

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАНЦЕРОГЕНЕЗА ФГБУ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА»
МИНЗДРАВА РОССИИ

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Протеогликаны в нормальной
физиологии и канцерогенезе*

*Таргетная жидкостная биопсия
и анализ ДНК*

*Экспрессия мРНК гена BRCA1
в опухолях молочной железы*

*Экзосомальные протеины –
потенциальные маркеры
множественной миеломы*

ТОМ 5 № 1
2018



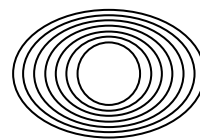
Журнал «Успехи молекулярной онкологии» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, в которых публикуются основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

С 2014 г. журнал включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор.

С 2015 года журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



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

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

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Зборовская Ирина Борисовна, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

1 ТОМ 5
'18

Учредители:

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

Адрес редакции:

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

Принем статей: онлайн на сайте

<http://umo.abvpress.ru/jour>
или по адресу adv.mol.onc@ronc.ru

Выпускающий редактор **Н.В. Жукова**

Корректор **В.Е. Ефремова**

Дизайн **Е.В. Степанова**

Верстка **О.В. Гончарук**

Служба подписки и распространения

И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,

base@abvpress.ru

Руководитель проекта

Р.А. Кузнецов, +7 (499) 929-96-19,

kuznetsov@abvpress.ru

Журнал зарегистрирован

в Федеральной службе по надзору

в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций
(ПИ № ФС77-57560 от 08.04.2014 г.)

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

Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых
рекламных материалов.

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

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

Успехи молекулярной онкологии.
2018. Том 5. № 1. 1–70

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2018

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»

Тираж 1000 экз.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующая отделением научного планирования и подготовки кадров ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

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

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

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

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

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., заместитель начальника Управления по взаимодействию с РАН, ответственный секретарь Научно-координационного совета Федерального агентства научных организаций России (Москва, Россия)

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

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

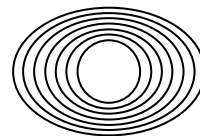
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses).

Since 2014, the journal was included in the Research Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor.

In 2015, the journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

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

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



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

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

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

Zborovskaya Irina B., PhD, Leading Researcher of the Laboratory of Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

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

EXECUTIVE EDITOR

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

FOUNDED IN 2014

1 Vol. 5
'18

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

Editorial Office:
Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Build. 15
Kashirskoe Shosse, Moscow
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19.
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru
Article submission: on-line
at <http://umo.abvpress.ru/jour>
or by e-mail to adv.mol.onc@ronc.ru

Managing editor N.V. Zhukova
Proofreader V.E. Efremova
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk
Subscription & Distribution Service
I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Project Manager R.A. Kuznetsov,
+7 (499) 929-96-19,
kuznetsov@abvpress.ru

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

Technologies, and Mass Media
(III No. ФС77-57560
dated 08 April 2014).

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

The editorial board is not responsible
for advertising content.

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

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

Uspekhi molekulyarnoy
onkologii. 2018. Vol. 5
No. 1. 1—70

© PH "ABV-Press", 2018

Pressa Rossii catalogue
index: 93562

Printed at the Mediacolor LLC

1,000 copies

EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

Gurtsevich Vladimir E., PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Viral Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)

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

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

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

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

Kubasova Irina Yu., PhD, Scientific Secretary of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Head of the Department of Scientific Planning and Training of Personnel of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

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

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

Lichtenstein Anatoly V., PhD, DSc, Leading Researcher of the Department of the Experimental Biology Tumors of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

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

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

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

Stepanova Evgenia V., MD, DSc, Deputy Head of the Department for Interaction with the RAS, Secretary in Charge of the Scientific Coordination Council of the Federal Agency of Scientific Organizations of Russia, (Moscow, Russia)

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

Kopnin Boris P., MD, PhD, DSc, Professor, Chief Research Assistant of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Информация для авторов

При направлении статьи в редакцию журнала «Успехи молекулярной онкологии» авторам необходимо руководствоваться следующими правилами.

1. Общие правила

Статья в обязательном порядке должна сопровождаться официальным разрешением на публикацию, заверенным печатью учреждения, в котором работает первый в списке автор. При первичном направлении рукописи в редакцию в копии электронного письма должны быть указаны все авторы данной статьи. Обратную связь с редакцией будет поддерживать ответственный автор, обозначенный в статье (см. пункт 2).

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- название статьи,
- инициалы и фамилии всех авторов,
- ученые степени, звания, должности, место работы каждого из авторов, а также их ORCID (при наличии),
- полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа,
- адрес учреждения (учреждений) с указанием индекса.

Последняя страница должна содержать:

- Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
 - фамилия, имя, отчество полностью,
 - занимаемая должность,
 - ученая степень, ученое звание,
 - персональный международный идентификатор ORCID (подробнее: <http://orcid.org/>),
 - персональный идентификатор в РИНЦ (подробнее: http://elibrary.ru/projects/science_index/author_tutorial.asp),
 - контактный телефон,
 - рабочий адрес с указанием индекса,
 - адрес электронной почты.
- Скан подписей всех авторов статьи.

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

Шрифт – Times New Roman, кегль 14, межстрочный интервал 1,5. Все страницы должны быть пронумерованы. Текст статьи начинается со второй страницы.

4. Объем статей (без учета иллюстраций и списка литературы)

Оригинальная статья – не более 12 страниц (большой объем допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции).

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

Ко всем видам статей на отдельной странице должно быть приложено резюме на русском и английском (по возможности) языках. Резюме должно кратко повторять структуру статьи, независимо от ее тематики.

Объем резюме – не более 2500 знаков, включая пробелы. Резюме не должно содержать ссылки на источники литературы и иллюстративный материал.

На этой же странице помещаются ключевые слова на русском и английском (по возможности) языках в количестве от 3 до 10.

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

- введение,
- цель,
- материалы и методы,
- результаты,
- обсуждение,
- заключение (выводы),
- вклад всех авторов в работу,
- конфликт интересов для всех авторов (в случае его отсутствия необходимо указать: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»),
- информированное согласие пациентов (для статей с авторскими исследованиями и описаниями клинических случаев),

- при наличии финансирования исследования – указать его источник (грант и т. д.),
- благодарности (раздел не является обязательным).

7. Иллюстративный материал

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Данные таблиц не должны повторять данные рисунков и текста и наоборот.

Фотографии представляются в форматах TIFF, JPG, CMYK с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).

Рисунки, графики, схемы, диаграммы должны быть редактируемыми, выполненными средствами Microsoft Office Excel или Office Word.

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подписными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т. д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подписной подписи. Подписи к рисункам даются на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле.

Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице.

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, полимеразная цепная реакция (ПЦР)).

9. Список литературы

На следующей после текста странице статьи должен располагаться список цитируемой литературы.

Все источники должны быть пронумерованы, нумерация осуществляется строго по порядку цитирования в тексте статьи, не в алфавитном порядке. Все ссылки на источники литературы в тексте статьи обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках начиная с 1 (например, [5]). Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях – не более 20–25, в обзорах литературы – не более 60.

Ссылки должны даваться на первоисточники, цитирование одного автора по работе другого недопустимо.

Включение в список литературы тезисов возможно исключительно при ссылке на иностранные (англоязычные) источники.

Ссылки на диссертации и авторефераты, неопубликованные работы, а также на данные, полученные из неофициальных интернет-источников, не допускаются.

Для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» в английском в тексте). Авторы цитируемых источников должны быть указаны в том же порядке, что и в первоисточнике.

При ссылке на **статьи из журналов** после авторов указывают название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы, PMID и DOI статьи (при наличии). При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания, число страниц.

Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.

Общие положения:

- Рассмотрение статьи на предмет публикации занимает не менее 8 недель.
- Все поступающие статьи рецензируются. Рецензия является анонимной.
- Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.
- Редакция не предоставляет авторские экземпляры журнала. Номер журнала можно получить на общих основаниях (см. информацию на сайте).

Материалы для публикации принимаются по адресу онлайн на сайте <http://umo.abvpress.ru/jour> или по адресу adv.mol.onc@ronc.ru.

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

А.В. Суховских, Э.В. Григорьева

Протеогликаны в нормальной физиологии и канцерогенезе 8

Г.Ф. Михайлова, В.В. Цепенко, Т.Г. Шкаврова, Е.В. Голуб

Асинхронная репликация у онкологических больных. 26

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

*И.В. Ботезату, И.О. Панчук, А.А. Коломейцева, А.А. Феденко, Н.Н. Мазуренко, И.В. Цыганова,
О.Ю. Сусова, В.Н. Кондратова, В.П. Шелепов, А.В. Лихтенштейн*

**Таргетная жидкостная биопсия посредством «обогащенной» полимеразной
цепной реакции и анализа плавления ДНК 35**

*Н.Б. Сенюта, М.Н. Болдырева, Е.В. Гончарова, Д.М. Максимович,
Л.Н. Щербак, Т.Е. Душенькина, В.Э. Гурцевич*

**Распределение генов HLA II у больных раком носоглотки, ассоциированным
с вирусом Эпштейна–Барр, и другими опухолями ротовой полости в России. 43**

*М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова, И.В. Дерюшева, П.В. Казанцева, Е.Ю. Гарбуков,
Е.М. Слонимская, Н.В. Литвяков*

**Экспрессия мРНК гена *BRCA1* в опухолях молочной железы как предиктор ответа
на неоадъювантную химиотерапию 53**

*В.Е. Шевченко, А.С. Брюховецкий, М.В. Филатов, В.С. Бурдаков, З.Н. Никифорова,
И.С. Брюховецкий, Ю.Д. Василец, Т.И. Кушнир, Н.Е. Арноцкая*

**Экзосомальные протеины – потенциальные маркеры
для диагностики множественной миеломы 60**

REVIEWS

A.V. Suhovskih, E.V. Grigorieva

Proteoglycans in normal physiology and carcinogenesis 8

G.F. Mikhailova, V.V. Tsepenco, T.G. Shkavrova, E.V. Goloub

Asynchronous replication in oncological patients 26

EXPERIMENTAL RESEARCH

I.V. Botezatu, I.O. Panchuk, A.A. Kolomeytseva, A.A. Fedenko, N.N. Mazurenko,

I.V. Tsyganova, O.Ju. Susova, V.N. Kondratova, V.P. Shelepov, A.V. Lichtenstein

Target “liquid biopsy” using “enriched” polymerase chain reaction and DNA melting analysis 35

N.B. Senyuta, M.N. Boldyreva, E.V. Goncharova, D.M. Maximovich,

L.N. Shcherbak, T.E. Dushenkina, V.E. Gurtsevitch

HLA II genes distribution in Epstein Barr viruses-associated nasopharyngeal carcinoma and other tumors of the oral cavity patients in Russia 43

M.M. Tsyganov, M.K. Ibragimova, I.V. Deryusheva, P.V. Kazantseva,

E.Yu. Garbukov, E.M. Slonimskaya, N.V. Litviakov

BRCA1 mRNA expression levels as an predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer 53

V.E. Shevchenko, A.S. Bryukhovetskiy, M.V. Filatov, V.S. Burdakov,

Z.N. Nikiforova, I.S. Bryukhovetskiy, Yu.D. Vasilets, T.I. Kushnir, N.E. Arnotskaya

Exosomal proteins as potential markers of multiple myeloma diagnostics 60

Протеогликаны в нормальной физиологии и канцерогенезе

А.В. Суховских, Э.В. Григорьева

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики»;

Россия, 630117 Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12;

ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»;

Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Контакты: Анастасия Владимировна Суховских anastasia-suhovskih@mail.ru

Появление и развитие злокачественных опухолей связано с многочисленными нарушениями физиологии клетки как на геномном, так и на белковом уровнях и затрагивает множество макромолекул, вовлеченных в различные аспекты ее жизнедеятельности. Однако рост злокачественной опухоли и ее метастазирование определяются не только молекулярными характеристиками самой опухолевой клетки, но и ее взаимодействием с окружающим внеклеточным матриксом (ВКМ) — важной и необходимой частью любой ткани. Огромную роль при этом играют сложные белково-углеводные молекулы протеогликанов (ПГ), которые являются одним из основных компонентов ВКМ и присутствуют на поверхности практически всех клеток, во многом определяя межклеточные взаимодействия и взаимодействия клеток с ВКМ. В процессе канцерогенеза происходят значительные нарушения структуры и состава ПГ, которые приводят к нарушению таких взаимодействий и инициируют трансформацию нормального ВКМ в опухолевое микроокружение, максимально адаптированное для поддержания роста опухолевых клеток, развития злокачественной опухоли и распространения патологического процесса путем метастазирования. В настоящее время множество ключевых ПГ идентифицированы как перспективные диагностические и прогностические молекулярные маркеры и целевые молекулы для создания новых противоопухолевых препаратов.

В обзоре рассматриваются основные классы ПГ, их структура, локализация, функциональная роль в нормальных тканях и участие в молекулярных механизмах злокачественной трансформации клеток и прогрессирования опухоли.

Ключевые слова: протеогликан, гликозаминогликан, гепарансульфат, хондроитинсульфат, внеклеточный матрикс, межклеточные взаимодействия, канцерогенез, опухолевое микроокружение, метастазирование

Для цитирования: Суховских А.В., Григорьева Э.В. Протеогликаны в нормальной физиологии и канцерогенезе. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(1):8–25.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-1-8-25

Proteoglycans in normal physiology and carcinogenesis

A. V. Suhovskih, E. V. Grigorieva

Research Institute of Molecular Biology and Biophysics; 2/12 Timakova St., Novosibirsk 630117, Russia;

Novosibirsk State University; 2 Pirogova St., Novosibirsk 630090, Russia

Malignant transformation of any cell is associated with numerous physiological and morphological disorders at both genomic and protein levels, a variety of macromolecules being involved in. However, the tumour development and metastasis depends on not only the molecular characteristics of the tumour cell but also its interaction with the surrounding extracellular matrix (ECM), which is an important and necessary part of any tissue. An important role in this process belongs to the complex protein-carbohydrate molecules — proteoglycans (PG), which are one of the main component of ECM and cell surface of any tissue and are tightly involved in cell-cell and cell-matrix interactions and signaling. During carcinogenesis, significant changes in the PG structure and composition occur both at the surface of tumour cells and surrounding ECM, resulting in the transformation of normal ECM into a tumour microenvironment and deterioration of cell-cell and cell-matrix communication. Further, the tumorigenic niche contributes to active proliferation of the cancer cells, tumour development and metastasis. At present, many key PG are identified as possible diagnostic and prognostic molecular markers and target molecules for the creation of new antitumor drugs.

The review describes the main PG types, their structure, localisation, functional role in normal cell and tissue physiology and participation in molecular mechanisms of carcinogenesis.

Key words: proteoglycan, glycosaminoglycan, heparansulfate, chondroitinsulfate, extracellular matrix, cell-cell and cell-matrix interactions, carcinogenesis, tumour microenvironment, metastasis

For citation: Suhovskih A.V., Grigorieva E.V. Proteoglycans in normal physiology and carcinogenesis. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2018;5(1):8–25.

Введение

В настоящее время, несмотря на интенсивные исследования, причины возникновения злокачественных опухолей и молекулярные механизмы канцерогенеза остаются недостаточно изученными. Известно, что этот процесс связан с функционированием множества сигнальных путей с участием различных молекул, состав, структура и экспрессия которых в процессе злокачественной трансформации клеток и тканей подвергаются значительным изменениям, что во многом определяет инициацию и развитие патологического процесса. Наряду с активно изучаемыми макромолекулами нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов и липидов, значительную роль в физиологии клеток и тканей и их злокачественной трансформации играют также белково-углеводные молекулы, называемые протеогликами (ПГ).

Протеоглики, гликозаминогликаны, их структура и классификация

ПГ являются сложными белково-углеводными молекулами, состоящими из корового белка и ковалентно присоединенных к нему углеводных цепей гликозаминогликанов (ГАГ) [1]. Они представляют собой отдельный класс биологических макромолекул, принципиально отличающихся от гликопротеинов именно структурой их углеводных цепей (рис. 1).

Полисахаридные цепи ГАГ являются линейными полимерами, состоящими из повторяющихся дисахаридных субъединиц, каждая из которых включает гексозамин (D-глюкозамин или D-галактозамин) и уроную кислоту (D-глюкуроновую или L-идуруновую). Каждый дисахарид может подвергаться избирательной модификации по различным положениям (сульфатирование по 2-, 3- и 6-О-положениям и ацетилирование/сульфатирование по N-положению), что приводит

к высокому анионному заряду самих дисахаридов и образованной из них углеводной цепи ГАГ и молекулы ПГ в целом (рис. 2).

Степень сульфатирования молекулы ГАГ может варьировать в широких пределах (0–4 SO_4^{2-} групп/дисахарид) и определяет способность ГАГ/ПГ взаимодействовать с широким кругом различных биологически активных лигандов (в отличие от нейтральных молекул гликопротеинов) [2].

D-глюкозамин, D-галактозамин, D-глюкуроновая и L-идуруновая кислоты, галактоза являются исходными биосинтетическими блоками для построения всех молекул ГАГ, и в зависимости от строения дисахарида, входящего в состав углеводной цепи, ГАГ делят на следующие классы: гепарин/гепарансульфаты (ГС), хондроитинсульфаты (ХС), дерматансульфаты (ДС), кератансульфаты и гиалуриновая кислота (рис. 3).

Структура и классификация ПГ исчерпывающе описаны в обзорах [3, 4].

Строение гепарансульфатов

ГС является одним из основных классов ГАГ. Его углеводные цепи состоят из N-ацетилированного или N-сульфатированного D-глюкозамина (GlcNAc), который связан с D-глюкуроновой (GlcA) или L-идуруновой кислотой (IdoUA) [5]. Особой разновидностью ГС является гепарин, характеризующийся высокой степенью сульфатирования идуруновой кислоты (по 2 углероду (IdoA2S)) и N-сульфатированного глюкозамина (по 6 положению (GlcNS6S)). Степень сульфатирования гепарина намного выше, чем ГС, что делает гепарин самой заряженной из всех известных биомолекул, которая является широко используемым фармацевтическим антикоагулянтом.

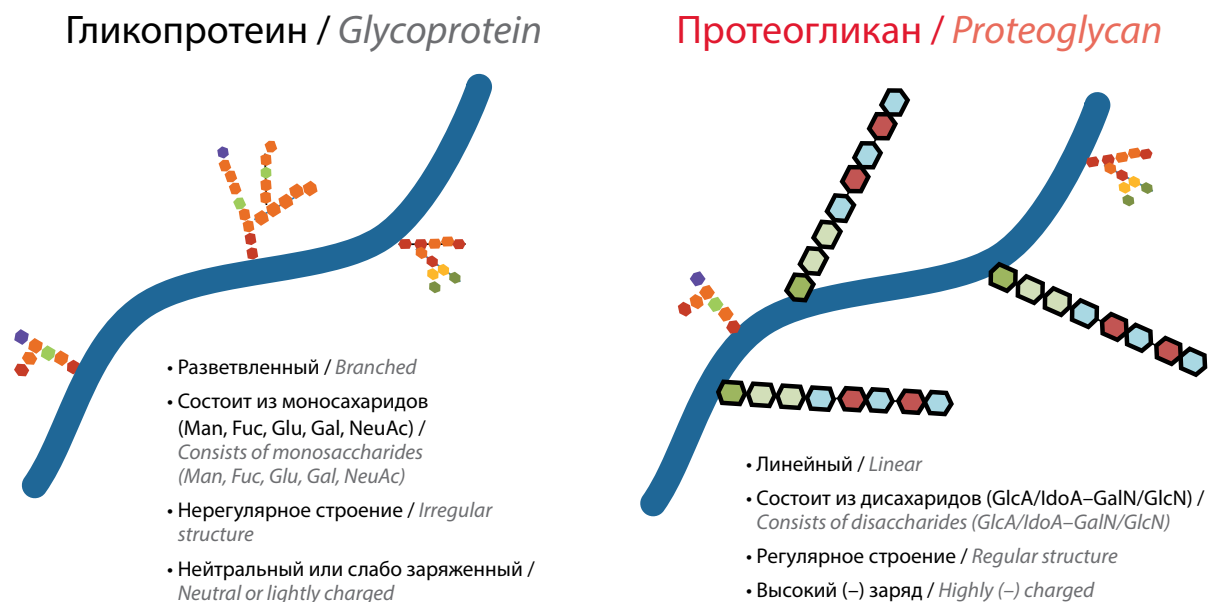
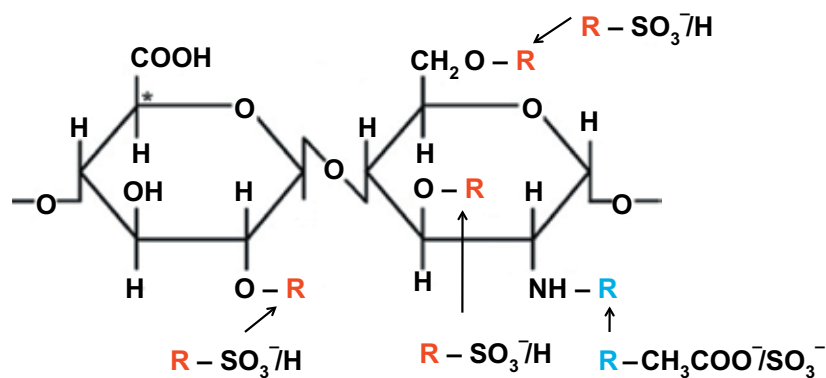


Рис. 1. Схематичное изображение молекул гликопротеина и протеогликана
Fig. 1. Diagram of glycoprotein and proteoglycan molecules



Уроновая кислота / *Uronic acid* Гексозамин / *Hexosamine*

Рис. 2. Схема возможных модификаций дисахарида. R – гидроксильная (H), сульфатная (SO_3^-) или ацетильная (CH_3COO^-) группа
Fig. 2. Diagram of possible disaccharide modifications. R – a hydroxyl (H), sulfate (SO_3^-), or acetyl (CH_3COO^-) group

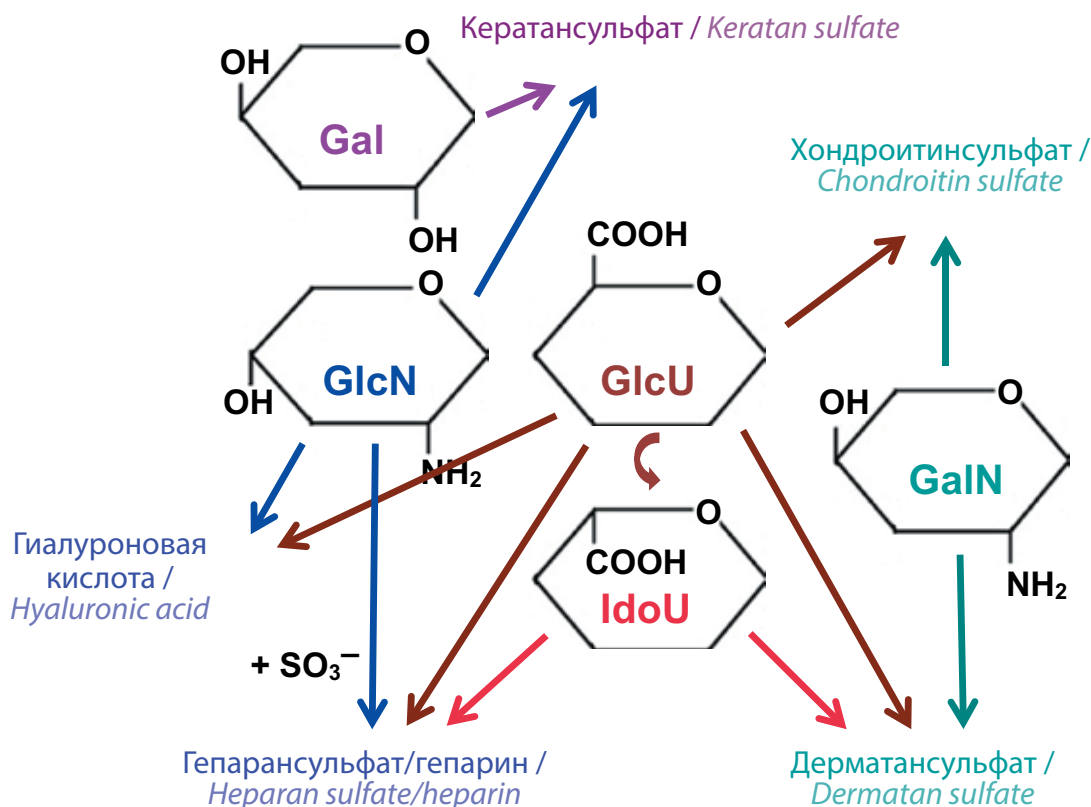


Рис. 3. Структура дисахаридов, образующих углеводные цепи гликозаминогликанов различных классов. Дисахариды могут быть O- и N-сульфатированы по разным положениям. Gal – галактоза; GalN – галактозамин; GlcN – глюкозамин; GlcU – глюкуроновая кислота; IdoU – идуроновая кислота
Fig. 3. Structure of disaccharides forming sugar chains of different classes of glycosaminoglycans. Disaccharides can be O- and N-sulfated in different positions. Gal – galactose; GalN – galactosamine; GlcN – glucosamine; GlcU – glucuronic acid; IdoU – iduronic acid

Строение хондроитинсульфатов и дерматансульфатов

ХС содержат чередующиеся остатки глюкуроновой кислоты (GlcUA) и N-ацетилгалактозамина (GalNAc). Они значительно различаются по длине цепи и молекулярному весу: их вес колеблется в диапазоне от 5 до 70 кДа, даже при выделении из одного источника [6]. Подобно ГС, ХС могут быть N- и/или O-сульфатированы или ацетилированы по 2, 3, 4-му и/или 6-му

положению и являются высокоанионными молекулами с гетерогенной структурой, а паттерн их сульфатирования напрямую влияет на их биологические функции.

