub>Ифо</sub> ( $r = 0,58$  и  $r = 0,79$  соответственно;  $p = 0,015$  и  $p = 0,028$  соответственно). Уровень экспрессии гена *AIFM-2* отрицательно коррелировал с ИР<sub>Докс</sub> ( $r = -0,81$ ;  $p = 0,022$ ), а уровень экспрессии *Vax* положительно коррелировал с ИР<sub>Доц</sub> ( $r = 0,73$ ;  $p = 0,045$ ) (табл. 5).

В подгруппах ЛМС и других СМТ статистически значимых корреляций выявлено не было.

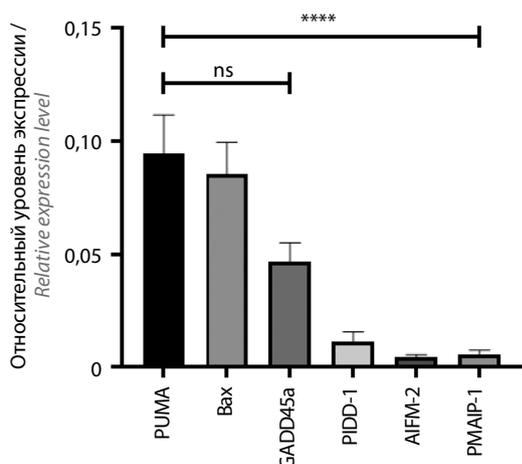
**Таблица 4.** Взаимосвязь экспрессии генов p53-зависимой активации апоптоза (коэффициент корреляции), выделены значимые корреляции

**Table 4.** Correlations between expression levels of p53-dependent apoptosis activation genes (correlation coefficient), significant correlations are highlighted

	<i>PUMA</i>	<i>Bax</i>	<i>PIDD-1</i>	<i>GADD45a</i>	<i>AIFM-2</i>	<i>PMAIP-1</i>
<i>PUMA</i>		<b>0,91</b>	<b>0,41</b>	<b>0,35</b>	-0,05	0,15
<i>Bax</i>	<0,0001		<b>0,31</b>	<b>0,44</b>	-0,05	0,11
<i>PIDD-1</i>	<0,001	<0,05		-0,13	<b>0,28</b>	<b>0,37</b>
<i>GADD45a</i>	<0,01	<0,0005	0,33		0,17	-0,15
<i>AIFM-2</i>	0,68	0,68	<0,05	0,19		0,19
<i>PMAIP-1</i>	0,26	0,39	<0,005	0,26	0,15	

**Примечание.** Жирным шрифтом выделены значимые корреляции.

Note. Significant correlations are shown in bold.



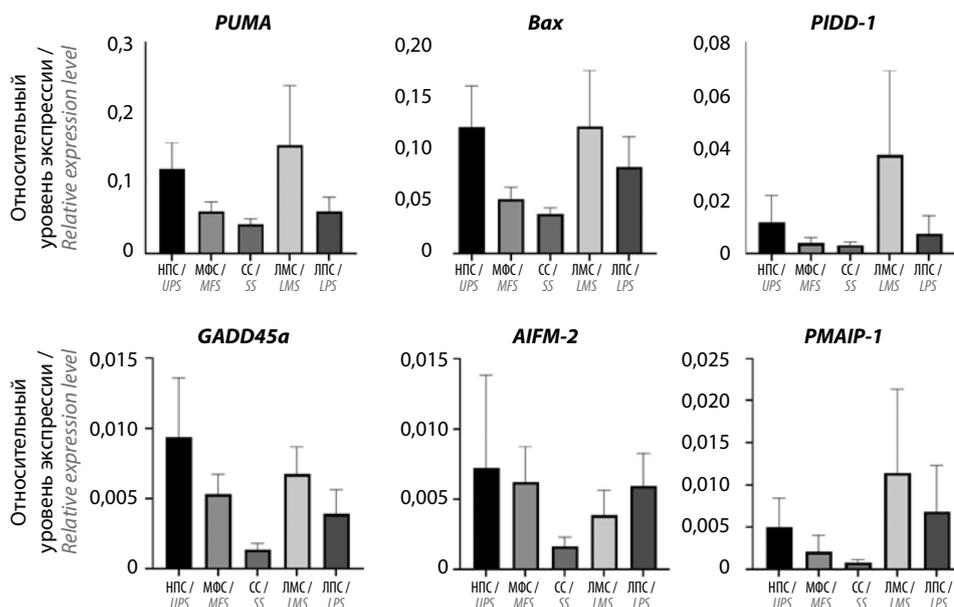
**Рис. 1.** Экспрессия исследуемых генов в саркомах мягких тканей.