ДС по своему составу совершенно идентичен молекуле ХС, однако содержит стереоизомер глюкуроновой кислоты (D-GlcUA) – идуроновою кислоту (L-IdoUA). Именно присутствие L-IdoUA-стереоизомера позволяет называть такую молекулу ДС, а не ХС. Глюкуроновая (GlcA) или идуроновая (IdoA) кислота

в составе ДС может быть частично сульфатирована по С2-положению, а N-ацетилгалактозамин (GalNAc) — по С4- или С6-положению [7].

Строение кератансульфатов

Основной дисахарид кератансульфатов состоит из N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и галактозы, которые оба могут быть сульфатированы по С6-положению. Поэтому кератансульфат является единственным типом ГАГ, у которого отсутствует карбоксильная группа [8]. Молекулярный вес кератансульфата составляет от 5 до 25 кДа и сильно зависит от происхождения ткани. Самая высокая концентрация кератансульфата обнаружена в роговице. Кератансульфат является структурным компонентом нескольких ПГ — агрекана, содержащегося в хрящах, и малых лейцин-богатых ПГ (люмикана, кератокана, фибромодулина). Помимо внеклеточного матрикса (ВКМ), кератансульфаты также обнаруживаются внутриклеточно в эозинофильных специфических гранулах и как часть клеточных трансмембранных белков, таких как CD44 и MUC1 [9].

Именно структура дисахаридов определяет тип углеводной цепи ГАГ, который, в свою очередь, отражается и в названии сложной белково-углеводной молекулы ПГ. Необходимо отметить, что на одном и том же коровом белке могут присутствовать одновременно различные цепи ГАГ, в таком случае название сложной молекулы ПГ определяется доминирующими цепями ГАГ, присутствующими на ее белковой коре.

Локализация и функции протеогликанов в нормальных тканях

ПГ присутствуют практически во всех тканях всех живых организмов, начиная с трилобитов и заканчивая млекопитающими [10]. Основное место их локализации — поверхность клеток и ВКМ. Именно их локализация и определяет основную функциональную роль ПГ в тканях млекопитающих — поддержание контактов клетки с окружающими ее клетками ВКМ [4]. Важность этой функции невозможно переоценить, ведь без поддержания тесных функциональных взаимосвязей невозможно существование любой ткани организма и его самого как целого.

ПГ принимают также активное участие в процессах дифференцировки и развития организма [11]. Их углеводные цепи могут специфически взаимодействовать с факторами роста, такими как факторы роста фибробластов FGF-1, FGF-2 и трансформирующие факторы роста (TGF), которые обладают гепаринсвязывающим доменом и активно вовлечены в процессы воспаления, заживления ран и развития опухолей [9].

Интересно, что существует преимущественная локализация различных классов ПГ в структуре ткани — если гепарансульфат протеогликанов (ГСПГ) локализованы в основном на поверхности клеток и в составе базальной мембраны, то хондроитинсульфат/дерматансульфат-протеогликанов (ХСПГ/ДСПГ) в значительной степени сосредоточены во ВКМ (рис. 4).

Протеогликаны клеточной поверхности

На клеточной поверхности расположены в основном ГСПГ и представлены также некоторые ХСПГ (NG2/CSPG4, CD44) (см. рис. 4).

Синдеканы (syndecan, SDC) — трансмембранные ГСПГ (*SDC1–SDC4*), играющие роль в развитии, канцерогенезе, воспалении и регенерации тканей. Термин «синдекан» был введен М. Bernfield, чтобы обозначить класс ПГ, связывающих поверхность клетки с окружающим их ВКМ [12]. Коровые белки семейства синдеканов имеют внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домены. Внеклеточный домен содержит сайты связывания цепей ГС и ХС, что говорит о гибридной природе синдеканов [13]. С-конец коровых белков всех синдеканов содержит уникальную последовательность (EFYA), которая связывает PDZ-содержащие белки, поддерживающие прочную связь трансмембранных белков с цитоскелетом, придавая прочность таким комплексам. Взаимодействие между синдеканами и актиновым цитоскелетом регулирует клеточную адгезию и миграцию.

Синдеканы выполняют множество биологических функций — связывают различные факторы роста (особенно за счет цепей ГС), создавая их градиенты во время развития; взаимодействуют с разнообразным набором лигандов, включая гликопротеины ВКМ, морфогены, цитокины, рецепторы факторов роста и интегрины [14]. Совместно с другими поверхностными ГСПГ синдеканы могут быть вовлечены в поглощение экзосом, принимают участие в регуляции концентрации внутриклеточного кальция и поддержании гомеостаза [15]. Интересно, что функция ПГ клеточной поверхности может быть изменена путем потери внеклеточного домена, что превращает связанные с мембраной рецепторы в молекулы, участвующие в паракринной регуляции [16].

Глипикианы (glypican, GPC) — ГСПГ, которые связаны с плазматической мембраной с помощью С-терминальной липидной части, представленной гликозилфосфатидилинозитолом (GPI, ГФИ-якорь) [17]. Отличие глипикианов от синдеканов состоит в том, что прикрепление углеводных цепей ГАГ (преимущественно ГС) происходит около трансмембранного домена. Данная особенность расположения углеводных цепей позволяет им охватывать большую поверхность плазматической мембраны, тем самым презентирова различные цитокины и факторы роста для их рецепторов. На сегодняшний день у млекопитающих обнаружено 6 членов семейства глипикианов (*GPC1–GPC6*), и роль этих ПГ в канцерогенезе различна. Глипикианы являются участниками нескольких сигнальных путей, включая Hedgehog (Hh) и FGF-2, а GPC3 связывается с белками Frizzled (тем самым активируя передачу сигналов через сигнальный путь Wnt) и участвует в передаче сигналов в тканях в качестве регулятора роста [18].

Нервный глиальный антиген 2 (*NG2/CSPG4*) — трансмембранный ПГ, несущий цепи ХС и имеющий

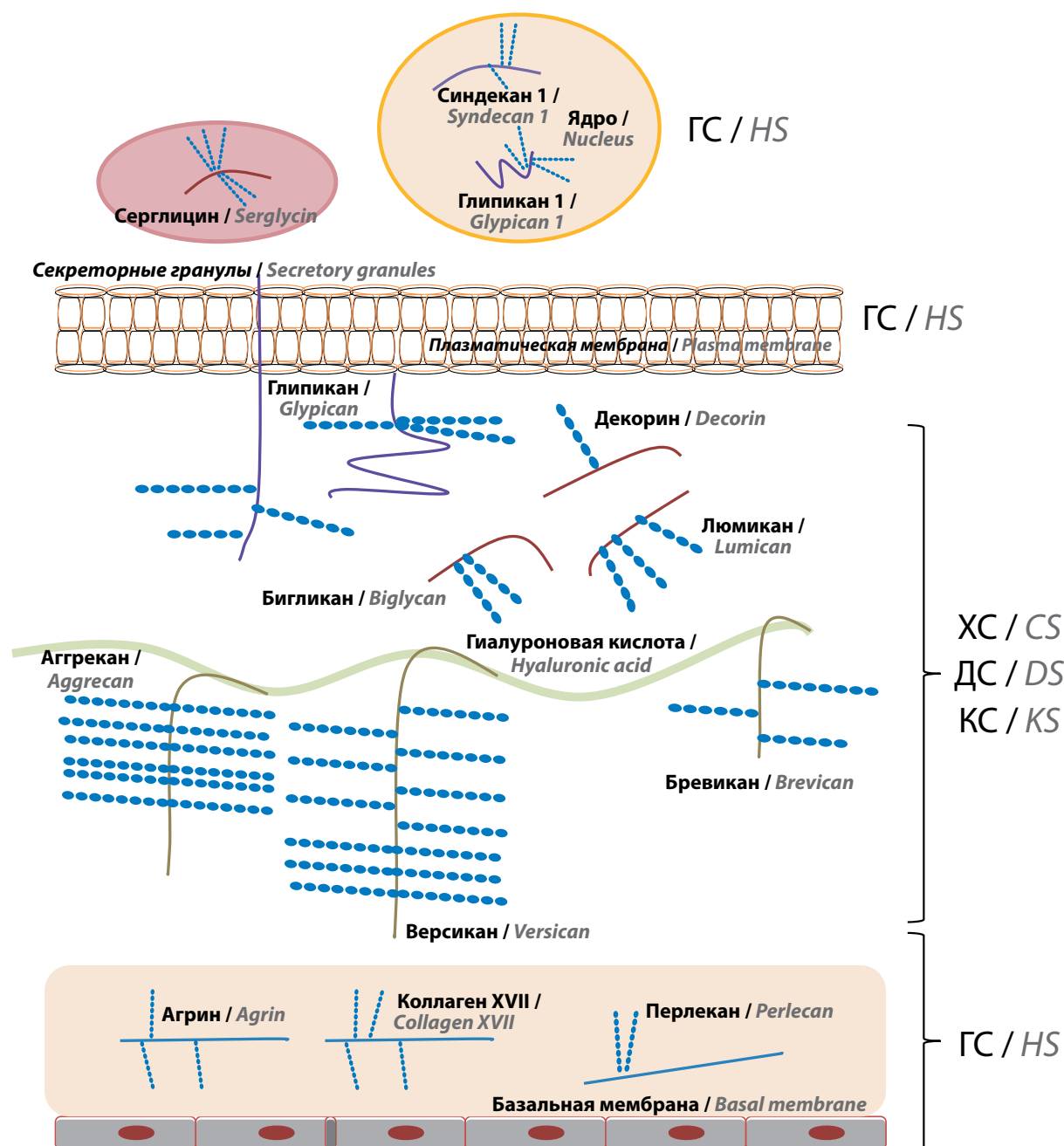


Рис. 4. Локализация протеогликанов в структуре тканей. ГС – гепарансульфат; ХС – хондроитинсульфат; ДС – дерматансульфат; КС – кератансульфат

Fig. 4. Localization of proteoglycans in tissue structure. HS – heparan sulfate; CS – chondroitin sulfate; DS – dermatan sulfate; KS – keratan sulfate

крупный внеклеточный домен, содержащий 3 субдомена, среди которых N-терминальный домен содержит 2 ламининподобных повтора [19]. По-видимому, ламининподобные домены опосредуют связывание лигандов, межклеточные взаимодействия и взаимодействия клеток с окружающим ВКМ, а также взаимодействие с интегринами и рецепторами тирозинкиназ. Центральный субдомен содержит 15 tandemных повторов, называемых ХСПГ, с которыми связываются углеводные цепи ХС. Последние, в свою очередь, связывают коллаген V и VI типов, FGF и тромбоцитарный фактор роста

(PDGF), что опосредует взаимодействия данного ПГ с ВКМ.

NG2 экспрессируется многими клетками центральной нервной системы во время развития и дифференцировки и играет критическую роль в пролиферации и ангиогенезе [20]. В нормальной центральной нервной системе млекопитающих NG2 экспрессируется клетками-предшественниками олигодендроцитов, где он принимает активное участие во внутриклеточном сигналинге, взаимодействуя с цитоскелетом и влияя на миграцию клеток [21].

CD44. Рецептор клеточной поверхности CD44 широко известен как рецептор гиалуроновой кислоты и молекулярный маркер различных типов стволовых клеток [22]. Он является факультативным ХСПГ и может существовать как в виде белковой молекулы, так и ХСПГ, несущего углеводную цепь ХС [23]. В настоящий момент остается неясным, что именно определяет наличие либо отсутствие полисахаридной цепи ГАГ на коровом белке CD44 и ее взаимосвязь с функциональными свойствами интактной молекулы CD44.

Протеогликаны внеклеточного матрикса

ПГ и гиалуроновая кислота (наряду с коллагенами, фибронектином и эластином) составляют основу ВКМ, определяя как его структурные особенности, так и способность к взаимодействию с многочисленными лигандами и поддержанию целостности ткани. Основные ПГ ВКМ относятся преимущественно к классам ХСПГ и ДСПГ и в меньшей степени к кератансульфат-протеогликанам.

Галектаны (лектиканы) представляют собой отдельное семейство ХСПГ со структурным сходством как на геномном, так и на белковом уровне. ПГ этого семейства являются основными структурными элементами ВКМ, взаимодействуют с другими важными молекулами ВКМ, включая гиалуроновую кислоту и поверхностный клеточный рецептор CD44.

Это семейство включает в себя 4 разных гена, кодирующих версикан, агрекан, бревикан и нейрокан. Общая особенность этих ПГ — их трехдоменная структура: N-концевой домен, который связывает гиалуроновую кислоту, центральный домен, несущий боковые цепи ГАГ, и С-концевая область, которая связывает лектины. На основании существования этой двойной активности на N- и С-концах молекулы был предложен термин «галектан», акроним для гиалурон- и лектин-связывающих ПГ [1]. Функционирование галектанов регулируется путем протеолитического расщепления металлопротеиназами семейства ADAMTS (дезинтегрин и металлопротеиназа с фрагментом тромбоспондина) [24, 25].

Версикан (versican, *VCAN*) является ПГ ВКМ, который взаимодействует с клетками путем связывания с неинтегриновыми и интегриновыми рецепторами и с другими компонентами ВКМ, ассоциированными с поверхностью клетки. Он может существовать как в белковой форме, так и в форме ПГ (цепи ХС/ДС) [26].

Функциональные роли версикана многочисленны и сложны. Версикан участвует в регуляции клеточной адгезии, миграции и воспаления через взаимодействие его углеводных цепей ХС/ДС с цитокинами и факторами роста. Во время воспалительного ответа лейкоциты должны мигрировать из внутренних кровеносных сосудов в поврежденные окружающие ткани, при этом они сталкиваются с матриксом, сильно обогащенным версиканом, который, в свою очередь, способен взаимодействовать со многими рецепторами на по-

верхности иммунных клеток, включая CD44, Р-селектин-гликопротеин-1 и Toll-подобные рецепторы [27]. В совокупности эти исследования показывают, что версикан играет центральную роль в воспалении и в результате может рассматриваться как потенциальная терапевтическая мишень.

Агрекан (aggrecan, *ACAN*) имеет склонность к агрегации в большие супрамолекулярные комплексы вместе с гиалуроновой кислотой и связывающими белками и является основным ПГ хрящевой ткани [28]. Эти крупные агрегаты образуют плотно упакованный гидратированный гель, объединенный в сеть армирующих коллагеновых фибрилл и других ПГ и гликопротеинов, который принципиально важен для осуществления функций суставов и играет ключевую роль в хрящевом и костном морфогенезе, функционируя как амортизатор, сопротивляясь сжимающим силам через поглощение воды или влияя на эластичность ткани [29].

Бревикан (brevican, *BCAN*) — один из самых важных ХСПГ центральной нервной системы. Он может существовать как полноразмерный ХСПГ или как частично расщепленный продукт без участка связывания ГАГ и N-терминального домена. Бревикан вовлечен в множество физиологических и патофизиологических процессов пластичности в мозге [30]. Он локализован на поверхности нейронов, способствует образованию специфических типов ВКМ, таких как перинейрональные сети зрелой нервной ткани, и взаимодействует с теназином-R и фибулином-2. Показано, что бревикан вовлечен в развитие опухолей мозга, болезни Альцгеймера, повреждение и восстановление нервной ткани.

Малые лейцин-богатые ПГ. Малыми лейцин-богатыми ПГ (SLRP) обозначают класс ПГ, характеризующихся относительно небольшим белковым кором размером 36–42 кДа (по сравнению с более крупными агрегирующими ПГ), центральная область которого состоит из богатых лейцином повторов (LRR) [4]. Это самое большое семейство ПГ, охватывающее 18 различных генов и многочисленные варианты сплайсированных форм. Малые лейцин-богатые ПГ являются биологически активными компонентами ВКМ, связанными с фибрилlogenезом, клеточным ростом, апоптозом и ремоделированием тканей; поддерживают выживаемость клеток-предшественников межпозвоночных дисков в гипоксических условиях посредством активации специфических факторов, индуцируемых гипоксией [31]. Люмикан, кератокан, декорин, бигликан и остеоглицин присутствуют также в строге роговицы взрослых, а фибромодулин — в периферической лимбальной области, эпителий которой является источником стволовых клеток для роговицы. Декорин, бигликан, люмикан, фибромодулин были обнаружены в атеросклеротических бляшках, а также продемонстрировали свою роль в моделях атеросклероза на животных.

Функционирование SLRP также регулируется путем протеолитического расщепления металлопротеиназами [32].

Гиалуроновая кислота является неотъемлемым компонентом ВКМ любой ткани и играет важнейшую роль в ее организации и функциональной активности. В последнее время накапливается все больше данных о том, что гиалуроновая кислота — активный компонент ВКМ, напрямую влияющий на функциональные характеристики других макромолекул и передачу сигнальной информации [33].

Протеогликаны базальной мембраны

Основными ПГ базальной мембраны являются перлекан, агрин и коллаген 18 (collagen XVIII). Все они относятся к классу ГСПГ и играют важную роль в структуре и функциональной активности базальной мембраны [34, 35].

Перлекан (ГСПГ 2) (perlecan/*HSPG2*) является основным компонентом базальных мембран, наряду с ламинином, коллагеном 4 и нидогеном/энтактином [36]. Он экспрессируется в широком спектре тканей, где регулирует разнообразные клеточные процессы, включая формирование костей, воспаление и ангиогенез, в первую очередь благодаря его способности взаимодействовать с различными лигандами и рецепторами тирозинкиназ.

Перлекан экспрессируется как в сосудистых, так и не в сосудистых тканях и преимущественно расположен на апикальной поверхности клетки и базальных мембранах [37]. В нативном состоянии он обладает проангиогенными свойствами, однако при частичном воздействии протеаз, высвобождаемых при ремоделировании и инвазии при развитии опухоли, С-концевой фрагмент перлекана — эндорепеллин — имеет противоположные эффекты, в отличие от исходной молекулы. Эндорепеллин является мощным ингибитором ангиогенеза, взаимодействуя одновременно с рецептором с тирозинкиназной активностью, активируемым сигнальным белком VEGF (VEGFR2), и интегрином $\alpha 2 \beta 1$ [4].

Углеводные ГС-цепи перлекана могут быть расщеплены гепараназой с высвобождением различных проангиогенных факторов.

Агрин. Структура ГСПГ агрина (agrin, *AGRN*) гомологична структуре перлекана и содержит множество различных доменов. Агрин экспрессируется на высоком уровне в легких, почках и головном мозге, в то время как в скелетных мышцах и нормальной печени было обнаружено лишь небольшое количество агрина. К функциям агрина относится связывание различных факторов роста и цитокинов во внеклеточной среде [35].

Коллаген 18 (collagen XVIII, *COL18A1*) является ГСПГ и представляет собой гомотример, состоящий из 3 идентичных цепей $\alpha 1$ и 10 прерывающихся коллагеновых доменов, фланкированных 11 неколлагеновыми доменами на соответствующих N- и С-концах. Коллагеновые и неколлагеновые домены, по-видимому, различаются по своим функциям [38]. Коллаген 18 экспрессируется повсеместно в различных сосудистых

и эпителиальных структурах базальной мембраны по всему организму.

Функциональная роль протеогликанов при канцерогенезе

Злокачественная трансформация клеток практически всегда ассоциирована со значительными изменениями структуры, состава, локализации и функциональных характеристик ПГ, являющихся неотъемлемой частью как самих клеток, так и их микроокружения [39, 40].

Известно, что внеклеточные малые лейцин-богатые ПГ **бигликан** и **декорин** играют важную роль в процессах воспаления и аутофагии [41]. Декорин является провоспалительным агентом, регулирует активность макрофагов и секрецию цитокинов, супрессирует рост опухолей, ангиогенез и препятствует возникновению очагов метастазирования в различных моделях *in vivo* и *in vitro* [42]. Системная доставка белка декорина или локальная доставка аденовирусных векторов, экспрессирующих декорин, может ингибировать рост опухоли, влиять на рост метастазов опухоли в кости, ингибировать остеокластогенез и способствовать остеобластогенезу [43, 44].