\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns – нет статистически значимой разницы

**Fig. 1.** Expression of the studied genes in soft tissue sarcomas. \*\*\* $p < 0.0001$ ; ns – difference is not significant

**Анализ уровней белков генов p53-зависимой активации апоптоза в исследуемой группе сарком мягких тканей.**

На следующем этапе проведен анализ количества белкового продукта генов p53-зависимой активации апоптоза (*PUMA*, *PMAIP-1*, *PIDD-1*, *Bax*, *AIFM-2*, *GADD45a*) в 60 переживающих культурах СМТ. Выявлено, что в общей группе СМТ уровень матричной РНК (мРНК) гена *PUMA* отрицательно коррелировал с уровнем экспрессии этого гена на уровне белка ( $r = -0,35$ ;  $p = 0,02$ ). Установлена отрицательная корреляция между уровнями белков *Bax* и *AIFM-2* ( $r = -0,27$ ;  $p = 0,04$ ) и положительная – между количеством *GADD45a* и *PMAIP-1*, *PUMA* ( $r = 0,31$  и  $r = 0,26$  соответственно;  $p = 0,015$  и  $p = 0,044$  соответственно) (табл. 6). Наиболее высокая экспрессия продемонстрирована для белков *Bax*, *AIFM-2* и *PIDD-1*. Статистически значимых различий между уровнями экспрессии белков в образцах



**Рис. 2.** Уровень экспрессии исследуемых генов в разных гистологических типах сарком мягких тканей. НПС – недифференцированные плеоморфные саркомы; МФС – миксофибросаркомы; СС – синовиальные саркомы; ЛМС – лейомиосаркомы; ЛПС – липосаркомы

**Fig. 2.** Expression levels of the studied genes in various histological types of soft tissue sarcomas. UPS – undifferentiated pleiomorphic sarcomas; MFS – myxofibrosarcomas; SS – synovial sarcomas; LMS – leiomyosarcomas; LPS – liposarcomas

Таблица 5. Связь экспрессии исследуемых генов с индексом резистентности химиопрепаратов (r/p)

Table 5. Correlation between expression of the studied genes and chemotherapy drug resistance index (r/p)

Препарат Drug	PUMA	Bax	PIDD-1	GADD45a	AIFM-2	PMAIP-1
<b>Липосаркомы (общая группа)</b> Liposarcomas (general group)						
Докс Dox	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Ифо Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	0,04/-0,66
Докс + Ифо Dox + Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц Doc	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Гем Gem	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц и Гем	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Пазо Pazo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<b>Липосаркомы G2-3</b> Liposarcomas G2-3						
Докс Dox	-/-	-/-	-/-	0,06/0,69	-/-	-/-
Ифо Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Докс + Ифо Dox + Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	0,04/0,68	-/-
Доц Doc	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Гем Gem	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц + Гем Doc + Gem	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Пазо Pazo	-/-	-/-	-/-	0,03/0,76	0,02/0,79	-/-
<b>Синовиальные саркомы</b> Synovial sarcomas						
Докс Dox	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Ифо Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Докс + Ифо Dox + Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц Doc	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Гем Gem	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц + Гем Doc + Gem	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Окончание табл. 5

End of table 5

Препарат Drug	PUMA	Вах	PIDD-1	GADD45a	AIFM-2	PMAIP-1
Пазо Pazo	-/-	-/-	0,04/0,73	-/-	0,005/0,9	-/-
<b>Миксофибросаркомы</b> Muxofibrosarcoma						
Докс Dox	0,06 /0,6	0,05 /0,68	-/-	-/-	-/-	-/-
Ифо Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Докс + Ифо Dox+ Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц Doc	-/-	0,04/0,7	0,006/0,7	-/-	-/-	-/-
Гем Gem	-/-	-/-	-/-	0,003/-0,88	-/-	-/-
Доц + Гем Doc +Gem	-/-	-/-	0,017/0,78	-/-	-/-	-/-
Пазо Pazo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<b>Недифференцированные плеоморфные саркомы</b> Undifferentiated pleiomorphic sarcomas						
Докс Dox	-/-	-/-	-/-	-/-	0,02/-0,8	-/-
Ифо Ifo	-/-	-/-	0,027/0,78	-/-	-/-	-/-
Докс + Ифо Dox + Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц Doc	0,015/0,83	0,045/0,73	-/-	-/-	-/-	-/-
Гем Gem	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц + Гем Doc + Gem	0,048/0,71	-/-	0,015/0,83	-/-	-/-	-/-
Пазо Pazo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

**Примечание.** Докс – доксорубицин; Доц – доцетаксел; Гем – гемцитабин; Ифо – ифосфамид; Пазо – пазопаниб.

**Note.** Dox – doxorubicin; Doc – docetaxel; Gem – gemcitabine; Ifo – ifosfamide; Pazo – pazopanib.

с различными гистологическими типами СМТ не наблюдалось (рис. 3).

При анализе корреляций между уровнями экспрессии белков и ИР, полученными *in vitro*, для всех СМТ выявлена положительная корреляция средней силы между уровнем экспрессии Вах и PUMA и ИР<sub>Гем</sub> ( $r = 0,3$  и  $r = 0,41$  соответственно;  $p = 0,027$  и  $p = 0,002$  соответственно). Кроме того, количество белка PUMA коррелировало с ИР<sub>Пазо</sub> ( $r = 0,24$ ;  $p = 0,043$ ). В ходе

анализа корреляций между уровнями экспрессии белков и ИР в различных гистологических типах СМТ получены следующие результаты.

**Липосаркомы.** Образцы с высокой экспрессией белка Вах обладали большей резистентностью к Гем и Доц + Гем.

**Синовиальные саркомы.** Образцы с высокой экспрессией белка GADD45a оказались менее резистентны к Докс и Докс + Ифо по сравнению с образцами,

Таблица 6. Взаимосвязь уровней экспрессии исследуемых белков в образцах сарком мягких тканей (коэффициент корреляции)

Table 6. Correlations between expression levels of the studied genes in soft tissue sarcoma samples (correlation coefficient)

	<i>Bax</i>	<i>AIFM-2</i>	<i>GADD45a</i>	<i>PIDD-1</i>	<i>PMAIP-1</i>	<i>PUMA</i>
<i>Bax</i>		<b>-0,26</b>	-0,17	0,22	0,03	0,08
<i>AIFM-2</i>	<b>0,04</b>		-0,05	0,03	-0,13	0,03
<i>GADD45a</i>	0,2	0,68		-0,02	<b>0,31</b>	<b>0,26</b>
<i>PIDD-1</i>	0,09	0,83	0,89		0,11	0,21
<i>PMAIP-1</i>	0,83	0,31	<b>0,01</b>	0,44		0,05
<i>PUMA</i>	0,53	0,79	<b>0,04</b>	0,09	0,72	

Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые корреляции.

Note. Significant correlations are shown in bold.