Повышенная экспрессия **версикана** наблюдается в широком спектре злокачественных опухолей и ассоциирована как с рецидивированием, так и с плохими результатами лечения многих видов рака, в частности у пациентов с раком предстательной железы (РПЖ). Через отрицательно заряженные боковые цепи ХС и ДС версикан способен регулировать многие клеточные процессы, включая клеточную адгезию, пролиферацию, апоптоз, миграцию, ангиогенез, инвазию и метастазирование [45].

NG2/CSPG4 является прогностическим фактором и инструментом неинвазивной молекулярной диагностики благодаря тесной ассоциации со злокачественными новообразованиями, а также может быть терапевтической мишенью в некоторых типах опухолей [19].

Состав и структура ГСПГ подвергаются значительным изменениям в опухолях яичников и молочной железы человека [46, 47]; экспрессия синдекана 1, декорина и люмикана значительно изменяется в опухолях молочной железы [48], глипиканы вовлечены в процесс канцерогенеза в тканях легкого [49] и поджелудочной железы [50]; синдеканы участвуют в патогенезе лимфомы Ходжкина [51]; экспрессия перлекана и серглицина значительно снижается в клетках лимфомы Беркитта [52]; уровень экспрессии коллагена 18 ассоциируется с прогрессированием и прогнозом гепатоцеллюлярной карциномы [53], а в опухолях прямой кишки происходит одновременное снижение уровней экспрессии декорина и перлекана (в 2 раза) и повышение экспрессии бигликана и версикана (в 6 и 3 раза соответственно) [54]. ПГ глипиканы, агрин, версикан и декорин принимают активное участие в развитии злокачественных

опухолей печени и прогрессии экспериментальных опухолей в системе *in vitro* [55].

Помимо количественных изменений в уровнях экспрессии различных ПГ, в процессе злокачественной трансформации происходят также качественные изменения, связанные с нарушением внутриклеточной и внутритканевой локализации ПГ [54]. Экспрессия люмикана повышается в строме, окружающей опухоли молочной железы человека, по сравнению с нормальной стромой, тогда как в аналогичных фибробластоподобных клетках стромы внутри или непосредственно рядом с опухолями молочной железы человека происходит снижение содержания декорина [56]. Экспрессия бигликана увеличена в строме опухолей поджелудочной железы по сравнению с нормальной панкреатической тканью и, как показано, ингибирует рост опухолевых клеток [57].

Необходимо отметить, что важной особенностью экспрессии и паттерна ПГ в нормальных клетках и тканях млекопитающих является их тканеспецифичность, впервые обнаруженная более 30 лет назад [58], хотя этот вопрос до сих пор остается малоизученным. Лишь в последнее время стали появляться данные, которые не только подтвердили эти результаты, но и показали тканеспецифичный характер изменений паттерна и уровней экспрессии основных ПГ при злокачественной трансформации клеток и тканей как на уровне их коровых белков [59], так и углеводных цепей, присутствующих на этих коровых белках [60]. В совокупности это приведет к появлению данных о специфическом составе и локализации различных ПГ, характерных для каждой ткани и классифицирующих определенный тип опухоли.

В силу вышесказанного, при изучении ПГ и их вовлеченности в процессы канцерогенеза представляется целесообразным проведение сравнительных исследований, связанных с развитием и прогрессией злокачественных опухолей различных типов. В следующих разделах мы приведем данные об участии ПГ в развитии тех типов опухолей, которые наиболее интенсивно изучаются и в нашей лаборатории [61–64].

Протеогликаны в глиальных опухолях головного мозга

Структурная и функциональная роль ПГ в возникновении и развитии злокачественных опухолей головного мозга подробно обсуждается в обзорах [65, 66]. Наиболее значимую роль при раке этого типа (глиальные опухоли) играют ХСПГ/ДСПГ и кератансульфат-протеогликаны.

При анализе экспрессии различных индивидуальных ПГ прослеживается определенная тенденция — экспрессия большинства ПГ активируется в тканях глиом высокой степени злокачественности и коррелирует с плохим прогнозом течения заболевания, и только декорин является единственным ПГ, проявляющим антипролиферативное и антиопухолевое действие.

Показано, что избыточная экспрессия декорина подавляет рост клеток глиомы, а лечение экзогенным декорином ингибирует адгезию и миграцию клеток глиомы U87MG, снижая передачу сигналов через TGF- β [67]. Эктопическая экспрессия декорина приводит к замедлению прогрессирования глиомы *in vivo* [68].

Повышенная экспрессия изоформ версикана во ВКМ играет роль в прогрессировании злокачественных глиом, способствуя адгезии и миграции опухолевых клеток, и этот эффект, по крайней мере частично, опосредуется участием версиканов V0/V1 [69]. Подавление экспрессии версикана V1 с помощью малых интерферирующих РНК приводит к значительному снижению пролиферации и миграции клеток глиомы, что поддерживает предположение о проканцерогенных эффектах версикана V1 в регуляции пролиферации и миграции опухолевых клеток при развитии глиобластомы [70].

Экспрессия NG2/CSPG4 также усиливается в глиомах и может стимулировать васкуляризацию опухоли. Наряду с передачей сигналов от факторов роста NG2 является рецептором клеточной поверхности для компонентов ВКМ и β 1-интегрина, и его активация вносит свой вклад в такие процессы, как пролиферация клеток, их подвижность и жизнеспособность [71]. Экспрессия NG2 в опухолях головного мозга у детей различается в зависимости от типа, и, в отличие от глиомы у взрослых, NG2 экспрессируется в опухолях более низкой степени злокачественности [72]. Кроме того, NG2-экспрессирующие клетки глиобластомы устойчивы к ионизирующему излучению и повреждениям ДНК, по-видимому, опосредуя резистентность опухолей к лучевой терапии путем индукции ферментов, поглощающих активные формы кислорода, что замедляет повреждение ДНК [73].

Экспрессия бревикана связана с дифференцировкой клеток глиомы и их адгезивными свойствами, а также подвижностью и ростом опухоли [74]. Бревикан способствует активации рецептора эпидермального фактора роста, увеличивает экспрессию молекул клеточной адгезии, способствует секреции фибронектина и накоплению его микрофибрилл на поверхности клетки. Кроме того, N-концевой продукт расщепления бревикана, но не полный белок, ассоциируется с фибронектином в культивируемых клетках и клинических образцах глиомы [75].

Экспрессия CD44 заметно увеличивается при прогрессировании глиомы [76]. Вероятно, гиалуроновая кислота усиливает инвазию клеток глиомы в модельной системе *in vitro* именно через молекулярный механизм, включающий в себя взаимодействие гиалуроновой кислоты с CD44 [77].

Повышенная экспрессия серглицина в глиоме зависит от степени злокачественности опухоли, положительно коррелирует с инфильтрацией тучными клетками и ассоциирована с низкой выживаемостью пациентов [78].

Уровень экспрессии корового белка синдекана 1 повышен в тканях глиомы по сравнению с контрольной

тканью и отрицательно ассоциирован со степенью злокачественности опухоли и прогнозом заболевания [79]. Злокачественные клетки глиомы экспрессируют также синдеканы 2, 3 и 4 [80].

Экспрессия **глипикана 1** повышена в эндотелиальных клетках глиомы сосудов, что может способствовать ангиогенезу и устойчивости опухолей к лучевой терапии через FGF-2-опосредованный механизм [81]. Экспрессия глипикана 1 повышена также в ткани астроцитомы и олигодендроглиомы по сравнению с нетрансформированной тканью головного мозга и способствует усиленной передаче сигналов от FGF-2 через рецептор FGFR1c [82].

Протеогликаны в опухолях предстательной железы

В литературе есть детальные обзоры, касающиеся функциональной роли ПГ в развитии РПЖ [83]. Для этого типа эпителиальных опухолей наиболее значимые изменения происходят в экспрессии и локализации ГСПГ.

ГСПГ **синдекан 1** является наиболее изученным при РПЖ, хотя единого мнения об экспрессии синдекана 1 в этом типе опухолей пока не существует. В нескольких работах показано снижение экспрессии синдекана 1 в опухолях по сравнению с нормальной тканью: экспрессия синдекана 1 не изменяется при доброкачественной гиперплазии и интраэпителиальной неоплазии предстательной железы, но значительно снижается в аденокарциномах и полностью исчезает в слабо дифференцированных опухолях [84]; пониженная экспрессия синдекана 1 ассоциирована с развитием низкодифференцированных опухолей и плохим прогнозом для пациентов, а нарушение в экспрессии и околочелюстной локализации синдекана 1 может быть сигналом к возникновению рецидива [85]; значительное снижение содержания синдекана 1 в различных областях опухоли положительно коррелирует с высоким значением суммы баллов по шкале Глисона и наличием регионарных метастазов [86]. В то же время повышенная экспрессия синдекана 1 наблюдается в гормоннезависимых и метастатических опухолях предстательной железы по сравнению с доброкачественной гиперплазией и интраэпителиальной неоплазией [87] и не коррелирует с оценкой по шкале Глисона [88].

Экспрессия **глипикана 1** в клетках РПЖ значительно повышается [64]. В настоящее время разрабатывается методика иммуноферментного анализа для оценки уровней глипикана 1 в нормальной ткани, доброкачественной гиперплазии и злокачественных опухолях предстательной железы, чтобы определить, может ли секретируемый глипикан 1 представлять клинически значимый биомаркер для диагностики РПЖ [89].

Уровень экспрессии **глипикана 5** в опухолях предстательной железы, особенно в агрессивных, снижен по сравнению с нормальной тканью и тесно ассоциирован с повышенным уровнем в крови простатическо-

го специфического антигена, высоким значением по шкале Глисона, стадией опухоли Т3 и метастазами в лимфатические узлы. Кроме того, низкая экспрессия глипикана 5 является независимым прогностическим фактором общей выживаемости больных РПЖ и может, таким образом, служить биомаркером диагностики и прогноза заболеваемости [90].

Перлекан экспрессируется на границах тканей, включая те, которые разделяют эпителий и соединительную ткань. Его экспрессия увеличивается вблизи участков инвазии первичных опухолей предстательной железы, преимущественно за счет того, что опухолевые клетки и группы стромальных клеток увеличивают продукцию перлекана в ответ на цитокины, присутствующие в микроокружении опухоли [91]. *In vitro* показано, что в регуляции экспрессии корового белка гена *HSPG2* участвует цитокин TNF- α (фактор некроза опухоли альфа), что говорит о возможном вовлечении перлекана в цитокиноопосредованные реакции, влияющие на инвазию клеток РПЖ [91]. В опухолях предстательной железы уровни матриксной металлопротеиназы 7 и перлекана высоко коррелируют между собой, а ферментативная обработка перлекана матриксной металлопротеиназой 7, как это происходит в микроокружении инвазивных опухолей, является молекулярным переключателем для изменения поведения клеток РПЖ и благоприятствует их инвазии [92]. В сыворотке больных РПЖ обнаружен повышенный уровень фрагментов перлекана (причем большинство из домена IV) по сравнению с нормальной сывороткой, что указывает на его деградацию в процессе метастазирования и может служить одним из критериев инвазивного РПЖ [93].

Показано, что метастатические клетки РПЖ создают во ВКМ особую метастатическую нишу, изменяя фенотип местных стромальных клеток и сам ВКМ. В присутствии 2 метастатических клеточных линий РПЖ PC3 и DU145 экспрессия таких компонентов ВКМ, как малые лейцин-богатые ПГ (**декорин, бигликан, люмикан и фибромодулин**), в фибробластах значительно снижается. У животных, которым были трансплантированы совместные культуры метастатических клеток РПЖ и «активированные» фибробласт/остеобластоподобные клетки, развивались более крупные опухоли по сравнению с животными, которым трансплантировали только метастатические опухолевые клетки [94].

Показано, что экспрессия **декорина** снижается в строме опухолей предстательной железы по сравнению с нормальной стромой, а низкие уровни декорина обычно считаются плохим прогностическим маркером РПЖ [83]. Эктопическая экспрессия декорина, обусловленная введением рекомбинантной аденовирусной конструкции в клеточные линии PC3 и DU145, приводила к ингибированию сигнального пути Wnt/ β -катенин, фактора роста эндотелия сосудов A и ингибировала миграцию опухолевых клеток. Инокуляция

животным аденовируса, несущего ген декорина, в мышинной модели *in vivo* вызывает значительное ингибирование появления метастазов в кости, снижение опухолевой массы, числа остеокластов и увеличение выживаемости животных, что говорит о возможном использовании этого вектора как потенциального терапевтического агента для лечения метастазов в кости при РПЖ [95].

Данных об экспрессии **люмикана** в опухолях предстательной железы достаточно мало. Известно, что он экспрессируется в нормальной ткани предстательной железы и его экспрессия увеличивается при гиперплазии по сравнению с нормальной тканью [96]. Анализ *in vitro* показал, что люмикан ингибирует миграцию и инвазию метастатических клеток РПЖ, выделенных из лимфатического узла, кости и мозга. Более того, значительное увеличение инвазии клеток через брюшину наблюдалось у мышей, нокаутных по люмикану, что демонстрирует ограничительную роль люмикана, присутствующего во ВКМ, в отношении инвазии РПЖ. Увеличение экспрессии люмикана наблюдается в стромах, окружающей первичные опухоли предстательной железы, играет ограничивающую роль в развитии рака и может быть ценным диагностическим и/или прогностическим маркером при РПЖ [97]. Существуют также данные о том, что люмикан может находиться внутриклеточно в секреторных гранулах эпителиальных клеток предстательной железы, и предполагается, что при такой локализации он может действовать как опухолевый супрессор [96].

Также из литературы известно, что при доброкачественной гиперплазии предстательной железы происходит накопление **версикана** [98], а его ингибирование может быть потенциальной терапевтической стратегией в комплексном лечении кастрационно-резистентного РПЖ [99].

В целом представленные данные убедительно свидетельствуют об активном участии различных ПГ в процессах канцерогенеза и их важной функциональной роли в злокачественной трансформации клеток и их микроокружения. Диагностическая, прогностическая и терапевтическая значимость ПГ уже позволила начать практическую разработку новых противоопухолевых препаратов, нацеленных на активацию/подавление патологической экспрессии таких компонентов опухолевого микроокружения, как декорин [42, 95] и версикан [99].

Внутриклеточные протеогликианы

ПГ присутствуют также и внутри клетки (помимо биосинтетических этапов), однако это не является их основным местом локализации, и вопрос о структуре, составе и функциях внутриклеточных ПГ остается практически неизученным. Основное место их локализации внутри клетки — секреторные гранулы, и, возможно, они напрямую и/или опосредованно связаны с цитоскелетом.

В нормальных клетках и тканях

Серглицин является основным ПГ секреторных гранул гемопоэтических клеток, и тесная упаковка белков секреторных гранул зависит от его присутствия [100]. Серглицин содержит такие цепи ГАГ, как ГС, иногда хондроитин или ДС.

Известно, что в человеческих клетках серглицин существует в 2 формах, которые отличаются по функциональным свойствам и, возможно, по составу и/или структуре их углеводных цепей: внутриклеточный серглицин является ключевым медиатором гранулопоза в тучных клетках, цитолитических Т-лимфоцитах, нейтрофилах и участвует в хранении или секреции протеаз, гистамина, цитокинов и хемокинов в гранулах, а внеклеточный серглицин высвобождается из гранул тучных клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, эндотелиальных клеток и взаимодействует с рецептором CD44 в гемопоэтических клетках. Секреция серглицина вовлечена в высвобождение активатора плазминогена тканевого типа из эндотелиальных клеток, фактора некроза опухолей из макрофагов и матриксной металлопротеиназы 9 из моноцитов [101], что указывает на важную роль серглицина в межклеточных взаимодействиях.

В опухолевых клетках и тканях

Многочисленные исследования показали, что серглицин, обычно находящийся в секреторных гранулах гемопоэтических клеток (преимущественно тучные клетки и нейтрофилы), секретируется опухолевыми клетками, а в некоторых случаях даже расположен на их мембране [102]. Избыточная экспрессия и секреция серглицина связаны с агрессивностью опухолевых клеток, способствуют их миграции, инвазии и коррелируют с плохим исходом заболевания [103]. Помимо гемопоэтических клеток, серглицин также синтезируется различными типами негемопоэтических клеток (например, эндотелиальными клетками). Его экспрессия также может быть увеличена в опухолях предстательной железы благодаря притоку иммунных клеток к опухоли [83].

Низкие уровни серглицина обнаружены в цитоплазме гиперпластических и нормальных клеток предстательной железы, однако уровень его экспрессии значительно повышен в клетках РПЖ [103]. Повышенная экспрессия серглицина опухолевыми и стромальными клетками усиливает экспрессию медиаторов воспаления, факторов роста и протеолитических ферментов, которые могут действовать аутокринным и/или паракринным способом, влияя на поведение как стромальных, так и эпителиальных клеток. В свою очередь, это может способствовать воспалительному процессу в микроокружении опухолевых клеток, формировать агрессивный фенотип опухоли и придавать устойчивость к химиотерапевтическим препаратам и воздействию системы комплемента [103]. Вполне вероятно, что серглицин участвует таким образом

в создании опухолевого микроокружения, которое стимулирует рост и распространение опухолевых клеток.

Внутриядерные протеоглики и гликозаминогликаны

Наряду с окологлазочной и внутрислазочной локализацией ПГ, они также обнаруживаются и в клеточном ядре, хотя их функции там до сих пор остаются малоизученными.

Первые сообщения, демонстрирующие локализацию ПГ в ядре клеток, относятся к середине 1970-х годов [104, 105], когда в клеточных ядрах были идентифицированы различные классы ГАГ — ГС, ДС и/или ХС [106, 107]. Концентрация, состав и степень сульфатирования ГАГ изучались в очищенных ядрах, выделенных из мозга крыс, где были обнаружены ГС, ХС и гиалуроновая кислота [105], а в ядре и цитозоле сосуластных гладкомышечных клеток аорты крысы — внутрислазочный ХСПГ версикан [108]. Основными полисахаридными компонентами ядер клеток меланомы мыши В16 являлись ХС с разной степенью сульфатирования, в то время как ГС был представлен в незначительном количестве [104]. В ядрах нормальной печени мышей были обнаружены ГСПГ и ДСПГ [109], а ядра клеток мышинной гепатомы содержали ГСПГ, ДСПГ и ХСПГ [110].

В целом ГС и ДС были идентифицированы как основные углеводные цепи ядерных ПГ для опухолевых и нормальных клеток печени мышей соответственно, хотя оставалось совершенно непонятным, чем определяется такая гетерогенность состава и содержания ПГ в ядрах различных клеток — методом выделения ПГ (ГАГ), типом клеток или их пролиферативным статусом. Полученные результаты выглядели настолько необычными и не укладывающимися в общепринятые представления о функциональном предназначении ПГ, что не получили должного внимания и развития. Лишь в последнее десятилетие вновь стали появляться работы в этой области исследований, которые приближают нас к пониманию функциональной роли внутрислазочных ПГ, связанной с организацией и функционированием клеточного ядра.

Происхождение внутрислазочных протеогликанов

В настоящее время нет определенности в вопросе о происхождении ядерных ПГ [111]. В работе М. Ishihara и соавт. достоверно показано, что по крайней мере часть ядерных ГАГ первоначально была локализована на поверхности клетки и лишь затем транслоцировалась в клеточное ядро [112]. Так, после добавления к культуре гепатоцитов $[^{35}\text{S}]\text{O}_4^{2-}$ через 2 ч в ядрах начинал накапливаться $[^{35}\text{S}]$ -содержащий ГС, содержание которого достигало равновесного уровня через 20 ч. Терялся этот ГС из ядер с $T_{1/2} = 8$ ч. При изучении захвата клетками экзогенного $[^{35}\text{S}]$ -ГС обнаружено, что при температуре 37 °С клетки захватывали ГСПГ и транспортировали около 10 % интернализованного ГС в ядро, где он появлялся в виде цепей ГАГ, свободных

от корового белка [112]. Оценка относительного содержания ГС в клеточном ядре показала, что ядерный пул составляет 6,5 и 5,4 % от общего количества связанных с клеткой ГС в растущих культурах и культурах, достигших стадии контактного торможения, соответственно [113]. Транслокации подвергаются, по-видимому, не все интернализованные ГАГ, а лишь структурно уникальные ГС — из цитоплазматического пула ГС в ядро транспортируются в основном ГС, обогащенные остатками глюкозы, сульфатированной по 2-му положению (GlcA-2-SO_4^{2-}), в то время как в цитоплазматическом пуле остаются ГС, практически не содержащие GlcA-2-SO_4^{2-} [112]. В свою очередь, степень сульфатирования ГС по 2-му положению определяется присутствием в молекуле остатков L-идуроновой кислоты (L-IdoUA). Показано, что экзогенные углеводные цепи ГС, обогащенные L-IdoUA, в отличие от ГС с низким содержанием L-IdoUA, накапливаются в цитоплазме нормальных фибробластов легкого (HFL-1), и временные показатели их накопления коррелируют с антипролиферативной активностью этих ГС [114]. В то же время углеводные цепи ГС не появляются ни в цитоплазме, ни в ядрах клеток карциномы легкого (A549) через 24–72 ч инкубации этих клеток с экзогенными ГС.

Возможность транслокации также показана для другого класса ПГ (ДСПГ) в работе D.R. Hiscock и соавт. Они обнаружили, что часть мембранных ДСПГ может захватываться клеткой с последующей транслокацией высвобожденных цепей ДС в клеточное ядро [107].

Функциональная роль внутрислазочных протеогликанов

Несмотря на то что в немногочисленных исследованиях продемонстрировано присутствие ГАГ в ядрах клеток, их функциональное назначение остается малоизученным [115].

Важный момент заключается в том, что благодаря наличию углеводных цепей ГАГ, несущих высокий отрицательный заряд (до 3–4 сульфатных групп/дисахарид) и имеющих очень гетерогенную структуру, молекулы ПГ теоретически способны взаимодействовать с широчайшим спектром других компонентов ядра и влиять на различные внутрислазочные процессы. К настоящему моменту получен ряд данных, свидетельствующих о важных регуляторных функциях внутрислазочных ПГ, связанных с транспортом различных молекул в клеточное ядро, регуляцией пролиферации клеток и клеточного цикла, структурой хроматина и транскрипционной активностью разных генов.

Транспорт молекул в клеточное ядро. Известно, что ПГ клеточной поверхности играют роль в представлении различных факторов роста для их рецепторов, однако они также, по-видимому, важны для транспорта этих факторов в ядро клеток [111].

Так, показано, что фактор роста фибробластов FGF-2 связывается с ГСПГ и транслоцируется в ядро

как молекулярный комплекс [116–118], а ГСПГ синдекана 1 локализуется с FGF-2 в ядре клеток мезотелиомы. Сверхэкспрессия синдекана 1 в этих клетках приводит к увеличению накопления FGF-2 в ядре, что говорит о функциональном значении синдекана 1 для транспорта FGF-2 в ядро [118]. Фактор роста гепатоцитов HGF, связанный с цепями ГС синдекана 1, секретируемого в культуральную среду опухолевыми клетками миеломы, транспортируется в ядра нормальных клеток стромы костного мозга вместе с синдексаном 1, а удаление связанного с ГС фактора роста гепатоцитов из комплекса отменяет транслокацию синдекана 1 в ядро [115]. Молекулярный механизм такой транслокации в клетках мезотелиомы связан с прямым взаимодействием углеводных цепей ГС с микротрубочками [119], а макромолекулярный комплекс синдекана 1 и тубулина может принимать участие в переносе факторов роста в ядро клетки.

Регуляция пролиферативной активности клеток. Внутриядерные ПГ способны влиять на скорость деления клеток (стимулировать или блокировать его), хотя молекулярные механизмы таких эффектов остаются непонятными. Например, по мере того, как клетки достигают монослоя, выработка ГСПГ в них увеличивается и содержание ГС в клеточном ядре также увеличивается в 3 раза, при этом структура цепей ГС в ядре изменяется — если в активно пролиферирующих клетках внутриядерные ГС содержат в основном 2-О-сульфатированную глюкуроновую кислоту, то при переходе клеток от логарифмического роста к монослою степень сульфатирования ГС в ядре значительно увеличивается и проявляет отрицательную ассоциацию со скоростью деления клеток [113]. Искусственное понижение уровня ядерных ГС приводило к снижению скорости деления клеток и одновременной потере контактного ингибирования, в результате чего наблюдался чрезмерный рост культур, уже достигших стадии контактного торможения [120].

При добавлении к культуре клеток гепатомы, находящихся в логарифмической фазе роста, экзогенных ГСПГ из логарифмически растущих клеток, они захватывались клетками, но очень мало интернализованных ГС появлялось в клеточных ядрах и никаких изменений в скорости роста клеток не наблюдалось. Однако, когда ГСПГ добавляли к клеткам гепатомы, растущим в условиях отсутствия сыворотки и дефицита инсулина, клеточная пролиферация увеличивалась. При добавлении ГСПГ, выделенных из культуры на стадии контактного торможения, рост обработанных клеток тормозился, но возобновлялся при снижении уровня ядерных ГС [121]. По-видимому, ГСПГ из гепатоцитов, находящихся на стадии контактного торможения, играют роль в предотвращении клеточного деления, в то время как ГСПГ из экспоненциально растущих клеток его стимулируют.

Регуляция клеточного цикла. Регуляторные эффекты ядерных ПГ в отношении клеточной пролиферации,

по-видимому, тесно взаимосвязаны с регуляцией клеточного цикла и организацией митотического веретена деления. Во время митоза ГС почти полностью исчезали из всех клеточных пулов, а после митоза захватывались и вновь появлялись в ядре, оставаясь там, пока клетки снова не приступят к делению. Добавление ГСПГ к синхронизированным культурам сразу после первого митоза приводило к немедленной остановке клеточного цикла в фазе G_1 . Ингибирование клеточного роста происходит из-за блока в фазе G_1 клеточного цикла до границы G_1/S [121].

Динамические изменения в структуре глипикана в ядрах клеток глиомы С6 во время деления клеток коррелируют с различными фазами клеточного цикла [122]. Версикан, по-видимому, играет роль в организации митотического веретена деления во время деления эндотелиальных клеток крысы [108], а присутствие синдекана 1 в митотическом веретене деления может стабилизировать митотический механизм в клетках мезотелиомы [119]. Индуцированная винбластином (химиопрепарат, который связывается с тубулином и тормозит образование веретена деления) остановка деления клеток в фазе G_2 ингибирует транслокацию синдекана 1 в ядро [118].

Все эти данные демонстрируют четкую корреляцию стадии клеточного цикла с ядерной локализацией ГСПГ, но не дают однозначного ответа, регулируют ли внутриядерные ГСПГ клеточный цикл или же стадия клеточного цикла регулирует локализацию ГСПГ в ядре. Этот вопрос требует дальнейших исследований [115].

Влияние на структуру хроматина. Высокий отрицательный заряд углеводных цепей ГАГ позволяет им взаимодействовать с положительно заряженными молекулами внутри ядра, такими как гистоны. В ряде исследований показано, что ГС и ГСПГ действуют как ингибиторы ацетилирования гистонов, тем самым регулируя экспрессию генов. Показано, что ГСПГ, выделенные из роговицы и легочных фибробластов, ингибируют активность гистонацетилтрансфераз р300 и рCAF, а добавление гепарина к легочным фибробластам приводит к быстрому (6 ч) 50 % снижению ацетилирования гистона H3 *in vitro*. Способность гепарина ингибировать активность гистонацетилтрансфераз зависела от его размера и структуры; небольшие олигосахариды, полученные из гепарина (>8 сахаров), и N-десульфатированный или O-десульфированный гепарин проявляли сниженную ингибирующую активность [123]. Потеря ядерного синдекана 1 приводит к увеличению степени ацетилирования гистонов (по-видимому, за счет активации гистонацетилтрансфераз) и транскрипции генов VEGF, матриксной металлопротеиназы 9, фактора роста гепатоцитов и RANKL при множественной миеломе, что способствует агрессивному поведению опухоли [124].

ГС также играет важную роль в регуляции структуры хроматина во время оплодотворения. В сперме плотная упаковка хроматина обеспечивается протаминами,

а не гистонами. После оплодотворения ГС облегчают удаление протаминов, что способствует деконденсации хроматина сперматозоида и слиянию мужского и женского генетического материала [125]. ДС и гепарин также способствовали деконденсации хроматина в мышечных сперматозоидах *in vitro*, но активность гепарина при этом была значительно выше. Использование обоих ГАГ вместе выявило наличие синергетического эффекта. Полученные результаты указывают на новую потенциальную роль ДС в деконденсации хроматина в сперме мышей при оплодотворении [126].

Влияние на топологию ДНК. Помимо влияния на структуру хроматина и степень ацетилирования гистонов, внутриядерные ГАГ способны влиять, по-видимому, на топологию ДНК. ГС из клеток нормальной печени может блокировать активность топоизомеразы I (фермента, необходимого для регуляции релаксации цепей ДНК в ядрах клеток), предотвращая тем самым релаксацию суперспирализованной ДНК. В то же время ГС из неопластической печени человека не влияет на релаксацию сверхспиральной ДНК, свидетельствуя о том, что для блокады топоизомеразы ДНК требуется ГС специфической структуры [127].

В клеточных ядрах ГС могут быть колокализованы с ДНК и нуклеолином — маркером ядрышек, возможно, участвуя в регуляции синтеза и/или высвобождении рибосомной РНК [128] или даже образуя стабильные макромолекулярные комплексы с олигорибонуклеотидами [129].

Взаимодействие с транскрипционными факторами. Помимо изменения экспрессии генов путем модификации структуры хроматина и топологии ДНК, ГАГ (преимущественно ГС) могут взаимодействовать с транскрипционными факторами, влияя на транскрипционную активность различных генов. ГС способны ингибировать взаимодействие транскрипционных факторов, таких как AP-1, SP-1, ETS-1 и ядерный фактор κВ, с их консенсусными олигонуклеотидными последовательностями [130, 131], ДНК-связывающие домены этих транскрипционных факторов содержат последовательности, сходные с белками, которые имеют высокое сродство к гепарину. Интересно, что ГС из прилежащих тканей уменьшал связывание AP-1 и SP-1 с их консен-

сусными элементами, а опухолевый ГС не влиял на связывание AP-1 и SP-1 с ДНК, но блокировал взаимодействие ETS-1 с ДНК [131]. Это различие, наблюдаемое между нормальными и трансформированными клетками, может объяснить, как опухолевые клетки экспрессируют гены, способствующие развитию опухоли.

По-видимому, факторы транскрипции чувствительны не только к электростатическому заряду, но также к структурным мотивам, присутствующим в ГС. При связывании с ГС факторы транскрипции могут быть защищены от деградации, тем самым обеспечивается постоянный резерв легкодоступных факторов транскрипции.

Таким образом, присутствие ПГ в ядрах клеток показано в целом ряде работ и получены первые данные о молекулярных механизмах транслокации ГАГ и ПГ в клеточное ядро и тех макромолекулах, которые могут взаимодействовать с ними в ядрах клеток. Пилотные результаты свидетельствуют о важной роли ПГ в функциональной организации клеточного ядра и их потенциальном участии в молекулярных механизмах функционирования генома.

Заключение

Белково-углеводные молекулы ПГ представляют собой неотъемлемый компонент любой ткани, который играет важную роль как в нормальной физиологии клеток, так и в формировании и поддержании окружающего их ВКМ. Сложная структура ПГ и их высокий отрицательный заряд обеспечивают их взаимодействие с многочисленными лигандами, передачу сигнальной информации, поддержание межклеточных взаимодействий и взаимодействий клеток с их микроокружением. Злокачественная трансформация клеток и тканей тесно ассоциирована с нарушениями в нормальном биосинтезе, локализации и функционировании ПГ, хотя их причинно-следственные отношения остаются на данный момент изучены недостаточно. В этой перспективной области исследований все еще остается больше вопросов, чем ответов, и любые новые результаты безусловно будут вносить важнейший вклад в понимание принципов организации и функционирования живых клеток.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Iozzo R.V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998;67:609–52. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.609. PMID: 9759499.
2. Yu P., Pearson C.S., Geller H.M. Flexible roles for proteoglycan sulfation and receptor signaling. *Trends Neurosci* 2018;41(1):47–61. DOI: 10.1016/j.tins.2017.10.005. PMID: 29150096.
3. Lindahl U., Couchman J., Kimata K. et al. Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans. *Essentials of glycobiology* [Internet]. 3rd edn. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015–2017. Chapter 17, 2017. PMID: 28876828.
4. Iozzo R.V., Schaefer L. Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* 2015;42:11–55. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.02.003. PMID: 25701227.
5. Li J.P., Kusche-Gullberg M. Heparan sulfate: biosynthesis, structure, and function. *Int Rev Cell Mol Biol* 2016;325:215–73.

- DOI: 10.1016/bs.ircmb.2016.02.009. PMID: 27241222.
6. Mikami T., Kitagawa H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(10):4719–33. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.06.006. PMID: 23774590.
 7. Trowbridge J.M., Gallo R.L. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology* 2002;12(9):117R–25R. PMID: 12213784.
 8. Funderburgh J.L. Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* 2000;10(10):951–8. PMID: 11030741.
 9. Afratis N., Gialeli C., Nikitovic D. et al. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J* 2012;279(7):1177–97. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08529.x. PMID: 22333131.
 10. Medeiros G.F., Mendes A., Castro R.A. et al. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochim Biophys Acta* 2000;1475(3):287–94. PMID: 10913828.
 11. Poulain F.E., Yost H.J. Heparan sulfate proteoglycans: a sugar code for vertebrate development. *Development* 2015;142(20):3456–67. DOI: 10.1242/dev.098178. PMID: 26487777.
 12. Bernfield M., Götte M., Park P.W. et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 1999;68:729–77. DOI: 10.1146/annurev.biochem.68.1.729. PMID: 10872465.
 13. Couchman J.R. Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010;26:89–114. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104126. PMID: 20565253.
 14. Afratis N.A., Nikitovic D., Mulhaupt H.A. et al. Syndecans – key regulators of cell signaling and biological functions. *FEBS J* 2017;284(1):27–41. DOI: 10.1111/febs.13940. PMID: 27790852.
 15. Choi Y., Chung H., Jung H. et al. Syndecan as cell surface receptors: unique structure equates with functional diversity. *Matrix Biol* 2011;30(2):93–9. DOI: 10.1016/j.matbio.2010.10.006. PMID: 21062643.
 16. Piperigkou Z., Mohr B., Karamanos N. et al. Shed proteoglycans in tumor stroma. *Cell Tissue Res* 2016;365(3):643–55. DOI: 10.1007/s00441-016-2452-4. PMID: 27365088.
 17. Filmus J., Capurro M., Rast J. Glypicans. *Genome Biol* 2008;9(5):224. DOI: 10.1186/gb-2008-9-5-224. PMID: 18505598.
 18. Capurro M., Martin T., Shi W. et al. Glypican-3 binds to Frizzled and plays a direct role in the stimulation of canonical Wnt signaling. *J Cell Sci* 2014;127(Pt 7):1565–75. DOI: 10.1242/jcs.140871. PMID: 24496449.
 19. Nicolosi P.A., Dallatomasina A., Perris R. Theranostic impact of NG2/CSPG4 proteoglycan in cancer. *Theranostics* 2015;5(5):530–44. DOI: 10.7150/thno.10824. PMID: 25767619.
 20. Yadavilli S., Hwang E.I., Packer R.J. et al. The role of NG2 proteoglycan in glioma. *Transl Oncol* 2016;9(1):57–63. DOI: 10.1016/j.tranon.2015.12.005. PMID: 26947882.
 21. Sakry D., Trotter J. The role of the NG2 proteoglycan in OPC and CNS network function. *Brain Res* 2016;1638(Pt B):161–6. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.06.003. PMID: 26100334.
 22. Morath I., Hartmann T.N., Orian-Rousseau V. CD44: more than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol* 2016;81(Pt A):166–73. DOI: 10.1016/j.biocel.2016.09.009. PMID: 27640754.
 23. Jijiwa M., Demir H., Gupta S. et al. CD44v6 regulates growth of brain tumor stem cells partially through the AKT-mediated pathway. *PLoS One* 2011;6(9):e24217. DOI: 10.1371/journal.pone.0024217. PMID: 21915300.
 24. Stanton H., Melrose J., Little C.B. et al. Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812(12):1616–29. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.08.009. PMID: 21914474.
 25. Binder M.J., McCoombe S., Williams E.D. et al. The extracellular matrix in cancer progression: role of hyaluronan proteoglycans and ADAMTS. *Cancer Lett* 2017;385:55–64. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.11.001. PMID: 27838414.
 26. Wight T.N., Kinsella M.G., Evanko S.P. et al. Versican and the regulation of cell phenotype in disease. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840(8):2441–51. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.12.028. PMID: 24401530.
 27. Andersson-Sjöland A., Hallgren O., Rolandsson S. et al. Versican in inflammation and tissue remodeling: the impact on lung disorders. *Glycobiology* 2015;25(3):243–51. DOI: 10.1093/glycob/cwu120. PMID: 25371494.
 28. Sivan S.S., Wachtel E., Roughley P. et al. Structure, function, aging and turnover of aggrecan in the intervertebral disc. *Biochem J* 2006;399(1):29–35. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.07.013. PMID: 25065289.
 29. Nia H.T., Ortiz C., Grodzinsky A. Aggrecan: approaches to study biophysical and biomechanical properties. *Methods Mol Biol* 2015;1229:221–37. DOI: 10.1007/978-1-4939-1714-3_20. PMID: 25325957.
 30. Frischknecht R., Seidenbecher C.I. Brevican: a key proteoglycan in the perisynaptic extracellular matrix of the brain. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44(7):1051–4. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.03.022. PMID: 22537913.
 31. Chen L., Liao J., Klineberg E. et al. Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs): characteristics and function in the intervertebral disc. *J Tissue Eng Regen Med* 2017;11(3):602–8. DOI: 10.1002/term.2067. PMID: 26370612.
 32. Pietraszek-Gremplewicz K., Karamanou K., Niang A. et al. Small leucine-rich proteoglycans and matrix metalloproteinase-14: Key partners? *Matrix Biol* 2017. DOI: 10.1016/j.matbio.2017.12.006. PMID: 29253518.
 33. Maytin E.V. Hyaluronan: more than just a wrinkle filler. *Glycobiology* 2016;26(6):553–9. DOI: 10.1093/glycob/cww033. PMID: 26964566.
 34. Pozzi A., Yurchenco P.D., Iozzo R.V. The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biol* 2017;57–58:1–11. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.12.009. PMID: 28040522.
 35. McCarthy K.J. The basement membrane proteoglycans perlecan and agrin: something old, something new. *Curr Top Membr* 2015;76:255–303. DOI: 10.1016/bs.ctm.2015.09.001. PMID: 26610917.
 36. Gubbiotti M.A., Neill T., Iozzo R.V. et al. A current view of perlecan in physiology and pathology: a mosaic of functions. *Matrix Biol* 2017;57–58:285–98. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.09.003. PMID: 27613501.
 37. Farach-Carson M.C., Warren C.R., Harrington D.A., Carson D.D. Border patrol: insights into the unique role of perlecan/heparan sulfate proteoglycan 2 at cell and tissue borders. *Matrix Biol* 2014;34:64–79. DOI: 10.1016/j.matbio.2013.08.004. PMID: 24001398.
 38. Halfter W., Dong S., Schurer B., Cole G.J. Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 1998;273(39):25404–12. PMID: 9738008.
 39. Theocharis A.D., Karamanos N.K. Proteoglycans remodeling in cancer: underlying molecular mechanisms. *Matrix Biol* 2017. DOI: 10.1016/j.matbio.2017.10.008. PMID: 29128506.
 40. Knelson E.H., Nee J.C., Blobe G.C. Heparan sulfate signaling in cancer. *Trends Biochem Sci* 2014;39(6):277–88. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.03.001. PMID: 24755488.
 41. Schaefer L., Tredup C., Gubbiotti M.A. et al. Proteoglycan neofunctions: regulation of inflammation and autophagy

- in cancer biology. *FEBS J* 2017;284(1): 10–26. DOI: 10.1111/febs.13963. PMID: 27860287.
42. Neill T., Schaefer L., Iozzo R.V. Decorin as a multivalent therapeutic agent against cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;97: 174–85. DOI: 10.1016/j.addr.2015.10.016. PMID: 26522384.
 43. Reed C.C., Gauldie J., Iozzo R.V. Suppression of tumorigenicity by adeno-virus-mediated gene transfer of decorin. *Oncogene* 2002;21(23):3688–95. DOI: 10.1038/sj.onc.1205470. PMID: 12032837.
 44. Goldoni S., Seidler D.G., Heath J. et al. An antimetastatic role for decorin in breast cancer. *Am J Pathol* 2008;173(3):844–55. DOI: 10.2353/ajpath.2008.080275. PMID: 18688028.
 45. Du W.W., Yang W., Yee A.J. Roles of versican in cancer biology – tumorigenesis, progression and metastasis. *Histol Histopathol* 2013;28(6):701–13. DOI: 10.14670/HH-28.701. PMID: 23519970.
 46. Yoneda A., Lendorf M.E., Couchman J.R. et al. Breast and ovarian cancers: a survey and possible roles for the cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Histochem Cytochem* 2012;60(1):9–21. DOI: 10.1369/0022155411428469. PMID: 22205677.
 47. Theocharis A.D., Skandalis S.S., Neill T. et al. Insights into the key roles of proteoglycans in breast cancer biology and translational medicine. *Biochim Biophys Acta* 2015;1855(2):276–300. DOI: 10.1016/j.bbcan.2015.03.006. PMID: 25829250.
 48. Eshchenko T.Y., Rykova V.I., Chernakov A.E. et al. Expression of different proteoglycans in human breast tumors. *Biochemistry (Mosc)* 2007;72(9): 1016–20. PMID: 17922662.
 49. Yang X., Qiu M., Hu J. et al. Glypican-5 is a novel metastasis suppressor gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2013;341(2):265–73. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.08.020. PMID: 23962560.
 50. Melo S., Luecke L., Kahlert C. et al. Glypican1 identifies cancer exosomes and facilitates early detection of cancer. *Nature* 2015;523(7559):177–82. DOI: 10.1038/nature14581. PMID: 26106858.
 51. Gharbaran R. Insights into the molecular roles of heparan sulfate proteoglycans (HSPGs-syndecans) in autocrine and paracrine growth factor signaling in the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *Tumour Biol* 2016;37(9):11573–88. DOI: 10.1007/s13277-016-5118-7. PMID: 27317256.
 52. Tsidulko A.Y., Matskova L., Astakhova L.A. et al. Proteoglycan expression correlates with the phenotype of malignant and non-malignant EBV-positive B-cell lines. *Oncotarget* 2015;6(41):43529–39. DOI: 10.18632/oncotarget.5984. PMID: 26527314.
 53. Hu T.H., Huang C.C., Wu C.L. et al. Increased endostatin/collagen XVIII expression correlates with elevated VEGF level and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 2005;18(5): 663–72. DOI: 10.1038/modpathol.3800336. PMID: 15605080.
 54. Suhovskih A.V., Aidagulova S.V., Kashuba V.I. et al. Proteoglycans as potential microenvironmental biomarkers for colon cancer. *Cell Tissue Res* 2015;361(3):833–44. DOI: 10.1007/s00441-015-2141-8. PMID: 25715761.
 55. Baghy K., Tátrai P., Regös E. et al. Proteoglycans in liver cancer. *World J Gastroenterol* 2016;22(1):379–93. DOI: 10.3748/wjg.v22.i1.379. PMID: 26755884.
 56. Leygue E., Snell L., Dotzlaw H. et al. Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma. *J Pathol* 2000;192(3):313–20. DOI: 10.1002/1096-9896(200011)192:3<313::AID-PATH694>3.0.CO;2-B. PMID: 11054714.
 57. Weber C.K., Sommer G., Michl P. et al. Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines. *Gastroenterology* 2001;121(3):657–67. PMID: 11522750.
 58. Zimina N.P., Dmitriev I.P., Rykova V.I. Composition and degree of sulfation of glycosaminoglycans from tissues of different animal species: heterogeneity and tissue specificity of heparan sulfates. *Biokhimiia* 1987;52(6):984–90. PMID: 2959327.
 59. Суховских А.В., Григорьева Э.В. Тканеспецифичность экспрессии протеогликанов в различных типах опухолей человека. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(1):53–60. [Suhovskih A.V., Grigor'eva E.V. Tissue-specificity of proteoglycans expression in different cancers. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2016;3(1):53–60. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805X.2016.3.1.53-60.
 60. Suhovskih A.V., Domanitskaya N.V., Tsidulko A.Y. et al. Tissue-specificity of heparan sulfate biosynthetic machinery in cancer. *Cell Adh Migr* 2015;9(6):452–9. DOI: 10.1080/19336918.2015.1049801. PMID: 26120938.
 61. Kazanskaya G.M., Tsidulko A.Y., Volkov A.M. et al. Heparan sulfate accumulation and perlecan/HSPG2 up-regulation in tumour tissue predict low relapse-free survival for patients with glioblastoma. *Histochem Cell Biol* 2018. DOI: 10.1007/s00418-018-1631-7. PMID: 29322326.
 62. Tsidulko A.Y., Kazanskaya G.M., Kostromskaya D.V. et al. Prognostic relevance of NG2/CSPG4, CD44 and Ki-67 in patients with glioblastoma. *Tumour Biol* 2017;39(9):1010428317724282. DOI: 10.1177/1010428317724282. PMID: 28945172.
 63. Suhovskih A.V., Kashuba V.I., Klein G., Grigorieva E.V. Prostate cancer cells specifically reorganize epithelial cell-fibroblast communication through proteoglycan and junction pathways. *Cell Adh Migr* 2017;11(1):39–53. DOI: 10.1080/19336918.2016.1182292. PMID: 27111714.
 64. Suhovskih A.V., Mostovich L.A., Kunin I.S. et al. Proteoglycan expression in normal human prostate tissue and prostate cancer. *ISRN Oncol* 2013;680136. DOI: 10.1155/2013/680136. PMID: 23691363.
 65. Wang D., Anderson J.C., Gladson C.L. The role of the extracellular matrix in angiogenesis in malignant glioma tumors. *Brain Pathol* 2005;15(4):318–26. PMID: 16389944.
 66. Wade A., Robinson A.E., Engler J.R. et al. Proteoglycans and their roles in brain cancer. *FEBS J* 2013;280(10):2399–417. DOI: 10.1111/febs.12109.23281850. PMID: 23281850.
 67. Yao T., Zhang C.G., Gong M.T. et al. Decorin-mediated inhibition of the migration of U87MG glioma cells involves activation of autophagy and suppression of TGF- β signaling. *FEBS Open Bio* 2016;6(7):707–19. DOI: 10.1002/2211-5463.12076. PMID: 27398310.
 68. Biglari A., Bataille D., Naumann U. et al. Effects of ectopic decorin in modulating intracranial glioma progression *in vivo*, in a rat syngeneic model. *Cancer Gene Ther* 2004;11(11):721–32. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700783. PMID: 15475879.
 69. Arslan F., Bosserhoff A.K., Nickl-Jockschat T. et al. The role of versican isoforms V0/V1 in glioma migration mediated by transforming growth factor- β 2. *Br J Cancer* 2007;96(10):1560–8. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603766. PMID: 17453002.
 70. Onken J., Moeckel S., Leukel P. et al. Versican isoform V1 regulates proliferation and migration in high-grade gliomas. *J Neurooncol* 2014;120(1):73–83. DOI: 10.1007/s11060-014-1545-8. PMID: 25064688.
 71. Stallcup W.B., Huang F.J. A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression. *Cell Adh Migr* 2008;2(3):192–201. PMID: 19262111.
 72. Higgins S.C., Bolteus A.J., Donovan L.K. et al. Expression of the chondroitin sulphate proteoglycan, NG2, in paediatric brain tumors. *Anticancer Res* 2014;34(12):6919–24. PMID: 25503117.
 73. Svendsen A., Verhoeff J.J., Immervoll H. et al. Expression of the progenitor marker