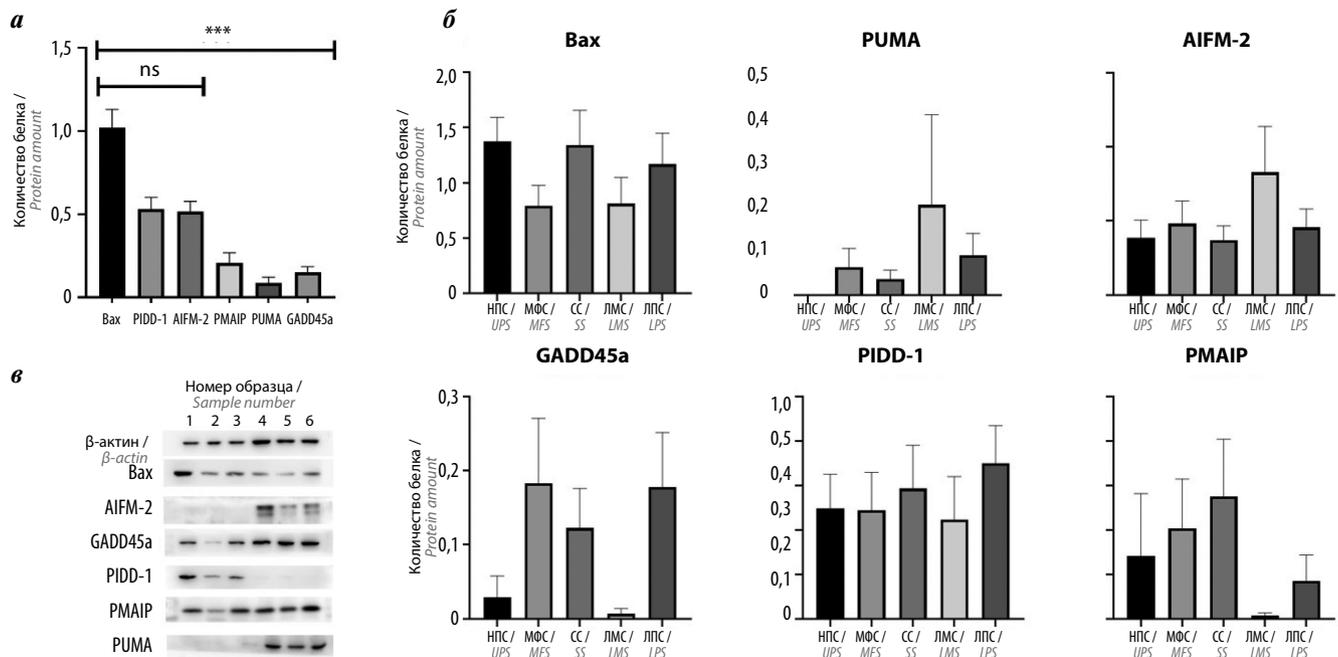


Рис. 3. Уровень экспрессии белков p53-зависимой активации апоптоза в саркомах мягких тканей: а – количество белкового продукта исследуемых генов в саркомах мягких тканей (СМТ); б – количество белка генов в разных гистологических типах СМТ; в – анализ уровня экспрессии белков методом вестерн-блоттинга в некоторых образцах СМТ. НПС – недифференцированные плеоморфные саркомы; МФС – миксофибросаркомы; СС – синовиальные саркомы; ЛМС – лейомиосаркомы; ЛПС – липосаркомы. \*\*\* $p < 0,001$ ; ns – нет статистически значимой разницы

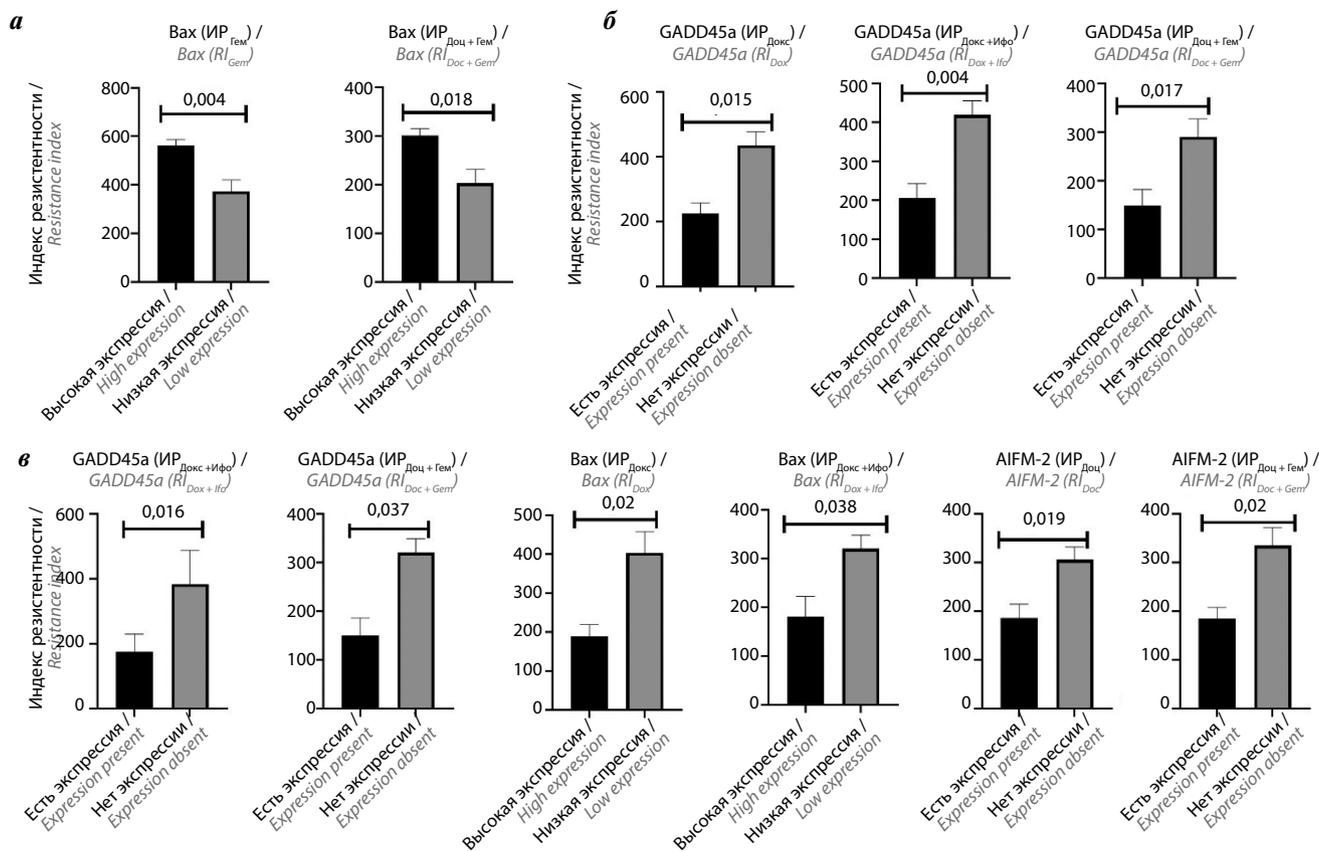
Fig. 3. Expression levels of p53-dependent apoptosis activation genes in soft tissue sarcomas: а – amount of protein products of the studied genes in soft tissue sarcomas (STS); б – amount of proteins of the genes in various STS histological types; в – western blot analysis of protein expression level in some STS samples. UPS – undifferentiated pleiomorphic sarcomas; MFS – myxofibrosarcomas; SS – synovial sarcomas; LMS – leiomyosarcomas; LPS – liposarcomas \*\*\* $p < 0.001$ ; ns – difference not significant