- NG2/CSPG4 predicts poor survival and resistance to ionising radiation in glioblastoma. *Acta Neuropathol* 2011;122(4):495–510. DOI: 10.1007/s00401-011-0867-2. PMID: 21863242.
74. Lu R., Wu C., Guo L. et al. The role of brevican in glioma: promoting tumor cell motility *in vitro* and *in vivo*. *BMC Cancer* 2012;12:607. DOI: 10.1186/1471-2407-12-607. PMID: 23253190.
 75. Hu B., Kong L.L., Matthews R.T. The proteoglycan brevican binds to fibronectin after proteolytic cleavage and promotes glioma cell motility. *J Biol Chem* 2008;283(36):24848–59. DOI: 10.1074/jbc.M801433200. PMID: 18611854.
 76. Wiranowska M., Ladd S., Smith S.R. et al. CD44 adhesion molecule and neuro-glial proteoglycan NG2 as invasive markers of glioma. *Brain Cell Biol* 2006;35(2–3): 159–72. DOI: 10.1007/s11068-007-9009-0. PMID: 17957481.
 77. Radotra B., McCormick D. Glioma invasion *in vitro* is mediated by CD44–hyaluronan interactions. *J Pathol* 1997;181(4):434–8. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199704)181:4<434::AID-PATH797>3.0.CO;2-S. PMID: 9196442.
 78. Roy A., Attarha S., Weishaupt H. et al. Serglycin as a potential biomarker for glioma: association of serglycin expression, extent of mast cell recruitment and glioblastoma progression. *Oncotarget* 2017;8(15):24815–27. DOI: 10.18632/oncotarget.15820. PMID: 28445977.
 79. Xu Y., Yuan J., Zhang Z. et al. Syndecan-1 expression in human glioma is correlated with advanced tumor progression and poor prognosis. *Mol Biol Rep* 2012;39(9): 8979–85. DOI: 10.1007/s11033-012-1767-9. PMID: 22714920.
 80. Watanabe A., Mabuchi T., Satoh E. et al. Expression of syndecans, a heparan sulfate proteoglycan, in malignant gliomas: participation of nuclear factor- κ B in upregulation of syndecan-1 expression. *J Neurooncol* 2006;77(1):25–32. DOI: 10.1007/s11060-005-9010-3. PMID: 16132527.
 81. Qiao D., Meyer K., Mundhenke C. et al. Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 signaling in brain endothelial cells. Specific role for glypican-1 in glioma angiogenesis. *J Biol Chem* 2003;278(18):16045–53. DOI: 10.1074/jbc.M211259200. PMID: 12591930.
 82. Su G., Meyer K., Nandini C.D. et al. Glypican-1 is frequently overexpressed in human gliomas and enhances FGF-2 signaling in glioma cells. *Am J Pathol* 2006;168(6):2014–26. DOI: 10.2353/ajpath.2006.050800. PMID: 16723715.
 83. Edwards I.J. Proteoglycans in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 2012;9(4):196–206. DOI: 10.1038/nrurol.2012.19. PMID: 22349653.
 84. Kiviniemi J., Kallajoki M., Kujala I. et al. Altered expression of syndecan-1 in prostate cancer. *APMIS* 2004;112(2):89–97. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm1120202.x. PMID: 15056224.
 85. Contreras H.R., Ledezma R.A., Vergara J. et al. The expression of syndecan-1 and -2 is associated with Gleason score and epithelial-mesenchymal transition markers, E-cadherin and beta-catenin, in prostate cancer. *Urol Oncol* 2010;28(5):534–40. DOI: 10.1016/j.urolonc.2009.03.018. PMID: 19450993.
 86. Shariat S.F., Svatek R.S., Kabbani W. et al. Prognostic value of syndecan-1 expression in patients treated with radical prostatectomy. *BJU Int* 2008;101(2):232–7. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2007.07181.x. PMID: 17868422.
 87. Zellweger T., Ninck C., Bloch M. et al. Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. *Int J Cancer* 2005;113(4):619–28. DOI: 10.1002/ijc.20615. PMID: 15472903.
 88. Brimo F., Vollmer R.T., Friszt M. et al. Syndecan-1 expression in prostate cancer and its value as biomarker for disease progression. *BJU Int* 2010;106(3):418–23. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2009.09099.x. PMID: 20002675.
 89. Truong Q., Justiniano I.O., Nocon A.L. et al. Glypican-1 as a biomarker for prostate cancer: isolation and characterization. *J Cancer* 2016;7(8):1002–9. DOI: 10.7150/jca.14645. PMID: 27313791.
 90. Zhang C., Liu Z., Wang L. et al. Prognostic significance of GPC5 expression in patients with prostate cancer. *Tumour Biol* 2016;37(5):6413–8. DOI: 10.1007/s13277-015-4499-3. PMID: 26631038.
 91. Warren C.R., Grindel B.J., Francis L. et al. Transcriptional activation by NF κ B increases perlecan/HSPG2 expression in the desmoplastic prostate tumor microenvironment. *J Cell Biochem* 2014;115(7):1322–33. DOI: 10.1002/jcb.24788. PMID: 24700612.
 92. Grindel B.J., Martinez J.R., Pennington C.L. et al. Matrilysin/matrix metalloproteinase-7 (MMP7) cleavage of perlecan/HSPG2 creates a molecular switch to alter prostate cancer cell behavior. *Matrix Biol* 2014;36:64–76. DOI: 10.1016/j.matbio.2014.04.005. PMID: 24833109.
 93. Grindel B., Li Q., Arnold R. et al. Perlecan/HSPG2 and matrilysin/MMP-7 as indices of tissue invasion: tissue localization and circulating perlecan fragments in a cohort of 288 radical prostatectomy patients. *Oncotarget* 2016;7(9):10433–47. DOI: 10.18632/oncotarget.7197. PMID: 26862737.
 94. Coulson-Thomas V.J., Gesteira T.F., Coulson-Thomas Y.M. et al. Fibroblast and prostate tumor cell cross-talk: fibroblast differentiation, TGF- β , and extracellular matrix down-regulation. *Exp Cell Res* 2010;316(19):3207–26. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.08.005. PMID: 20727350.
 95. Xu W., Neill T., Yang Y. et al. The systemic delivery of an oncolytic adenovirus expressing decorin inhibits bone metastasis in a mouse model of human prostate cancer. *Gene Ther* 2015;22(3):247–56. DOI: 10.1038/gt.2014.110. PMID: 25503693.
 96. Holland J.W., Meehan K.L., Redmond S.L. et al. Purification of the keratan sulfate proteoglycan expressed in prostatic secretory cells and its identification as lumican. *Prostate* 2004;59(3):252–9. DOI: 10.1002/pros.20002. PMID: 15042600.
 97. Coulson-Thomas V.J., Coulson-Thomas Y.M., Gesteira T.F. et al. Lumican expression, localization and antitumor activity in prostate cancer. *Exp Cell Res* 2013;319(7):967–81. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.01.023. PMID: 23399832.
 98. True L.D., Hawley S., Norwood T.H. et al. The accumulation of versican in the nodules of benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 2009;69(2):149–58. DOI: 10.1002/pros.20861. PMID: 18819099.
 99. Arichi N., Mitsui Y., Hiraki M. et al. Versican is a potential therapeutic target in docetaxel-resistant prostate cancer. *Oncoscience* 2015;2(2):193–204. DOI: 10.18632/oncoscience.136. PMID: 25859560.
 100. Mulloy B., Lever R., Page C.P. Mast cell glycosaminoglycans. *Glycoconj J* 2017;34(3):351–61. DOI: 10.1007/s10719-016-9749-0. PMID: 27900574.
 101. Li X.J., Qian C.N. Serglycin in human cancers. *Chin J Cancer* 2011;30(9):585–9. DOI: 10.5732/cjc.011.10314. PMID: 21880179.
 102. Korpetinou A., Skandalis S.S., Labropoulou V.T. et al. Serglycin: at the crossroad of inflammation and malignancy. *Front Oncol* 2014;3:327. DOI: 10.3389/fonc.2013.00327. PMID: 24455486.
 103. Purushothaman A., Toole B.P. Serglycin proteoglycan is required for multiple myeloma cell adhesion, *in vivo* growth, and vascularization. *J Biol Chem* 2014;289(9):5499–509. DOI: 10.1074/jbc.M113.532143. PMID: 24403068.

104. Bhavanandan V.P., Davidson E.A. Mucopolysaccharides associated with nuclei of cultured mammalian cells. *PNAS* 1975;72(6):2032–6. PMID: 124440.
105. Margolis R.K., Crockett C.P., Kiang W.L. et al. Glycosaminoglycans and glycoproteins associated with rat brain nuclei. *BBA-General Subjects* 1976;451(2):465–9. PMID: 999866.
106. Stein G.S., Roberts R.M., Davis J.L. et al. Are glycoproteins and glycosaminoglycans components of the eukaryotic genome? *Nature* 1975;258(5536):639–41. PMID: 128700.
107. Hiscock D.R., Yanagishita M., Hascall V.C. Nuclear localization of glycosaminoglycans in rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 1994;269(6):4539–46. PMID: 8308024.
108. Carthy J.M., Abraham T., Meredith A.J. et al. Versican localizes to the nucleus in proliferating mesenchymal cells. *Cardiovasc Pathol* 2015;24(6):368–74. DOI: 10.1016/j.carpath.2015.07.010. PMID: 26395512.
109. Григорьева Э.В., Рыкова В.И. Ядерные протеоглики клеток печени мышей: выделение и идентификация. *Биохимия* 1992;58(8):1165–70. [Grigor'eva E.V., Rykova V.I. Nuclear proteoglycans of murine liver cells: isolation and identification. *Biokhimiya = Biochemistry* 1992;58(8):1165–70. (In Russ.)].
110. Рыкова В.И., Григорьева Э.В. Состав протеогликанов клеточных ядер гепатомы мыши. *Биохимия* 1998;63(11):1271–6. [Rykova V.I., Grigor'eva E.V. The composition of proteoglycans of mouse hepatoma cell nuclei. *Biokhimiya = Biochemistry* 1998;63(11):1271–6. (In Russ.)].
111. Kovalszky I., Hjerpe A., Dobra K. Nuclear translocation of heparan sulfate proteoglycans and their functional significance. *Biochem Biophys Acta* 2014;1840(8):2491–7. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.04.015. PMID: 24780644.
112. Ishihara M., Fedarko N.S., Conrad H.E. Transport of heparan sulfate into the nuclei of hepatocytes. *J Biol Chem* 1986;261(29):13575–80. PMID: 2944884.
113. Fedarko N.S., Conrad H.E. A unique heparan sulfate in the nuclei of hepatocytes: structural changes with the growth state of the cells. *J Cell Biol* 1986;102(2):587–99. PMID: 2935544.
114. Cheng F., Petersson P., Arroyo-Yanguas Y. et al. Differences in the uptake and nuclear localization of anti-proliferative heparan sulfate between human lung fibroblasts and human lung carcinoma cells. *J Cell Biochem* 2001;83(4):597–606. PMID: 11746503.
115. Stewart M.D., Sanderson R.D. Heparan sulfate in the nucleus and its control of cellular functions. *Matrix Biol* 2014;35:56–9. DOI: 10.1016/j.matbio.2013.10.009. PMID: 24309018.
116. Amalric F., Bouche G., Bonnet H. et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the nucleus: translocation process and targets. *Biochem Pharmacol* 1994;47(1):111–5. PMID: 8311835.
117. Hsia E., Richardson T.P., Nugent M.A. Nuclear localization of basic fibroblast growth factor is mediated by heparan sulfate proteoglycans through protein kinase C signaling. *J Cell Biochem* 2003;88(6):1214–25. DOI: 10.1002/jcb.10470. PMID: 12647303.
118. Zong F., Fthenou E., Wolmer N. et al. Syndecan-1 and FGF-2, but not FGF receptor-1, share a common transport route and co-localize with heparanase in the nuclei of mesenchymal tumor cells. *PLoS One* 2009;4(10):e7346. DOI: 10.1371/journal.pone.0007346. PMID: 19802384.
119. Brockstedt U., Dobra K., Nurminen M. et al. Immunoreactivity to cell surface syndecans in cytoplasm and nucleus: tubulin-dependent rearrangements. *Exp Cell Res* 2002;274(2):235–45. DOI: 10.1006/excr.2002.5477. PMID: 11900484.
120. Ishihara M., Conrad H.E. Correlations between heparan sulfate metabolism and hepatoma growth. *J Cell Physiol* 1989;138(3):467–76. DOI: 10.1002/jcp.1041380305. PMID: 2522457.
121. Fedarko N.S., Ishihara M., Conrad H.E. Control of cell division in hepatoma cells by exogenous heparan sulfate proteoglycan. *J Cell Physiol* 1989;139(2):287–94. DOI: 10.1002/jcp.1041390210. PMID: 2715188.
122. Liang Y., Häring M., Roughley P.J. et al. Glypican and biglycan in the nuclei of neurons and glioma cells: presence of functional nuclear localization signals and dynamic changes in glypican during the cell cycle. *J Cell Biol* 1997;39(4):851–64. PMID: 9362504.
123. Buczek-Thomas J.A., Hsia E., Rich C.B. et al. Inhibition of histone acetyltransferase by glycosaminoglycans. *J Cell Biochem* 2008;105(1):108–20. DOI: 10.1002/jcb.21803. PMID: 18459114.
124. Purushothaman A., Hurst D.R., Pisano C. et al. Heparanase-mediated loss of nuclear syndecan-1 enhances histone acetyltransferase (HAT) activity to promote expression of genes that drive an aggressive tumor phenotype. *J Biol Chem* 2011;286(35):30377–83. DOI: 10.1074/jbc.M111.254789. PMID: 21757697.
125. Romanato M., Julianelli V., Zappi M. et al. The presence of heparan sulfate in the mammalian oocyte provides a clue to human sperm nuclear decondensation *in vivo*. *Hum Reprod* 2008;23(5):1145–50. DOI: 10.1093/humrep/den028. PMID: 18287106.
126. Sanchez M.C., Alvarez Sedo C., Julianelli V.L. et al. Dermatan sulfate synergizes with heparin in murine sperm chromatin decondensation. *Syst Biol Reprod Med* 2013;59(2):82–90. DOI: 10.3109/19396368.2012.756952. PMID: 23301776.
127. Kovalszky I., Dudás J., Oláh-Nagy J. et al. Inhibition of DNA topoisomerase I activity by heparin sulfate and modulation by basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biochem* 1998;183(1):11–23. PMID: 9655174.
128. Cheng F., Belting M., Fransson L.A. et al. Nucleolin is a nuclear target of heparan sulfate derived from glypican-1. *Exp Cell Res* 2017;354(1):31–9. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.03.021. PMID: 28300561.
129. Григорьева Э.В., Рыкова В.И. Взаимодействие ядерных протеогликанов с олигорибонуклеотидами. Доклады Академии наук 1997;356(5):693–5. [Grigor'eva E.V., Rykova V.I. Interactions between nuclear proteoglycans and oligoribonucleotides. *Doklady Akademii nauk = Proceedings of the Academy of Sciences* 1997;356(5):693–5. (In Russ.)].
130. Busch S.J., Martin G.A., Barnhart R.L. et al. Trans-repressor activity of nuclear glycosaminoglycans on Fos and Jun/AP-1 oncoprotein-mediated transcription. *J Cell Biol* 1992;116(1):31–42. PMID: 1730747.
131. Dudás J., Ramadori G., Knittel T. et al. Effect of heparin and liver heparansulphate on interaction of HepG2-derived transcription factors and their cis-acting elements: altered potential of hepatocellular carcinoma heparansulphate. *Biochem J* 2000;350(1):245–51. PMID: 10926850.

Вклад авторов

А.В. Суховских: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

Э.В. Григорьева: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, редактирование текста рукописи.

Authors' contributions

A.V. Suhovskih: reviewing of publications of the article's theme, article writing;

E.V. Grigorieva: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme, editing the article text.

ORCID авторов

А.В. Суховских: <https://orcid.org/0000-0001-5336-8552>

Э.В. Григорьева: <https://orcid.org/0000-0003-2457-9179>

ORCID of authors

A.V. Suhovskih: <https://orcid.org/0000-0001-5336-8552>

E.V. Grigorieva: <https://orcid.org/0000-0003-2457-9179>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (проект № 16-15-10243), написание раздела о внутриядерной локализации протеогликанов поддержано грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 15-04-99464.х.

Financing. The study was financially supported by the grant of the Russian Science Foundation (project No. 16-15-10243), the section on intranuclear localization of proteoglycans was supported by the grant of the Russian Foundation for Basic Research No. 15-04-99464.x.

Статья поступила: 10.01.2018. **Принята к публикации:** 21.02.2018.

Article received: 10.01.2018. **Accepted for publication:** 21.02.2018.

Асинхронная репликация у онкологических больных

Г.Ф. Михайлова, В.В. Цепенко, Т.Г. Шкаврова, Е.В. Голуб

Медицинский радиологический научный центр им А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 249036 Обнинск, ул. Королева, 4

Контакты: Галина Федоровна Михайлова tais1260@mail.ru

Эпигенетика — наука об обратимых наследственных изменениях функционирования гена, которые происходят без изменений в нуклеотидной последовательности ДНК. Один из важнейших маркеров нарушений эпигенетической регуляции генома клетки — асинхронность репликации ДНК биаллельно экспрессирующихся генов. Удобным методом оценки нарушения синхронности репликации (асинхронной репликации) в культивированных лимфоцитах периферической крови человека, как правило, является интерфазная флуоресцентная *in situ* гибридизация (I-FISH). В обзоре проведен анализ работ, направленных на изучение асинхронной репликации биаллельно экспрессирующихся генов в лимфоцитах периферической крови онкологических больных. Этот анализ показал, что асинхронная репликация — неспецифический маркер злокачественных новообразований и наблюдается как у онкогематологических больных, так и у пациентов с солидными опухолями, причем не только в клетках опухоли, но и в лимфоцитах периферической крови. Проведенный анализ продемонстрировал, что встречаемость лимфоцитов с асинхронной репликацией изученных генов у онкологических больных достоверно повышена по сравнению со здоровыми лицами и увеличивается в процессе малигнизации (злокачественного перерождения) заболеваний. Это дает потенциальную возможность использовать асинхронную репликацию как молекулярно-генетический маркер для раннего выявления лиц с онкологическими заболеваниями.

Ключевые слова: асинхронная репликация, флуоресцентная *in situ* гибридизация, лимфоциты периферической крови, онкологический биомаркер

Для цитирования: Михайлова Г.Ф., Цепенко В.В., Шкаврова Т.Г., Голуб Е.В. Асинхронная репликация у онкологических больных. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(1):26–34.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-1-26-34

Asynchronous replication in oncological patients

G.F. Mikhailova, V.V. Tsepenco, T.G. Shkavrova, E.V. Goloub

A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center — branch of the National Medical Research Center of Radiology, Ministry of Health of Russia; 4 Korolyova St., Obninsk 249036, Russia

Epigenetics is a science studying mechanisms of heritable changes in gene function that occur without a change in the DNA sequence. One of the most important marks of epigenetic misbalance of cell genome is an replication asynchrony of genes with biallelic expression. Interphase fluorescence *in situ* hybridization (I-FISH) in phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes of peripheral blood is a proper method of estimation of aberrant DNA replication time e. g. DNA replication asynchrony. In this review we analyzed reports referring to asynchronous DNA replication of biallelically expressed genes in lymphocytes of peripheral blood of cancer patients. Analysis shows the DNA replication asynchrony is a nonspecific tumor marker observing both in tumor cells and lymphocytes of peripheral blood in oncohematological patients and patients with solid tumors. It's stated the frequency of lymphocytes with asynchronous DNA replication of studied genes in cancer patients is increased significantly compares with healthy donors and is enhanced during malignance process. It gives the opportunity of potential using asynchronous replication as molecular genetic marker for cancer patients early revealing.

Key words: asynchronous replication, fluorescence *in situ* hybridization, peripheral blood lymphocyte, cancer biomarker

For citation: Mikhailova G.F., Tsepenco V.V., Shkavrova T.G., Goloub E.V. Asynchronous replication in oncological patients. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2018;5(1):26–34.

Введение

В настоящее время все большую актуальность приобретает диагностика онкологических заболеваний на основе биологических маркеров на уровне клеток, субклеточных структур и генома. Злокачественная трансформация является многоступенчатым процессом, включающим накопление структурных и функ-

циональных изменений в геноме клетки. К структурным (генетическим) маркерам относят все нарушения, которые изменяют структуру ДНК: делеции хромосомных участков, содержащих гены-супрессоры опухолевого роста, амплификации участков хромосом, содержащих протоонкогены, транслокации и инверсии хромосомного материала, в результате которых могут

образовываться химерные гены, имеющие онкогенные функции, а также различные типы мутаций, которые могут активировать протоонкогены или инактивировать гены-супрессоры, и др. К функциональным (эпигенетическим) маркерам относят все нарушения, которые не связаны с изменениями структуры ДНК, но приводят к изменениям в уровне экспрессии генов, участвующих в процессах канцерогенеза. Для многих видов онкологических патологий существующие на данный момент молекулярно-генетические маркеры или их сочетание позволяют определить начальные стадии, прогноз развития заболевания, подобрать оптимальную тактику лечения и разработать таргетные терапевтические средства [1–6]. Тем не менее, несмотря на то, что для многих типов онкологических патологий выявлены характерные генетические и эпигенетические нарушения, постоянно проводятся исследования по созданию и внедрению в клиническую практику новых молекулярно-генетических и биохимических маркеров, что дает мощный импульс для развития диагностики, позволяющей прогнозировать риски развития заболеваний, их обнаружения на ранних стадиях, течение болезни, тактику лечения и осуществлять мониторинг рецидивирования.

На сегодняшний день совершенно очевидно, что в возникновении онкологических заболеваний играют роль как генетические, так и эпигенетические факторы. И если генетические нарушения изучались на протяжении достаточно долгого времени, то исследования роли эпигенетических нарушений в развитии злокачественных новообразований находятся в начале пути. В настоящем обзоре проведен анализ научной литературы с точки зрения возможности применения асинхронной репликации в качестве молекулярно-генетического маркера у онкологических больных и определения области его применения.

Роль времени репликации при канцерогенезе

В организме существуют мощные регуляторные системы как для генома в целом, так и для отдельных клеток, которые контролируют работу генов. Набор эпигенетических механизмов в клетке разнообразен, и сегодня они подразделяются на несколько групп — метилирование и деметилирование ДНК, транскрипционное и трансляционное замалчивание генов малыми РНК, позиционирование элементов хроматина, энзиматическая модификация гистонов — ацетилирование, метилирование, убиквитинирование, фосфорилирование и др. [7]. Многие из этих процессов взаимозависимы. Именно это обеспечивает надежность эпигенетического контроля над избирательным функционированием генов.

При нормальном клеточном делении необходимо, чтобы геном реплицировался правильно, гарантируя, что геномная информация в неизменном виде перешла из одного клеточного поколения в другое. При каждом клеточном цикле ДНК-репликация иници-

руется из тысяч точек начала репликации (ориджинов), распределенных по всему геному. Этот процесс происходит одновременно, занимает короткий промежуток времени и остается практически синхронным во всех последующих клеточных циклах [8–10]. Если ДНК-репликация может инициироваться из любого активного ориджина внутри конкретной фазы S, то время инициации различных ориджинов значительно меняется. Точки начала репликации, расположенные рядом друг с другом, имеют тенденцию инициировать ее в одно и то же время, что в конечном итоге приводит к обширному синхронному реплицированию хромосомных доменов [8, 11, 12]. Некоторые домены начинают репликацию в начале фазы S, другие вступают позднее: в середине или в конце фазы S. Такая временная иерархия процесса называется программой времени репликации [8]. Она устанавливается сразу после митоза в точке фазы G₁, предшествующей точке выбора ориджина, которая определяется случайным образом в результате глобальной реорганизации хроматина в специфических регионах внутри ядра [9, 13, 14]. Программа репликации наследуема, митотически стабильна и является устойчивой эпигенетической характеристикой всех эукариотических хромосом [8, 11].

Контроль времени ДНК-репликации связан с множеством базовых клеточных процессов, которые регулируются во время клеточного цикла и роста. В некоторых модельных системах дефекты времени репликации ассоциируются с дефектами при конденсации хромосом, сцеплении сестринских хроматид и геномной стабильностью [15, 16]. В частности, специфические хромосомные транслокации возникают в результате обширной хромосомной задержки во времени репликации, которая, в свою очередь, запускает высокую частоту добавочных транслокаций [17, 18]. Поздно реплицирующиеся регионы генома имеют более высокую скорость спонтанного мутагенеза по сравнению с рано реплицирующимися. Более того, показано, что искусственная задержка инициации ДНК-репликации увеличивает частоту мутагенных явлений [19, 20]. Интересен тот факт, что в образцах опухолей геномные делеции имеют тенденцию накапливаться в поздно реплицирующихся регионах, в то время как амплификации — в рано реплицирующихся [21, 22]. Пространственная близость между регионами с похожим временем репликации может влиять на транслокации и сайты перестройки в геноме [21, 23]. Это подтверждается тем, что во многих злокачественных клетках регионы, которые компонуются в ядре рядом друг с другом, более подвержены транслокациям, чем более удаленные друг от друга регионы. Поэтому многие повторяющиеся и онкогенные транслокации возникают между регионами с близким временем репликации и местоположением в ядре [24, 25]. Кроме того, сайты повышенной ломкости хромосом являются типичными точками хромосомных разрывов в опухолях, и их нестабильность часто наблюдается на ранних стадиях

канцерогенеза [26]. Поскольку часть генов, ассоциируемых с канцерогенезом, расположена внутри сайтов повышенной ломкости, их нестабильность может напрямую дерегулировать некоторые онкоген/опухоль-супрессорные функции [26]. Следовательно, время ДНК-репликации не только оказывает влияние на скорость мутагенеза, но также может смещать положение точек разрыва перестроек.

Таким образом, ДНК-репликация — жестко регулируемый процесс. Для большей части генома гомологичные локусы реплицируются в фазе S одновременно и четко скоординированно. Исключения из этого правила — локусы, которые имеют моноаллельную экспрессию генов. Аллельные копии моноаллельно экспрессирующихся генов реплицируются асинхронно, причем активная копия реплицируется раньше, чем инактивированная. Это свойство установлено для всех известных моноаллельно экспрессирующихся генов: импринтинговые гены, примером которых является ген *SNRPN*, локализованный в импринтинговом регионе при синдроме Прадера—Вилли/Ангельмана [27–29]; гены, находящиеся на инактивированной X-хромосоме [30–32]; гены, подвергшиеся аллельному выключению [33–38]. Эта модель репликации очень стабильна в нормальных клетках и независима от транскрипции.

Результаты многочисленных исследований указывают на то, что нарушения во времени репликации часто сопровождают развитие злокачественных новообразований [14, 22, 39–41]. Хотя степень, с которой они влияют на процесс трансформации, все еще не определена, наличие этих изменений при различных типах опухолей свидетельствует о том, что нарушения во времени репликации являются важным компонентом в развитии опухоли и ранним эпигенетическим событием при канцерогенезе [41, 42].

Асинхронная репликация у здоровых лиц и онкологических больных

В 1992 г. S. Selig и соавт. предложили использовать метод интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH) для оценки нарушения синхронности репликации гомологичных генов (асинхронности репликации) в культивированных лимфоцитах периферической крови человека [43]. Анализируемые флуоресцентные сигналы в клетках подразделяются на 2 категории: «S» — единичный сигнал, представляющий собой участок еще не реплицированной ДНК, и «D» — двойной сигнал от реплицированного участка ДНК. Таким образом, часть клеток отражает одинаковый статус репликации: клетки с нереплицированными (SS-клетки) и реплицированными (DD-клетки) аллелями; другая часть клеток отражает асинхронную репликацию, когда в клетке виден один сигнал одинарный, а другой — двойной (SD-клетки).

Сравнительные результаты встречаемости клеток с асинхронной репликацией разных генов, локусов

и центромерных участков хромосом в исследованных группах больных и клинически здоровых лиц с представлением уровня значимости (*p*) найденных различий представлены в таблице.

Работа А. Amiel и соавт. (1997) по изучению асинхронной репликации генов методом I-FISH у онкологических больных была одной из первых. Она выполнена на лимфоцитах периферической крови больных хроническим лимфоцитарным лейкозом и здоровых лиц [44]. Для исследования встречаемости клеток с асинхронной репликацией авторы выбрали ген *TP53*, участвующий в клеточной регуляции, и локус 21q22, который не участвует в клеточной регуляции и не мутирует в клетках больных хроническим лимфоцитарным лейкозом. Результаты проведенного исследования показали, что содержание лимфоцитов с асинхронной репликацией (ЛАР) у здоровых лиц не превышало 14 % как для гена *TP53*, так и для локуса 21q22, тогда как в группе больных этот показатель был в 2 раза больше (см. таблицу). Работа [45] была направлена на изучение клеток с асинхронной репликацией генов *TP53*, *HER2/neu*, *C-MYC* и локуса 21q22 у здоровых лиц, больных хроническим миелоидным лейкозом и больных лимфомами. Авторы провели исследование на клетках костного мозга (озлокачествление большей части которых характерно для хронического миелоидного лейкоза), лимфатических узлов (озлокачествление большей части которых характерно для лимфом) и лимфоцитах периферической крови. Полученные результаты показали, что доля клеток с асинхронной репликацией в группе здоровых лиц для всех изученных генов и локуса как в клетках костного мозга, так и в лимфоцитах в среднем не превышает 12 %. Встречаемость клеток с асинхронной репликацией у больных хроническим миелоидным лейкозом в костном мозге и у больных лимфомами в клетках лимфатических узлов для всех исследованных генов и локуса практически не отличалась и составила около 41 %. Аналогичные результаты получены для больных с солидными опухолями. В 2000 г. Z.A. Dotan и соавт. показали, что в группе больных почечно-клеточными карциномами содержание ЛАР гена *TP53* и локуса 21q22 составило 36 и 44 % соответственно [46]. В контрольной группе этот показатель был 12 и 14 %. В дальнейшем проведены исследования для других генов как у здоровых лиц, так и у онкологических больных. В работах [47, 48] исследовалась встречаемость ЛАР генов *TP53*, *RBI*, *AML1* и *C-MYC* у здоровых лиц, которая не превышала для всех генов 20 %. Для этих же генов показано, что доля ЛАР у больных раком предстательной железы составила около 31 % [49]. Аналогичные данные получены для гена *HER2/neu* у больных раком молочной железы и здоровых лиц — 35 и 14 % соответственно [50]. Таким образом, можно заключить, что встречаемость ЛАР биаллельно экспрессирующихся генов у онкологических больных достоверно повышена по сравнению со здоровыми лицами.

Сравнение встречаемости лимфоцитов с асинхронной репликацией в разных группах с представлением уровня значимости найденных различий
 Comparison of the frequency of lymphocytes with asynchronous replication in various groups and significance level of the differences

Группа сравнения Comparison group	Ген, локус Gene, locus	Лимфоциты с асинхронной репликацией, % Lymphocytes with asynchronous replication, %	p	Ссылка Reference
Больные хроническим лимфоцитарным лейкозом/контроль (л.) Patients with chronic lymphocytic leukemia/control (l.)	<i>TP53</i> , 21q22	28 vs 13 23 vs 10	<0,02	[44]
Больные хроническим миелоидным лейкозом (к. м.), лимфомой (л. у.) /хроническим миелоидным лейкозом (л.), лимфомой (к. м.) /контроль (к. м., л.) Patients with chronic myeloid leukemia (b. m.), lymphoma (l. n.) /chronic myeloid leukemia (l.), lymphoma (b. m.) /control (b. m., l.)	<i>HER2/neu</i> , 21q22, <i>TP53</i> , <i>C-MYC</i>	41 vs 27 vs 12	<0,001	[45]
Больные почечной карциномой/контроль (л.) Patients with renal carcinoma/control (l.)	<i>TP53</i> , 21q22	36 vs 12 44 vs 14	<0,01	[46]
Больные нейрофиброматозом 1-го типа/контроль (л.) Patients with neurofibromatosis type 1/control (l.)	<i>RB1</i> , <i>AML1</i> , <i>C-MYC</i>	33 vs 17 34 vs 17 31 vs 17	<0,001	[47]
Онкогематологические больные/контроль (л.) Oncohematological patients/control (l.)	<i>TP53</i> , <i>AML1</i> , cen17	39 vs 20 42 vs 20 39 vs 20	<0,001	[48]
Больные до аллогенной трансплантации костного мозга/после трансплантации костного мозга (л.) Patients prior to allogenic bone marrow transplantation/after bone marrow transplantation (l.)		36 vs 21 39 vs 20 37 vs 21		
Больные раком предстательной железы/пациенты с гиперплазией предстательной железы (л.) Patients with prostate cancer/patients with prostate hyperplasia (l.)	<i>TP53</i> , <i>AML1</i> , <i>C-MYC</i> , <i>RB1</i> , cen15	33 vs 13 31 vs 13 29 vs 12 32 vs 13 35 vs 14	<0,01	[49]
Культивирование с AZA: рак предстательной железы/гиперплазия предстательной железы (л.) Culture with AZA: prostate cancer/prostate hyperplasia (l.)		18 vs 14 16 vs 14 14 vs 13 10 vs 14 12 vs 14	>0,50	
Больные раком молочной железы/контроль (л.) Patients with breast cancer/control (l.)	<i>HER2/neu</i> , cen17	35 vs 14 25 vs 13	<0,01	[50]
Больные раком яичников/контроль (л.) Patients with ovarian cancer/control (l.)	cen 10, cen 11, cen 17	44 vs 19 39 vs 17 37 vs 19	<0,001	[51]
Онкогематологические больные/контроль (л.) Oncohematological patients/control (l.)	<i>TP53</i> , <i>AML1</i> , <i>RB1</i> , cen15, cen17	40 vs 18 41 vs 19 39 vs 21 45 vs 18 38 vs 21	<0,01	[52]
Культивирование с AZA: больные/контроль (л.) Culture with AZA: patients/control (l.)		22 vs 20 25 vs 22 22 vs 22 22 vs 21 23 vs 21	>0,50	
Больные раком предстательной железы/с гиперплазией предстательной железы (л.) Patients with prostate cancer/with prostate hyperplasia (l.)	<i>RB1</i> , cen15	36 vs 23 38 vs 21	<0,01	[53]
Культивирование с AZA: рак предстательной железы/гиперплазия предстательной железы (л.) Culture with AZA: prostate cancer/prostate hyperplasia (l.)		23 vs 23 24 vs 22	>0,50	

Окончание таблицы
End of table

Группа сравнения Comparison group	Ген, локус Gene, locus	Лимфоциты с асинхронной репликацией, % Lymphocytes with asynchronous replication, %	<i>p</i>	Ссылка Reference
Больные раком печени/циррозом печени/контроль (л.) Patients with liver cancer/liver cirrhosis/control (l.)	cen17	35 vs 19 vs 14	<0,01	[54]
Больные множественной миеломой/моноклональной гаммапатией/контроль (л.) Patients with multiple myeloma/monoclonal gammopathy/control (l.)	<i>TP53</i> , <i>RB1</i> , 21q22	36 vs 20 vs 12 34 vs 20 vs 12 35 vs 20 vs 12	<0,05	[55]
Контроль/больные хроническим гепатитом С без криоглобулинемии/хронический гепатит С с криоглобулинемией/лимфома (л.) Control/patients with chronic hepatitis C without cryoglobulinemia/ chronic hepatitis C with cryoglobulinemia/lymphoma (l.)	<i>TP53</i> , <i>RB1</i> , 21q22	11 vs 15 vs 24 vs 39 10 vs 16 vs 26 vs 42 10 vs 16 vs 25 vs 36	<0,01	[56]
Больные раком предстательной железы/с гиперплазией предстательной железы (л.) Patients with prostate cancer/with prostate hyperplasia (l.)	<i>RB1</i> , <i>AML1</i>	32 vs 20 32 vs 18	<10 ⁻⁷	[57]
Больные полицитемией и эссенциальной тромбоцитемией (без лечения)/полицитемией и эссенциальной тромбоцитемией (с лечением)/контроль (л.) Patients with polycythemia and essential thrombocythemia (without treatment)/polycythemia and essential thrombocythemia (with treatment)/control (l.)	<i>HER2/neu</i> , <i>RB1</i> , <i>C-MYC</i>	20 vs 16 vs 11 21 vs 15 vs 8 22 vs 21 vs 13	<0,05	[58]

Примечание. л. — лимфоциты периферической крови; к. м. — костный мозг; л. у. — лимфоциты, полученные из лимфатических узлов; AZA — 5-азациитидин.

Note. l. — peripheral lymphocytes; b. m. — bone marrow; l. n. — lymphocytes isolated from the lymph nodes; AZA — 5-azacitidine.

В ряде исследований обнаружено, что у онкологических больных α -сателлитные хромосомспецифические участки — центромеры, которые в норме реплицируются синхронно, также реплицируются асинхронно. Встречаемость ЛАР центромерных участков хромосом 10, 11 и 17 у больных раком яичника составила в среднем для каждой хромосомы 41 % против 19 % у здоровых лиц [51]. Аналогичные данные получены для центромерных участков хромосом 15 и 17 у гематологических больных [52] и для центромеры 15 у больных раком предстательной железы [49, 53] и пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой [54]. Авторы отмечают, что нарушение порядка репликации центромерных участков вызывает нарушение расхождения хромосом в митозе, в результате чего увеличивается частота клеток с анеупloidией, что взаимосвязано с процессом малигнизации клеток.

Асинхронная репликация у лиц с предраковыми и раковыми заболеваниями

Большой интерес представляют работы, направленные на сравнительное изучение встречаемости ЛАР биаллельно экспрессирующихся генов, а также центромерных участков хромосом у лиц с предраковыми и раковыми заболеваниями. А. Amiel и соавт. [55] исследовали встречаемость ЛАР в 3 подгруппах: здоровые лица, пациенты с моноклональной гаммапатией (предраковое заболевание, предшествующее множественной миеломе) и больные множественной миеломой. Уста-

новлено, что в пределах ошибки содержание ЛАР для генов *TP53*, *RB1* и локуса 21q22 было практически одинаковым и в изученных подгруппах составило в среднем 12, 20 и 35 % соответственно. При дальнейших исследованиях показано, что в группах здоровых лиц, пациентов с хроническим заболеванием печени, инфицированных вирусом гепатита С, пациентов с хроническим заболеванием печени, инфицированных вирусом гепатита С, с ассоциированной эссенциальной криоглобулинемией (предраковое состояние) и пациентов с фолликулярной лимфомой встречаемость ЛАР генов *TP53*, *RB1* и локуса 21q22 была также практически одинаковой и составила в среднем 10, 16, 25 и 39 % соответственно [56]. О. Reish и соавт. обнаружили, что у больных нейрофиброматозом 1-го типа, имеющих доброкачественные опухоли (нейрофиброма, глиома зрительного нерва и др.) и находящихся в группе риска развития злокачественных опухолей, встречаемость ЛАР генов *RB1*, *AML1* и *C-MYC* оказалась практически одинаковой и составила приблизительно 32 % [47]. В работе [54] показано, что встречаемость ЛАР центромерных участков хромосомы 17 у больных гепатоцеллюлярной карциномой, циррозом печени, имеющих высокий риск развития карциномы, и здоровых лиц составила 35, 19 и 14 % соответственно. Для больных раком предстательной железы, с начальной гиперплазией предстательной железы и хроническим воспалением предстательной железы при исследовании частоты ЛАР гена *AML1* и центромерного участка хромосомы 15 получены ана-

логичные результаты [49]. S. Cytron и соавт. предложили использовать частоту встречаемости ЛАР генов *RB1* и *AML1* как потенциальный неинвазивный маркер, в дополнение к уровню простатического специфического антигена, для ранней диагностики рака предстательной железы, поскольку проведенное сравнительное с результатами биопсии исследование показало 100 % чувствительность и 82 % специфичность теста асинхронной репликации для выявления больных раком предстательной железы [57].

Таким образом, в представленных работах показано, что встречаемость ЛАР генов увеличивается по мере озлокачивания заболеваний. Эта закономерность также обнаружена при исследовании асинхронной репликации гена *TP53* в 3 клеточных линиях молочной железы: нормальной MCF10A, предраковой MCF10AT1 и злокачественной MCF10CA1a [59].

Обратимость асинхронной репликации

Потеря синхронности репликации у онкологических больных — обратимый эпигенетический феномен, связанный в том числе с аномальным метилированием. Первоначально это показано в экспериментах *in vitro*: при культивировании лимфоцитов в присутствии ингибитора метилирования 5-азациитидина (5-azacytidine, AZA) нарушенная программа времени репликации возвращалась к нормальной. В группе онкологических больных исследовалась встречаемость ЛАР генов *TP53*, *RB1* и *AML1* в культурах лимфоцитов периферической крови в присутствии AZA и в качестве контроля без данного ингибитора [52]. Обнаружено, что в культурах лимфоцитов от здоровых лиц присутствие AZA практически не изменяло процентное содержание ЛАР данных генов, которое колебалось в пределах 18–21 %. В культурах клеток от онкологических больных встречаемость ЛАР генов *TP53*, *RB1* и *AML1* без ингибитора варьировала в пределах 39–41 %, а в культурах с AZA — 22–25 %. Аналогичные результаты получены в работе [48]. Тот же эффект установлен для больных раком предстательной железы [49, 53]. На данный момент всего в 2 работах [48, 58] показано снижение доли ЛАР у больных после лечения. A. Amiel и соавт. изучили встречаемость ЛАР генов *RB1*, *HER2/neu* и *C-MYC* у больных миелопролиферативными заболеваниями (полицитемией и эссенциальной тромбоцитемией) до лечения гидроксикарбамидом, тормозящим синтез ДНК, и после него. Установлено, что процентное содержание ЛАР исследованных генов в группе здоровых лиц составляло в среднем 10 %, а в группе больных до лечения и после него — 21 и 16 % соответственно, за исключением гена *C-MYC*, статус репликации которого до лечения и после него оставался на одном уровне [58]. A. Nagler и соавт. изучали встречаемость ЛАР генов *TP53* и *AML1* у здоровых лиц и в группах больных острой миелоидной лейкоемией, хронической миелоидной лейкоемией, острой лимфобластной лейкоемией и неходжкинской лимфомой

до аллогенной трансплантации костного мозга и после нее. Установлено, что у здоровых лиц она составила 20 %, у онкогематологических больных до трансплантации и после нее — 38 и 21 % соответственно [48]. Авторы этой работы сделали заключение, что аберрантная репликация у онкогематологических больных полностью восстанавливается до уровня здоровых лиц после проведенной терапии (аллогенной трансплантации), и данный тест может быть потенциальным эпигенетическим маркером успешности трансплантации.