в которых белок не детектировался; образцы с высокой экспрессией белка Bax были более чувствительны к Докс и Докс + Ифо, а образцы с экспрессией AIFM-2 – менее резистентны к Доц и Доц + Гем.

**Недифференцированные плеоморфные саркомы.** В ходе сравнения образцов с дифференциальной

экспрессией белка GADD45a установлено, что образцы с высокой экспрессией белка GADD45a были менее резистентны к Докс и Докс + Ифо, а также к Доц + Гем (рис. 4).

В других подгруппах СМТ в рамках этого исследования корреляционных связей выявлено не было.



**Рис. 4.** Связь количества белка с индексом резистентности (ИР) химиопрепаратов: а – в липосаркомах; б – в недифференцированных плеоморфных саркомах; в – в синовиальных саркомах  
**Fig. 4.** Correlation between the amount of protein and resistance index (RI) of chemotherapy drugs: а – in liposarcomas; б – in undifferentiated pleiomorphic sarcomas; в – in synovial sarcomas

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Химиотерапия является одним из основных методов лечения СМТ высокой степени злокачественности. Она применяется совместно с основным методом лечения – хирургическим – и значительно снижает риски развития локальных рецидивов [18]. Однако данный метод имеет ряд существенных ограничений, одним из которых является резистентность опухоли к терапии. В развитие резистентности опухолевых клеток к ХТ вовлечено множество механизмов, из которых наиболее изучены рефлюкс лекарственных средств, ответ на повреждение ДНК и изменение в активности ферментов семейства СУР450 [4]. Результаты более раннего нашего исследования продемонстрировали, что экспрессия белков семейства АВС-транспортёров не играет ключевую роль в возникновении резистентности СМТ к ХТ, в то же время обнаружена связь между наличием мутаций в генах, вовлеченных в р53-зависимую активацию апоптоза, и резистентностью к Докс [6, 19]. Поскольку основным действием ХТ является индукция повреждений ДНК с последующей гибелью клеток, изучение активности апоптоза и его регуляторов будет способствовать развитию методов прогнозирования ответа на ХТ, а также поиску

новых мишеней для таргетных препаратов. В этом исследовании проанализирована экспрессия генов-регуляторов р53-зависимого апоптоза.

В ходе исследования уровней мРНК генов выявлено, что в образцах СМТ чаще всего встречались гены *PUMA*, *Vax* и *GADD45a*, в то время как среди белковых продуктов более высокая экспрессия была характерна для *Vax*, *AIFM-2* и *PIDD-1*. Таким образом, в СМТ *Vax* высоко экспрессирован на уровне как мРНК, так и белка. Данный белок является ключевым регулятором митохондриального пути апоптоза и непосредственно взаимодействует с антиапоптотическим белком *Bcl-2* [8]. Наши данные отчасти согласуются с результатами работ других научных групп. Ранее установлено, что в саркомах наблюдается высокая экспрессия антиапоптотических белков *Bcl-2*, *Bcl-xL* и *Bcl-w* [20]. Результаты еще одного исследования продемонстрировали высокое содержание белков *Vax* и *Bcl-2* в СМТ [21]. В более ранних работах не изучалась экспрессия вышеуказанных генов в НПС, которые стали рассматриваться в классификации СМТ как отдельная группа только с 2020 г. [2]. Также наша выборка содержала большее количество образцов НПС, чем в раннем исследовании. В связи с этим удалось установить, что

в некоторых образцах ген *Bax* не экспрессируется. Данное наблюдение представляется весьма важным, так как применение ингибиторов Bcl-2, действие которых направлено на активацию апоптоза за счет увеличения активности *Bax*, в настоящее время рассматривается в качестве перспективного подхода к сенситизации опухолевых клеток к Докс [22].

В ходе анализа уровней белков исследуемых генов выявлено, что их количество в основном не коррелировало с количеством мРНК этих же генов. Исключение составила экспрессия гена *PUMA*, уровень мРНК которой отрицательно коррелировал с количеством белка. Ранее было показано, что при сравнении уровней экспрессии мРНК и белка в клетках корреляции наблюдаются только в 40 % генов, что объясняется наличием посттранскрипционных и посттрансляционных модификаций, влияющих на количество конечного продукта [23, 24]. В случае гена *PUMA* обратная корреляция может также объясняться высокой активностью МАРК-киназных путей, которые в том числе являются положительными регуляторами деградации белка *Puma* [25–27].

В ходе анализа общей выборки сарком мы не обнаружили сильных корреляций между экспрессией генов, регулирующих апоптоз, и устойчивостью клеток к препаратам. В связи с наличием в данной выборке сарком различных гистологических подгрупп (18 подтипов с учетом вошедших в подгруппу «Другие саркомы») с разной активностью сигнальных путей в них такие результаты были ожидаемы [28]. Однако в ходе анализа отдельных подтипов СМТ выявлено, что в подгруппах ЛПС, СС, МФС и НПС экспрессия исследуемых генов коррелировала с резистентностью к применяемым препаратам. В основном высокая экспрессия генов ассоциировалась с резистентностью к препаратам. В подгруппах ЛПС, СС и НПС уровни исследуемых белков коррелировали с резистентностью

к препаратам и их комбинациям. Для нас было неожиданным, что высокая экспрессия проапоптотического белка *Bax* коррелировала с резистентностью к Гем и его комбинации с Доц в подгруппе ЛПС. Ранее сообщалось, что высокая экспрессия проапоптотического белка *Bax* может коррелировать с плохим ответом на ХТ и, как следствие, с низкими показателями безрецидивной выживаемости при метастатической меланоме, остром миелоидном лейкозе и лимфоме Ходжкина [29–31]. Стоит отметить, что в меланоме на ранних стадиях заболевания низкая экспрессия *Bax*, наоборот, связана с плохим ответом на ХТ и низкими показателями безрецидивной выживаемости [32]. Вероятнее всего, на ранних стадиях заболевания снижается экспрессия регуляторов апоптоза, в то время как на более поздних стадиях нарушается работа эффекторных белков сигнального каскада апоптоза и изменение экспрессии его регуляторов перестает играть существенную роль.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе исследования рассмотрена возможность применения генов p53-зависимой активации апоптоза в качестве маркеров прогноза ответа СМТ на ХТ. Значительных закономерностей в экспрессии исследуемых генов в общей группе СМТ обнаружено не было. Однако в ходе анализа их экспрессии в отдельных гистологических подгруппах выявлены корреляции с резистентностью к препаратам на уровне как мРНК, так и белка. Предполагается, что увеличение числа образцов в каждой гистологической подгруппе позволит определить панель генов для прогнозирования индивидуального ответа на различные схемы ХТ, а диагностическая ценность этих данных будет оценена при их сопоставлении с клиническими результатами лечения.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петрова. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. Malignant neoplasms in Russia in 2018 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, G.V. Petrov. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2019. (In Russ.).
2. Sbaraglia M., Bellan E., Dei Tos A.P. The 2020 WHO classification of soft tissue tumours: news and perspectives. *Pathologica* 2021;113(2):70–84. DOI: 10.32074/1591-951x-213
3. Judson I., Verweij J., Gelderblom H. et al. Doxorubicin alone *versus* intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15(4):415–23. DOI: 10.1016/s1470-2045(14)70063-4
4. Neophytou C.M., Trougakos I.P., Erin N., Papageorgis P. Apoptosis deregulation and the development of cancer multi-drug resistance. *Cancers* 2021;13(17):4363. DOI: 10.3390/cancers13174363
5. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov* 2022;12(1):31–46. DOI: 10.1158/2159-8290.Cd-21-1059
6. Kirilin E.M., Fetisov T.I., Moiseeva N.I. et al. Soft tissue sarcoma study: association of genetic alterations in the apoptosis pathways with chemoresistance to doxorubicin. *Cancers* 2022;14(7):1796. DOI: 10.3390/cancers14071796
7. Comprehensive and integrated genomic characterization of adult soft tissue sarcomas. *Cell* 2017;171(4):950–65.e928. DOI: 10.1016/j.cell.2017.10.014
8. Peña-Blanco A., García-Sáez A.J. Bax, Bak and beyond – mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J* 2018;285(3):416–31. DOI: 10.1111/febs.14186
9. Weiler E.S., Szabo T.G., Garcia-Carpio I., Villunger A. PIDD1 in cell cycle control, sterile inflammation and cell death. *Biochem Soc Trans* 2022;50(2):813–24. DOI: 10.1042/bst20211186
10. Tan J.H., Cao R.C., Zhou L. et al. ATF6 aggravates acinar cell apoptosis and injury by regulating p53/AIFM2 transcription in Severe Acute Pancreatitis. *Theranostics* 2020;10(18):8298–314. DOI: 10.7150/thno.46934