Заключение

В представленных выше исследованиях изучались отдельные гены и локусы у онкологических больных, поэтому они не давали представления, насколько широко по геному распространена асинхронная репликация. Полногеномное исследование процесса синхронности репликации на клетках костного мозга больных острым лимфобластным лейкозом проведено в работе [42]. Нарушения синхронности репликации в гомологичных аллелях обнаружены во всех хромосомах. Локусы, в которых наблюдались нарушения, были равномерно распределены по геному и типичны для всех исследованных образцов. Это позволило авторам предположить, что нарушение времени репликации в специфических местах является ранним эпигенетическим событием при канцерогенезе. В одной из последних работ, вызвавшей большой интерес и дискуссии в научных кругах, С. Tomasetti и соавт., используя полногеномное секвенирование и биомоделирование, показали, что 2/3 мутаций, связанных с развитием рака, возникают в результате нарушений репликации ДНК [41]. Несмотря на то, что природа феномена нарушения синхронности репликации до конца не известна, большинство авторов исследований, представленных в данном обзоре, связывают это явление с геномной нестабильностью, последующим мутагенезом и канцерогенезом.

Таким образом, рассмотренные работы, направленные на изучение репликации биаллельно экспрессирующихся генов в лимфоцитах периферической крови онкологических больных, демонстрируют, что асинхронная репликация является неспецифическим опухолевым маркером. Она наблюдается как у онкогематологических больных, так и у больных с солидными опухолями, причем не только в клетках опухоли, но и в лимфоцитах периферической крови, что дает потенциальную возможность использовать асинхронную репликацию как молекулярно-генетический маркер для раннего выявления лиц с онкологическими заболеваниями [52]. Кроме того, широкое распространение эпигенетических aberrаций в клетках организма в совокупности с их обратимой природой не только открывает новые терапевтические возможности для разработки противоопухолевых препаратов, способных восстанавливать эпигенетические нарушения, но и может найти применение в качестве одного из индикаторов полного биологического излечения.

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

1. Cancer Biomarkers. Minimal and noninvasive early diagnosis and prognosis. Eds. D. Barh, A. Carpi, M. Verma, M.L. Gunduz. N.-Y.: CRC Press, 2014. P. 929. DOI: 10.1201/b16389.
2. Holdenrieder S., Pagliaro L., Morgenstern D., Dayyani F. Clinically meaningful use of blood tumor markers in oncology. *Biomed Res Int* 2016;2016: 9795269. DOI: 10.1155/2016/9795269. PMID: 28042579.
3. Duffy M.J., O'Donovan N., McDermott E., Crown J. Validated biomarkers: the key to precision treatment in patients with breast cancer. *Breast* 2016;29:192–201. DOI: 10.1016/j.breast.2016.07.009. PMID: 27521224.
4. Залетаев Д.В., Стрельников В.В., Немцова М.В. и др. Структурно-функциональный анализ опухолевых геномов и разработка тест-систем для ранней диагностики, прогноза течения и оптимизации терапии злокачественных новообразований. *Вестник РАМН* 2013;9:7–14. [Zaletaev D.V., Strelnikov V.V., Nemtsov M.V. et al. Structural and functional analysis of tumor genomes and the development of test systems for early diagnosis, prognosis and cancer therapy optimization. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences* 2013;9:7–14. (In Russ.)].
5. Kamel H.F.M., Al-Amadi H.S.A.B. Exploitation of gene expression and cancer biomarkers in paving the path to era of personalized medicine. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2017;15(4):220–35. DOI: 10.1016/j.gpb.2016.11.005. PMID: 28813639.
6. Cree I.A., Charlton P. Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance. *BMC Cancer* 2017;17(1):10. DOI: 10.1186/s12885-016-2999-1. PMID: 28056859.
7. Эпигенетика. Под ред. С.Д. Элписа, Т. Дженювейна, Д. Рейнберга, М.Л. Капаррос. М.: Техносфера, 2010. С. 495. [Epigenetics. Eds. C.D. Allis, T. Jenuwein, D. Reinberg, M.L. Caparros. Moscow: Tekhnosfera, 2010. P. 495. (In Russ.)].
8. Колесникова Т.Д. Механизмы пространственно-временной регуляции репликации. *Молекулярная биология* 2013;47(1):12–37. [Kolesnikova T.D. Regulation of DNA replication timing. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2013;47(1):12–37. (In Russ.)]. DOI: 10.7868/S0026898412060110.
9. Dimitrova D.S., Gilbert D.M. The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1 phase. *Mol Cell* 1999;4(6):983–93. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)80227-0. PMID: 10635323.
10. Sadoni N., Cardoso M.C., Stelzer E.H. et al. Stable chromosomal units determine the spatial and temporal organization of DNA replication. *J Cell Sci* 2004;117 (Pt 22):5353–65. DOI: 10.1242/jcs.01412. PMID: 15466893.
11. Hiratani I., Gilbert D.M. Replication timing as an epigenetic mark. *Epigenetics* 2009;4(2):93–7. DOI: 10.4161/epi.4.2.7772. PMID: 19242104.
12. Pope B.D., Gilbert D.M. The replication domain model: regulating replicon firing in the context of large-scale chromosome architecture. *J Mol Biol* 2013;425(23): 4690–5. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.04.014. PMID: 23603017.
13. Gilbert D.M. Cell fate transitions and the replication timing decision point. *J Cell Biol* 2010;191(5):899–903. DOI: 10.1083/jcb.201007125. PMID: 21115801.
14. Reddy K.L., Feinberg A.P. Higher order chromatin organization in cancer. *Semin Cancer Biol* 2013;23(2):109–15. DOI: 10.1016/j.semcancer.2012.12.001. PMID: 23266653.
15. Loupart M., Krause S., Heck M.S. Aberrant replication timing induces defective chromosome condensation in *Drosophila* ORC2 mutants. *Curr Biol* 2000;10(24):1547–56. DOI: 10.1016/S0960-9822(00)00844-7. PMID: 11137005.
16. Pflumm M.F., Botchan M.R. Orc mutants arrest in metaphase with abnormally condensed chromosomes. *Development* 2001;128(9):1697–707. PMID: 11290306.
17. Breger K.S., Smith L., Thayer M.J. Engineering translocations with delayed replication: evidence for cis control of chromosome replication timing. *Hum Mol Genet* 2005;14(19):2813–27. DOI: 10.1093/hmg/ddi314. PMID: 16115817.
18. Chang B.H., Smith L., Huang J., Thayer M.J. Chromosomes with delayed replication timing lead to checkpoint activation, delayed recruitment of Aurora B and chromosome instability. *Oncogene* 2007;26(13):1852–61. DOI: 10.1038/sj.onc.1209995. PMID: 17001311.
19. Lang G.I., Murray A.W. Mutation rates across budding yeast chromosome VI are correlated with replication timing. *Genome Biol Evol* 2011;3:799–811. DOI: 10.1093/gbe/evr054. PMID: 21666225.
20. Donley N., Stoffregen E.P., Smith L. et al. Asynchronous replication, mono-allelic expression, and long range Cis-effects of ASAR6. *PLoS Genet* 2013;9(4):e1003423. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003423. PMID: 23593023.
21. De S., Michor F. DNA replication timing and long-range DNA interactions predict mutational landscapes of cancer genomes. *Nat Biotechnol* 2011;29(11):1103–8. DOI: 10.1038/nbt.2030. PMID: 22101487.
22. Woo Y.H., Li W.H. DNA replication timing and selection shape the landscape of nucleotide variation in cancer genomes. *Nat Commun* 2012;3:1004. DOI: 10.1038/ncomms1982. PMID: 22893128.
23. Soutoglou E., Misteli T. On the contribution of spatial genome organization to cancerous chromosome translocations. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2008;(39):16–9. DOI: 10.1093/jncimonographs/lgn017. PMID: 18647996.
24. Engreitz J.M., Agarwala V., Mirny L.A. Three-dimensional genome architecture influences partner selection for chromosomal translocations in human disease. *PLoS One* 2012;7(9):e44196. DOI: 10.1371/journal.pone.0044196. PMID: 23028501.
25. Meaburn K.J., Misteli T., Soutoglou E. Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol* 2007;17(1):80–90. DOI: 10.1016/j.semcancer.2006.10.008. PMID: 17137790.
26. Ozeri-Galai E., Bester A.C., Kerem B. The complex basis underlying common fragile site instability in cancer. *Trends Genet* 2012;28(6):295–302. DOI: 10.1016/j.tig.2012.02.006. PMID: 22465609.
27. Simon I., Tenzen T., Reubinoff B.E. et al. Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. *Nature* 1999;401(6756):929–32. DOI: 10.1038/44866. PMID: 10553911.
28. Gunaratne P.H., Nakao M., Ledbetter D.H. et al. Tissue-specific and allele-specific replication timing control in the imprinted human Prader-Willi syndrome region. *Genes Dev* 1995;9(7):808–20. DOI: 10.1101/gad.9.7.808. PMID: 7705658.
29. LaSalle J.M., Lalande M. Domain organization of allele-specific replication within the GABRB3 gene cluster requires a biparental 15q11–13 contribution. *Nat Genet* 1995;9(4):386–94. DOI: 10.1038/ng0495-386. PMID: 7795644.
30. Torchia B.S., Call L.M., Migeon B.R. DNA replication analysis of FMR1, XIST, and factor 8C loci by FISH shows nontranscribed X-linked genes replicate late. *Am J Hum Genet* 1994;55(1):96–104. PMID: 8023856.
31. Yeshaya J., Shalgi R., Shohat M., Avivi L. FISH-detected delay in replication timing

- of mutated FMR1 alleles on both active and inactive X-chromosomes. *Hum Genet* 1999;105(1–2):86–97. DOI: 10.1007/s004399900081. PMID: 10480360.
32. Koren A., McCarroll S.A. Random replication of the inactive X chromosome. *Genome Res* 2014;24(1):64–9. DOI: 10.1101/gr.161828.113. PMID: 24065775.
 33. Goldmit M., Bergman Y. Monoallelic gene expression: a repertoire of recurrent themes. *Immun Rev* 2004;200(1):197–214. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00158.x. PMID: 15242406.
 34. Chess A., Simon I., Cedar H., Axel R. Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 1994;78(5):823–34. DOI: 10.1016/S0092-8674(94)90562-2. PMID: 8087849.
 35. Mostoslavsky R., Singh N., Tenzen T. et al. Asynchronous replication and allelic exclusion in the immune system. *Nature* 2001;414(6860):221–5. DOI: 10.1038/35102606. PMID: 11700561.
 36. Ensminger A.W., Chess A. Coordinated replication timing of monoallelically expressed genes along human autosomes. *Hum Mol Genet* 2004;13(6):651–8. DOI: 10.1093/hmg/ddh062. PMID: 14734625.
 37. Gribnau J., Hochedlinger K., Hata K. et al. Asynchronous replication timing of imprinted loci is independent of DNA methylation, but consistent with differential subnuclear localization. *Genes Dev* 2003;17(6):759–3. DOI: 10.1101/gad.1059603. PMID: 12651894.
 38. Bergman Y., Cedar H. A stepwise epigenetic process controls immunoglobulin allelic exclusion. *Nat Rev Immun* 2004;4(10):754–61. DOI: 10.1038/nri1458. PMID: 15459667.
 39. Donley N., Thayer M.J. DNA replication timing, genome stability and cancer: late and/or delayed DNA replication timing is associated with increased genomic instability. *Semin Cancer Biol* 2013;23(2):80–9. DOI: 10.1016/j.semcancer.2013.01.001. PMID: 23327985.
 40. Liu L., De S., Michor F. DNA replication timing and higher-order nuclear organization determine single-nucleotide substitution patterns in cancer genomes. *Nat Commun* 2013;4:1502. DOI: 10.1038/ncomms2502. PMID: 23422670.
 41. Tomasetti C., Li L., Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* 2017;355(6331):1330–4. DOI: 10.1126/science.aaf9011. PMID: 28336671.
 42. Ryba T., Battaglia D., Chang B.H. et al. Abnormal developmental control of replication-timing domains in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genome Res* 2012;22(10):1833–44. DOI: 10.1101/gr.138511.112. PMID: 22628462.
 43. Selig S., Okumura K., Ward D.C., Cedar H. Delineation of DNA replication time zones by fluorescence *in situ* hybridization. *EMBO J* 1992;11(3):1217–25. DOI: 10.1016/0962-8924(92)90032-I. PMID: 1547781.
 44. Amiel A., Litmanovitch T., Gaber E. et al. Asynchronous replication of p53 and 21q22 loci in chronic lymphocytic leukemia. *Hum Genet* 1997;101(2):219–22. DOI: 10.1007/s004390050619. PMID: 9402974.
 45. Amiel A., Litmanovitch T., Lishner M. et al. Temporal differences in replication timing of homologous loci in malignant cells derived from CML and lymphoma patients. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;22(3):225–31. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2264(199807)22:3<225::AID-GCC8>3.0.CO;2-Y. PMID: 9624534.
 46. Dotan Z.A., Dotan A., Litmanovitch T. et al. Modification in the inherent mode of allelic replication in lymphocytes of patients suffering from renal cell carcinoma: a novel genetic alteration associated with malignancy. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27(3):270–7. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2264(200003)27:3<270::AID-GCC7>3.0.CO;2-7. PMID: 10679916.
 47. Reish O., Orlovski A., Mashevich M. et al. Modified allelic replication in lymphocytes of patients with neurofibromatosis type I. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;143(2):133–9. DOI: 10.1016/S0165-4608(02)00858-0. PMID: 12781447.
 48. Nagler A., Cytron S., Mashevich M. et al. The aberrant asynchronous replication – characterizing lymphocytes of cancer patients – is erased following stem cell transplantation. *BMC Cancer* 2010;10(1):230. DOI: 10.1186/1471-2407-10-230. PMID: 20497575.
 49. Dotan Z.A., Dotan A., Ramon J., Avivi L. Altered mode of allelic replication accompanied by aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of prostate cancer patients. *Int J Cancer* 2004;111(1):60–6. DOI: 10.1002/ijc.20237. PMID: 15185343.
 50. Grinberg-Rashi H., Cytron S., Gelman-Kohan Z. et al. Replication timing aberrations and aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients. *Neoplasia* 2010;12(8):668–74. DOI: 10.1593/neo.10568. PMID: 20689761.
 51. Litmanovitch T., Altaras M.M., Dotan A., Avivi L. Asynchronous replication of homologous alpha-satellite DNA loci in man is associated with nondisjunction. *Cytogenet Cell Genet* 1998;81(1):26–35. DOI: 10.1159/000015003. PMID: 9691171.
 52. Korenstein-Ilan A., Amiel A., Lalezari S. et al. Allele-specific replication associated with aneuploidy in blood cells of patients with hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;139(2):97–103. DOI: 10.1016/S0165-4608(02)00610-6. PMID: 12550768.
 53. Dotan Z.A., Dotan A., Ramon J., Avivi L. Aberrant allele-specific replication, independent of parental origin, in blood cells of cancer patients. *BMC Cancer* 2008;8(1):390. DOI: 10.1186/1471-2407-8-390. PMID: 19109880.
 54. Hanna M.O., Zayed N.A., Darwish H., Girgis S.I. Asynchronous DNA replication and aneuploidy in lymphocytes of hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Genet* 2012;205(12):636–43. DOI: 10.1016/j.cancergen.2012.10.006. PMID: 23182962.
 55. Amiel A., Kirgner I., Gaber E. et al. Replication pattern in cancer: asynchronous replication in multiple myeloma and in monoclonal gammopathy. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;108(1):32–7. DOI: 10.1016/S0165-4608(98)00107-1. PMID: 9973921.
 56. Amiel A., Kitay-Cohen Y., Fejgin M.D., Lishner M. Replication status as a marker for predisposition for lymphoma in patients with chronic hepatitis C with and without cryoglobulinemia. *Exp Hematol* 2000;28(2):156–60. DOI: 10.1016/S0301-472X(99)00140-X. PMID: 10706071.
 57. Cytron S., Stepanov E., Bounkin I. et al. Epigenetic analyses in blood cells of men suspected of prostate cancer predict the outcome of biopsy better than serum PSA levels. *Clin Epigenetics* 2011;2(2):383–8. DOI: 10.1007/s13148-011-0029-3. PMID: 21949550.
 58. Amiel A., Elis A., Maimon O. et al. Replication status in leukocytes of treated and untreated patients with polycythemia vera and essential thrombocythosis. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;133(1):34–8. DOI: 10.1016/S0165-4608(01)00560-X. PMID: 11890987.
 59. Fritz A., Sinha S., Marella N., Berezney R. Alterations in replication timing of cancer-related genes in malignant human breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2013;114(5):1074–83. DOI: 10.1002/jcb.24447. PMID: 23161755.

Вклад авторов

Г.Ф. Михайлова: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи;

В.В. Цепенко, Т.Г. Шкаврова, Е.В. Голуб: обзор публикаций по теме статьи, анализ данных; каждый соавтор готовил материалы по определенному разделу статьи.

Authors' contributions

G.F. Mikhailova: developing the research design, article writing;

V.V. Tsepenko, T.G. Shkavrova, E.V. Goloub: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data; each co-author prepared materials on a certain section of the article.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 10.01.2018. **Принята к публикации:** 28.02.2018.

Article received: 10.01.2018. **Accepted for publication:** 28.02.2018.

Таргетная жидкостная биопсия посредством «обогащенной» полимеразной цепной реакции и анализа плавления ДНК

И.В. Ботезату¹, И.О. Панчук¹, А.А. Коломейцева², А.А. Феденко², Н.Н. Мазуренко¹, И.В. Цыганова¹,
О.Ю. Сусова¹, В.Н. Кондратова¹, В.П. Шелепов¹, А.В. Лихтенштейн¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²НИИ клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анатолий Владимирович Лихтенштейн alicht@mail.ru

Цель исследования — оценка возможности применения высокочувствительного метода «обогащенной» полимеразной цепной реакции с последующим анализом плавления ДНК (DNA melting analysis) (ПЦР-DMA) для таргетной жидкостной биопсии у онкологических больных.

Материалы и методы. Метод ПЦР-DMA использовали для мутационного сканирования онкогена KRAS (кодона 12 и 13) в опухолевой ткани и в плазме крови 20 больных колоректальным раком.

Результаты. Активированный онкоген обнаружен у 16 больных в самой опухоли и у 5 из них — в плазме крови (подтверждено секвенированием). В опухоли и плазме крови еще 2 больных при «обогащенной» ПЦР-DMA выявлено присутствие мутантных аллелей, но в крайне низкой концентрации, не позволявшей их идентифицировать методом Сэнгера. Таким образом, таргетная жидкостная биопсия в предлагаемом варианте оказалась успешной у 7 (~35 %) из 20 исследованных больных. С учетом того факта, что анализ плазмы крови пациентов проводили после многократных лечебных процедур, вызывающих массовую гибель опухолевых клеток, реальная эффективность данного метода может оказаться существенно выше.

Ключевые слова: жидкостная биопсия, сканирование мутаций, плавление ДНК, KRAS

Для цитирования: Ботезату И.В., Панчук И.О., Коломейцева А.А. и др. Таргетная жидкостная биопсия посредством «обогащенной» полимеразной цепной реакции и анализа плавления ДНК. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(1):35–42.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-1-35-42

Target liquid biopsy using “enriched” polymerase chain reaction and DNA melting analysis

I.V. Botezatu¹, I.O. Panchuk¹, A.A. Kolomeytseva², A.A. Fedenko², N.N. Mazurenko¹, I.V. Tsyganova¹, O.Yu. Susova¹,
V.N. Kondratova¹, V.P. Shelepov¹, A.V. Lichtenstein¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Research Institute of Clinical Oncology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Objective: to evaluate the possibility of using a highly sensitive method of “enriched” polymerase chain reaction followed by DNA melting analysis (PCR-DMA) for target liquid biopsy of cancer patients.

Materials and methods. The “enriched” PCR-DMA was used for mutation scanning of KRAS (codons 12 and 13) in tumor and blood plasma of 20 patients with colorectal cancer.

Results. Activated oncogene was found in tumor tissue of 16 patients and in blood plasma of 5 patients (confirmed by sequencing). Mutant KRAS alleles were also found in tumor and plasma of another 2 patients, but in very low concentrations that did not allow their validation by Sanger sequencing. Thus, in our study the target liquid biopsy was successful in ~35 % patients. Since the plasma tests were carried out after repeated medical procedures causing mass death of tumor cells, the actual efficiency of this approach may appear significantly higher.

Key words: liquid biopsy, mutation scanning, DNA melting analysis, KRAS

For citation: Botezatu I.V., Panchuk I.O., Kolomeytseva A.A. et al. Target liquid biopsy using “enriched” polymerase chain reaction and DNA melting analysis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2018;5(1):35–42.

Введение

Успехи клеточной и молекулярной биологии последнего времени имели следствием появление так называемой трансляционной медицины, призванной внедрять фундаментальные открытия в клиническую практику [1–11]. Одним из ее наиболее активно развиваемых направлений является жидкостная биопсия — обнаружение в биологических жидкостях организма (преимущественно в плазме крови) генетических маркеров опухолевого роста (мутантных и абберрантно метилированных ДНК, специфических РНК и микроРНК). Таким способом удастся прогнозировать течение заболевания (в частности, появление рецидивов и метастазов), осуществлять мониторинг роста опухоли, определять тактику индивидуализированного лечения и оценивать его эффективность. Кроме того, жидкостная биопсия позволяет в ряде случаев следить за клоновой эволюцией опухоли и соответственно корректировать лечение.

Для выявления мутантных генов применяют 2 метода, каждый из которых существует в разных вариантах: массовое параллельное секвенирование [1–10] и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) [12–16]. Первый метод, требующий высокотехнологичного оборудования и биоинформационных ресурсов, востребован в активно проводимых сегодня и далеких от завершения фундаментальных исследованиях мутагенеза во множестве образцов рака одного определенного типа. Так идентифицируют «ядерный» набор мутаций, присутствующих данному типу опухоли и ее клеточным клонам. Это важно как теоретически (для выяснения механизмов канцерогенеза), так и практически (для генодиагностики рака).