11. Huang Y., Liu N., Liu J. et al. Mutant p53 drives cancer chemotherapy resistance due to loss of function on activating transcription of PUMA. *Cell Cycle* 2019;18(24):3442–55. DOI: 10.1080/15384101.2019.1688951
12. Shahbandi A., Rao S.G., Anderson A.Y. et al. BH3 mimetics selectively eliminate chemotherapy-induced senescent cells and improve response in TP53 wild-type breast cancer. *Cell Death Differ* 2020;27(11):3097–116. DOI: 10.1038/s41418-020-0564-6
13. Ren X., Liu H., Zhang M. et al. Co-expression of ING4 and P53 enhances hypopharyngeal cancer chemosensitivity to cisplatin *in vivo*. *Mol Med Rep* 2016;14(3):2431–8. DOI: 10.3892/mmr.2016.5552
14. Fairchild C.K., Floros, K.V., Jacob S. et al. Unmasking BCL-2 addiction in synovial sarcoma by overcoming low NOXA. *Cancers* 2021;13(1):2310. DOI: 10.3390/cancers13102310
15. Mathews J.C., Pouryahya M., Moosmüller C. et al. Molecular phenotyping using networks, diffusion, and topology: soft tissue sarcoma. *Sci Rep* 2019;9(1):13982. DOI: 10.1038/s41598-019-50300-2
16. Andreotti P.E., Cree I.A., Kurbacher C.M. et al. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1995;55(22):5276–82.
17. Tapias L.F., Gilpin S.E., Ren X. et al. Assessment of proliferation and cytotoxicity in a biomimetic three-dimensional model of lung cancer. *Ann Thoracic Surg* 2015;100(2):414–21. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2015.04.035
18. Tanaka K., Ozaki T. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for soft tissue sarcomas: JCOG Bone and Soft Tissue Tumor Study Group. *Japanese J Clin Oncol* 2021;51(2):180–4. DOI: 10.1093/jjco/hyaa231
19. Moiseeva N.I., Laletina L.A., Fetisov T.I. et al. Analysis of multiple drug resistance mechanism in different types of soft tissue sarcomas: assessment of the expression of ABC-transporters, MVP, YB-1, and analysis of their correlation with chemosensitivity of cancer cells. *Int J Mol Sci* 2022;3(6):3183. DOI: 10.3390/ijms23063183
20. De Graaff M.A., de Rooij M.A., van den Akker B.E. et al. Inhibition of Bcl-2 family members sensitises soft tissue leiomyosarcomas to chemotherapy. *Br J Cancer* 2016;114(11):1219–26. DOI: 10.1038/bjc.2016.117
21. Win T.T., Yusuf Y., Jaafa H. Apoptotic activities in soft tissue sarcoma: immunohistochemical study and their association with tumour characteristics. *Malaysian J Med Sci* 2013;20(2):10–6.
22. Muenchow A., Weller S., Hinterleitner C. et al. The BCL-2 selective inhibitor ABT-199 sensitizes soft tissue sarcomas to proteasome inhibition by a concerted mechanism requiring BAX and NOXA. *Cell Death Disease* 2020;11(8):701. DOI: 10.1038/s41419-020-02910-2
23. De Sousa Abreu R., Penalva L.O., Marcotte E.M., Vogel C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol biosyst* 2009;5(12):1512–26. DOI: 10.1039/b908315d
24. Vogel C., Marcotte E.M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 2012;13(4):227–32. DOI: 10.1038/nrg3185
25. Nakamura K., Asanuma K., Okamoto T. et al. Combination of everolimus and bortezomib inhibits the growth and metastasis of bone and soft tissue sarcomas via JNK/p38/ERK MAPK and AKT pathways. *Cancers* 2023;15(9): DOI: 10.3390/cancers15092468
26. Mauro A., Ciccarelli C., De Cesaris P.S. et al. PKCalpha-mediated ERK, JNK and p38 activation regulates the myogenic program in human rhabdomyosarcoma cells. *J Cell Sci* 2002;115(Pt. 18): 3587–99. DOI: 10.1242/jcs.00037
27. Ambrose G., Portier A., Roders N. et al. Subcellular localization of PUMA regulates its pro-apoptotic activity in Burkitt's lymphoma B cells. *Oncotarget* 2015;6(35):38181–94. DOI: 10.18632/oncotarget.5901
28. Damerell V., Pepper M.S., Prince S. Molecular mechanisms underpinning sarcomas and implications for current and future therapy. *Signal Transduction targ Ther* 2021;6(1):246. DOI: 10.1038/s41392-021-00647-8
29. Guttà C., Rahman A., Aura C. et al. Low expression of pro-apoptotic proteins Bax, Bak and Smac indicates prolonged progression-free survival in chemotherapy-treated metastatic melanoma. *Cell Death Dis* 2020;11(2):124. DOI: 10.1038/s41419-020-2309-3
30. Köhler T., Schill C., Deininger M.W. et al. High Bax and Bcl-2 mRNA expression correlate with negative outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia* 2002;16(1):22–9. DOI: 10.1038/sj.leu.2402340
31. Bairey O., Zimra Y., Shaklai M. et al. Bcl-2, Bcl-X, Bax, and Bak expression in short- and long-lived patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res* 1999;5(10):2860–6.
32. Fecker L.F., Geilen C.C., Tchernev G. et al. Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis. *J Inv Dermatol* 2006;126(6):1366–71. DOI: 10.1038/sj.jid.5700192

#### Вклад авторов

Т.И. Фетисов: разработка дизайна исследования, проведение экспериментов, анализ данных, написание текста статьи, управление проектом; С.А. Хазанова, П.А. Штомпель, Е.С. Трапезникова: проведение экспериментов, анализ данных, написание текста статьи; В.Ю. Зиновьева, А.А. Тарарыкова, В.И. Маршалл, А.А. Ловенгер, И.С. Купаева, Д.В. Рогожин, А.Ю. Бокхан: получение и характеристика клинических образцов;

Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов: управление проектом, редактирование.

#### Authors' contributions

T.I. Fetisov: research design development, conducting experiments, data analysis, article writing, project management;

S.A. Khazanova, P.A. Shtompel, E.S. Trapeznikova: conducting experiments, analyzing data, article writing;

V.Yu. Zinovyeva, A.A. Tararykova, V.I. Marshall, A.A. Lovinger, I.S. Kupaeva, D.V. Rogozhin, A.Yu. Bokhyan: obtaining and characterization of clinical samples;

G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov: project management, editing.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

Т.И. Фетисов / T.I. Fetisov: <https://orcid.org/0000-0002-5082-9883>  
С.А. Хазанова / S.A. Khazanova: <https://orcid.org/0000-0002-8350-0021>  
П.А. Штомпель / P.A. Shtompel: <https://orcid.org/0009-0000-8673-597X>  
Е.С. Трапезникова / E.S. Trapeznikova: <https://orcid.org/0000-0001-6839-7436>  
А.А. Тарарыкова / A.A. Tararykova: <https://orcid.org/0000-0002-5548-3295>  
В.И. Маршалл / V.I. Marshall: <https://orcid.org/0000-0002-0081-2688>  
А.А. Ловенгер / A.A. Lovenger: <https://orcid.org/0009-0000-3317-9543>  
И.С. Купаева / I.S. Kupaeva: <https://orcid.org/0000-0003-4229-5911>  
Д.В. Рогожин / D.V. Rogozhin: <https://orcid.org/0000-0003-0777-9152>  
А.Ю. Бохян / A.Yu. Bokhyan: <https://orcid.org/0000-0002-1396-3434>  
Г.А. Белицкий / G.A. Belitsky: <https://orcid.org/0000-0002-3167-7204>  
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 interest.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (грант № 22-75-00100).  
**Funding.** Research was supported by the Russian Science Foundation grant (grant No. 22-75-00100).

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики**

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

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики**

The study protocol was approved by the local Ethical committee on animal experimentation of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.