Второй метод, быстрый и экономный, используется для таргетного выявления в опухоли конкретного больного какой-либо из уже охарактеризованных мутаций, на присутствие которой клиницист должен оперативно реагировать [16]. В этой ситуации приоритетными становятся реализуемость метода в условиях клинической лаборатории, его простота и производительность. Но все же главной характеристикой, определяющей возможность применения метода для жидкостной биопсии, считается его чувствительность (предел обнаружения мутантных аллелей). Дело в том, что циркулирующие в крови внеклеточные «опухолевые» ДНК, являясь многообещающими диагностическими и прогностическими маркерами, крайне трудны для анализа: их концентрация в плазме крови низка и варьирует в широких пределах (в среднем 5–20 нг/мл) [17, 18], они сильно фрагментированы и, кроме того, разбавлены большим избытком ДНК дикого типа.

В наибольшей степени удовлетворяет условиям клинического применения метод DMA (DNA melting analysis, анализ плавления ДНК) [19, 20]. Ранее мы показали, что флуоресцентные зонды TaqMan в дополнение к уже известным их функциям (мониторингу в реальном времени ПЦР и плавления ДНК) также мо-

гут служить блокирующими агентами, избирательно подавляющими амплификацию аллелей дикого типа. Основанный на этом наблюдении протокол «обогащенной» ПЦР-DMA обеспечивает значительное повышение чувствительности мутационного сканирования генов *NRAS* и *BRAF* [21]. Достигнутый уровень чувствительности этого подхода позволял надеяться на его применимость в качестве экспресс-метода жидкостной биопсии. Для выяснения этой принципиальной возможности мы избрали в качестве объекта исследования ген *KRAS* (кодоны 12 и 13), являющийся одним из наиболее значимых онкомаркеров [22–26].

Материалы и методы

Клинические образцы. Образцы крови и опухолевой ткани 20 больных раком толстой кишки (стадии Т3 и Т4) были получены в отделении химиотерапии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Средний возраст больных составил 58 лет (31–84 года).

Выделение ДНК из формализированной ткани, заключенной в парафиновые блоки, проводили посредством депротеинизации протеиназой К опухолевых клеток после макродиссекции депарафинизированных срезов, как описано ранее [23].

Выделение ДНК из плазмы крови. Венозную кровь (5 мл) собирали в пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА). Плазму крови отделяли центрифугированием при комнатной температуре в течение 10 мин при 1000g и повторно — в течение 10 мин при 16 000g (аликвоты хранили при температуре –60 °С). Плазму крови (1 мл) инкубировали в течение ночи при температуре 50 °С в присутствии 500 мкг/мл протеиназы К и 1 % саркозила в 10 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 5 мМ ЭДТА (конечные концентрации), после чего депротеинизировали фенолом и хлороформом до исчезновения интерфазы. ДНК концентрировали преципитацией этанолом в присутствии гликогена (20 мкг/мл) и растворяли в 50 мкл буфера TE. Концентрацию нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, США).

Секвенирование обеих нитей ампликона осуществляли методом Сэнгера (Синтол, Россия).

Праймеры и зонды. Термодинамические расчеты T_m праймеров и зондов ампликона K2 размером 116 пар оснований (п. о.) гена *KRAS* (Genbank Acc.No.: NG_007524.1) проводили с помощью программы MeltCalc [27], а их последовательности определяли с использованием программы Vector NTI Advance 10 (Invitrogen Corp., США) (табл. 1). Схема ампликона K2-116 представлена на рис. 1. Зонды TaqMan «сдвинуты» друг относительно друга (перекрывание — 12 п. о.) для того, чтобы их взаимодействие не препятствовало гибридизации с одонитевыми ампликонами.

Асимметричная ПЦР-DMA (стандартные условия) [19, 20]. Образцы ДНК анализировали в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories,

США) [20, 28]. Инкубационная смесь (25 мкл) содержала 50 мМ Трис-НСl (рН 8,8); 50 мМ КCl; 0,01 % Tween-20; 3 мМ MgCl₂; 0,25 мМ каждого из дезокси-нуклеозидтрифосфатов; прямой и обратный праймеры в соотношении 1:10 или 10:1 (т. е. 0,04 мкМ/0,4 мкМ или 0,4 мкМ/0,04 мкМ) в зависимости от необходимости синтезировать антисмысловую или смысловую нить ампликона соответственно; 0,2 мкМ соответствующего зонда TaqMan; 1,25 единицы Hot-rescue Taq-полимеразы (Синтол, Россия); 5 мкл раствора ДНК в воде. На реакцию смесь наслаивали 2 капли минерального масла. Условия ПЦР: начальная денатурация — 5 мин при температуре 95 °С, затем 55 циклов — 13 с при 95 °С, 15 с при 57 °С и 20 с при 72 °С (флуоресценцию регистрировали при температуре 72 °С). После завершения ПЦР ее продукты прогревали в течение 1 мин при 95 °С, 2 мин при 55 °С, после чего повышали температуру от 55 до 85 °С с шагом 0,4 °С (выдержка 6 с). Данные анализировали с помощью программы Bio-Rad CFX Manager (version 1.6), в ряде случаев их экспортировали в Microsoft Excel, пики плавления нормализовали по отношению к их максимальному значению, принятому за 100 %.

Асимметричная «обогащенная» ПЦР-DMA (субоптимальные условия) [21]. Образцы ДНК анализировали в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США), как описано ранее [21], с некоторыми модификациями. Инкубационная смесь (25 мкл) содержала 50 мМ Трис-НСl (рН 8,8); 50 мМ КCl; 0,01 % Tween-20; 3 мМ MgCl₂; 0,25 мМ каждого из дезокси-нуклеозидтрифосфатов; 0,2 × EvaGreen (Biotium, США); прямой и обратный праймеры в соотношении 1:15 или 15:1 (т. е. 0,027 мкМ/0,4 мкМ или 0,4 мкМ/0,027 мкМ); по 0,36 мкМ зондов K2-ROX(25)s и K2-Cy5(25)as; 0,63 и 0,44 единицы Hot-rescue Taq-полимеразы (Синтол, Россия) для синтеза антисмысловой и смысловой нитей ампликона соответственно; 5 мкл раствора ДНК в воде. На реакцию смесь наслаивали 2 капли минерального масла. Условия ПЦР: начальная денатурация — 5 мин при температуре 95 °С, затем 80–100 циклов — 13 с при 95 °С, 1 с при 57 °С с регистрацией флуоресценции. После завершения ПЦР ее продукты прогревали в течение 1 мин при 95 °С, затем 2 мин при 55 °С, после чего повышали температуру от 55 до 85 °С с шагом 0,4 °С (выдержка 6 с). В ходе асимметричной «обогащенной» ПЦР оба присутствующих в инкубаци-

онной среде зонда TaqMan функционируют как индикаторы амплификации в реальном времени и как блокирующие агенты, тогда как в постамплификационном плавлении ДНК участвует только один из них, комплементарный односторонней (избыточной) ДНК.

Таблица 1. Праймеры и зонды ампликона K2 размером 116 пар оснований гена KRAS

Table 1. Primers and probes of 116 base pair K2 amplicon of the KRAS gene

Ампликон K2 (кодоны 12, 13) K2 amplicon (codons 12, 13)	Последовательность Sequence
Праймер: Primer:	
прямой forward	5'-aggcctgctgaaatgactg
обратный reverse	5'-ttggatcatattcgccacaa
Зонд (sense, antisense): Probe (sense, antisense):	
K2-ROX(25)s	5'-ROX-cttggtgtagtggagctggtggcg-BHQ2
K2-Cy5(25)as	5'-Cy5-aaggcactcttgctacgccaccag-BHQ2

Результаты и обсуждение

Сопоставление стандартной и «обогащенной» ПЦР-DMA. За амплификацией в реальном времени следят, как правило, с помощью флуоресцентных зондов TaqMan, расщепляемых 5'-экзонуклеазной активностью Taq-полимеразы (это ведет к пространственному разобщению флуорофора и гасителя и росту флуоресценции, сопряженному с накоплением продукта). Устранение полимеразой лежащего на ее пути препятствия (в виде гибридного с матрицей зонда) сопряжено со снижением синтетической активности этого фермента [29]. Данное обстоятельство использовано нами для преимущественной амплификации мутантного аллеля (из-за неспаренных оснований его гибрид с зондом менее стабилен, чем гибрид аллеля дикого типа). В стандартных (оптимальных) условиях ПЦР незначительные различия в стабильности комплексов зонд/аллель не оказывают заметного влияния на ход реакции, однако в специально подобранных субоптимальных условиях (снижение концентрации фермента и температуры отжига, присутствие в инкубационной

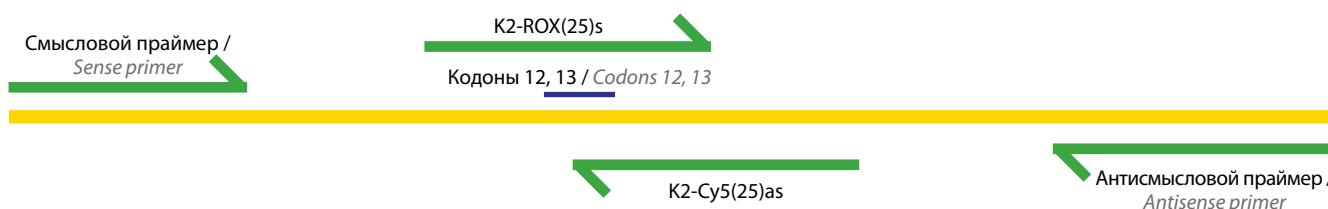


Рис. 1. Схема ампликона K2-116 (название произведено от гена KRAS, номера экзона и размера ампликона, п. о.). Стрелками указаны расположение и ориентация праймеров и зондов TaqMan, а также анализируемый «горячий» участок (кодоны 12 и 13)

Fig. 1. Amplicon K2-116 diagram (the name was derived from the KRAS gene, exon number, and amplicon size, bp). Arrows show locations and orientation of TaqMan primers and probes as well as the analyzed "hot" fragment (codons 12 and 13)

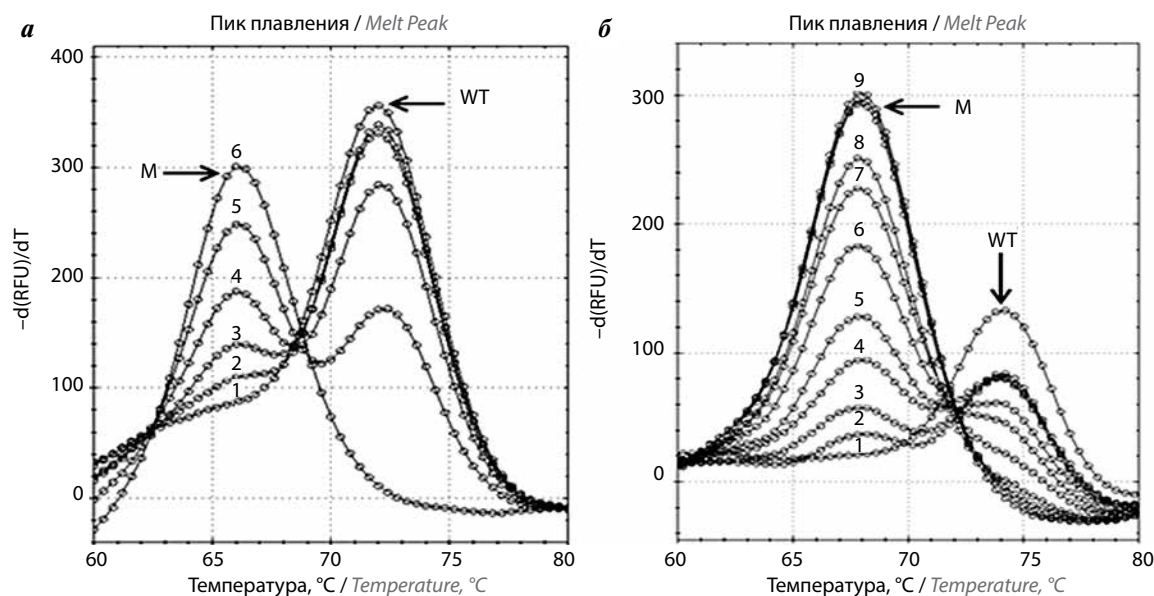


Рис. 2. Сравнение чувствительности определения мутантных аллелей *KRAS*. ДНК клеток SW480 (мутация *KRAS* – GGT12GTT) подвергали серийным разведениям в интактной ДНК (пики плавления аллелей дикого типа (WT) и мутантных (M) обозначены стрелками): а – стандартная полимеразная цепная реакция (ПЦР) с последующим анализом плавления ДНК (DNA melting analysis, DMA); кривые плавления образцов ДНК с разным содержанием мутантного аллеля: 1 – 0 %, 2 – 6 %, 3 – 12 %, 4 – 25 %, 5 – 50 %, 6 – 100 %; б – «обогащенная» ПЦР-DMA; кривые плавления образцов ДНК с разным содержанием мутантного аллеля: 1 – 0 %, 2 – 0,2 %, 3 – 0,4 %, 4 – 0,8 %, 5 – 1,6 %, 6 – 3,0 %, 7 – 6,0 %, 8 – 12,0 %, 9 – 25–100 %. Пределы обнаружения мутантных аллелей *KRAS* стандартной и «обогащенной» ПЦР-DMA составляют ~6 и 0,2–0,4 % соответственно. $-d(RFU)/dT$ – отрицательная первая производная изменений флуоресценции по температуре

Fig. 2. Sensitivity comparison for detection of mutant *KRAS* alleles. SW480 cell DNA (*KRAS* mutation GGT12GTT) were serially diluted in intact DNA (arrows show melting peaks for wild type (WT) and mutant (M) alleles): а – standard polymerase chain reaction (PCR) with subsequent DNA melting analysis (DMA); melting curves for DNA samples with different content of the mutant allele: 1 – 0 %, 2 – 6 %, 3 – 12 %, 4 – 25 %, 5 – 50 %, 6 – 100 %; б – «enriched» PCR-DMA; melting curves for DNA samples with different content of the mutant allele: 1 – 0 %, 2 – 0,2 %, 3 – 0,4 %, 4 – 0,8 %, 5 – 1,6 %, 6 – 3,0 %, 7 – 6,0 %, 8 – 12,0 %, 9 – 25–100 %. Detection limits for mutant *KRAS* alleles in standard and «enriched» PCR-DMA are ~6 and 0.2–0.4 % respectively. $-d(RFU)/dT$ – negative first derivative of fluorescence changes with respect to temperature

среде обоих зондов, укороченные циклы амплификации) эти различия становятся существенными, что позволяет дискриминировать интактные и мутантные аллели. Разработанный на этой основе прием «обогащения» значительно повышает чувствительность мутационного сканирования генов *BRAF* и *NRAS*, как показано нами ранее [21].

В данном исследовании «обогащенную» ПЦР-DMA применили для мутационного сканирования *KRAS*. В опытах серийных разведений мутантной ДНК клеток SW480 (мутация *KRAS* – GGT12GTT) [30] в ДНК дикого типа была подтверждена на порядок более высокая по сравнению со стандартной процедурой чувствительность данного подхода (предел обнаружения мутантных аллелей 3–6 и 0,2–0,5 % соответственно) (рис. 2).

Выявление мутантного *KRAS* в опухолевой ткани и плазме крови. Для анализа использовали образцы ДНК из опухолевой ткани (парафиновые блоки) и плазмы крови 20 больных колоректальным раком. Поскольку целью работы было выяснение, достаточно ли в принципе чувствительность DMA для жидкостной биопсии, в группу исследованных больных вошли лица с распространенными опухолями, в которых присутствие мутантного *KRAS* было наиболее вероятно (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика больных ($n = 20$)

Table 2. Patient characteristics ($n = 20$)

Показатель Characteristic	<i>n</i>
Пол: Sex:	
мужской male	8
женский female	12
Стадия заболевания: Disease stage:	
Tis	1
T3	10
T4	8
не идентифицирована not identified	1
Локализация опухоли: Tumor localization:	
слепая кишка cesum	1
сигмовидная кишка sigmoid colon	3
ободочная кишка colon	9
прямая кишка rectum	7

Таблица 3. Выявление мутаций в ДНК опухолевой ткани и плазмы крови

Table 3. Identification of mutations in tumor and plasma DNA

№ больного Patient No.	Локализация опухоли Tumor localization	Стадия заболевания Disease stage	ДНК опухоли Tumor DNA		ДНК плазмы крови Plasma DNA	
			Стандартная ПЦР-DMA Standard PCR-DMA	«Обогащенная» ПЦР-DMA “Enriched” PCR-DMA	Стандартная ПЦР-DMA Standard PCR-DMA	«Обогащенная» ПЦР-DMA “Enriched” PCR-DMA
1	Сигмовидная кишка Sigmoid colon	T4N2M1	WT	GGC13AGC	WT	WT
2	Прямая кишка Rectum	T3N2M0	WT	GGC13GAC	WT	WT
3	Прямая кишка Rectum	T4NxM1	WT	GGC13AGC	WT	WT
4	Сигмовидная кишка Sigmoid colon	T4N1M0	WT	GGC13AGC	WT	WT
5	Прямая кишка Rectum	T4N2M0	WT	GGC13GAC	WT	WT
6	Ободочная кишка Colon	T4N1M1	GGC13CGC	GGC13CGC	GGC13CGC	GGC13CGC
7	Прямая кишка Rectum	T3N2M0	GGT12GCT	GGT12GCT	WT	GGT12GCT
8	Ободочная кишка Colon	T4N1M1	WT	WT	WT	WT
9	Ободочная кишка Colon	T3N1M1	GGT12TGT	GGT12TGT	WT	WT
10	Ободочная кишка Colon	T4N0M1	WT	GGC13GAC	WT	WT
11	Ободочная кишка Colon	T3N0M0	WT	GGC13AGC	WT	WT
12	Ободочная кишка Colon	T3NxM1	WT	?	WT	?
13	Ободочная кишка Colon	TXNxM1	WT	WT	WT	WT
14	Прямая кишка Rectum	T4N2M1	WT	GGC13AGC	WT	WT
15	Ободочная кишка Colon	T3N0M0	GGT12GAT	GGT12GAT	WT	WT
16	Ободочная кишка Colon	T3N2M1	WT	?	WT	?
17	Прямая кишка Rectum	T3NxM1	WT	GGC13AGC	WT	WT
18	Слепая кишка Cecum	T3N1M1	GGC13GAC	GGC13GAC	?	GGC13GAC
19	Сигмовидная кишка Sigmoid colon	TisN0M0	GGT12GAT	GGT12GAT	WT	GGT12GAT
20	Прямая кишка Rectum	T3NxM0	GGT12GAT	GGT12GAT	GGT12GAT	GGT12GAT

Примечание. ПЦР-DMA — полимеразная цепная реакция с последующим анализом плавления ДНК (DNA melting analysis); WT (wild type) — дикий тип; GGC13AGC и др. — тип мутации (в данном случае замена G → A в кодоне 13); ? — мутация, выявленная методом плавления ДНК, но не идентифицированная при последующем секвенировании (вследствие недостаточной чувствительности метода секвенирования по Сэнгеру).

Note. PCR-DMA — polymerase chain reaction with subsequent DNA melting analysis; WT — wild type; GGC13AGC et al. — mutation type (here, G → A substitution in codon 13); ? — mutation detected by DNA melting analysis but not identified in subsequent sequencing (due to insufficient sensitivity of Sanger sequencing).

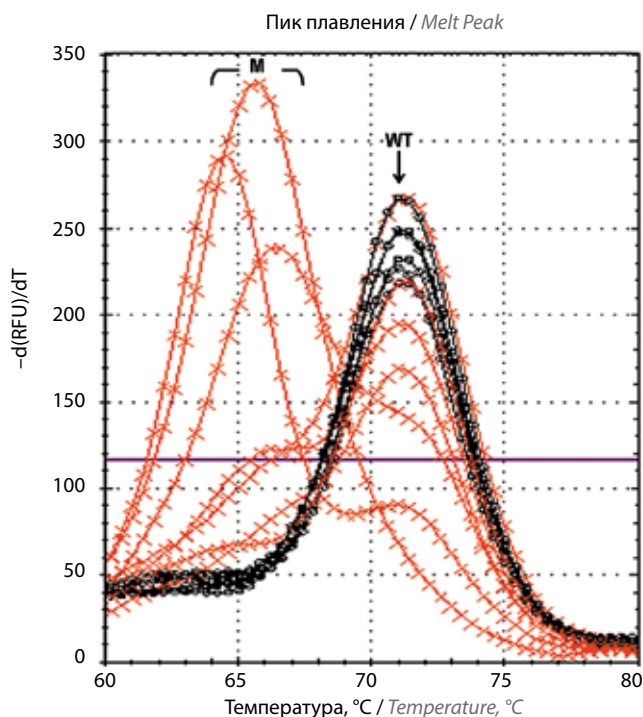


Рис. 3. «Обогащенная» полимеразная цепная реакция с последующим анализом плавления ДНК (DNA melting analysis) образцов ДНК плазмы крови больных колоректальным раком. Образцы ДНК дикого типа (WT) и содержащие мутантные (M) аллели обозначены стрелками. $-d(RFU)/dT$ — отрицательная первая производная изменений флуоресценции по температуре

Fig. 3. “Enriched” polymerase chain reaction with subsequent DNA melting analysis of plasma DNA samples from patient with colorectal cancer. Arrows indicate wild type (WT) DNA samples and mutant (M) alleles. $-d(RFU)/dT$ — negative first derivative of fluorescence changes with respect to temperature

При сравнительном использовании стандартной и «обогащенной» ПЦР-DMA активированный онкоген был обнаружен в ДНК опухолевой ткани соответственно у 7 и 16 больных (табл. 3). Во всех случаях присутствие мутаций подтверждено последующим секвенированием в 2 направлениях методом Сэнгера. Еще у 2 больных «обогащенная» ПЦР-DMA выявила присутствие мутантных аллелей, но в столь низкой концентрации, что чувствительности секвенирования

оказалось недостаточно для их идентификации (предел обнаружения мутантных аллелей секвенированием по Сэнгеру составляет 15–20 %). Обращает на себя внимание тот факт, что в исследованной группе больных необычно высока частота (в 11 из 16 случаев) мутаций *KRAS* в кодоне 13. Это, возможно, объясняется небольшой выборкой больных и случайной флуктуацией (обычно эти мутации составляют ~10 % общего их числа [22, 23]).

Мутантные последовательности *KRAS* обнаружены методом «обогащенной» ПЦР-DMA в плазме крови 5 больных (в упомянутых 2 сомнительных случаях есть основания подозревать мутантный аллель как в самой опухоли, так и в плазме крови, но идентифицировать их методом Сэнгера оказалось технически невозможным). Мутации *KRAS* в опухоли и плазме были неизменно идентичны во всех случаях, когда секвенирование позволяло их сопоставить. На рис. 3 представлены результаты анализа образцов циркулирующей ДНК больных колоректальным раком (соотношение величин пиков плавления дает представление о доле клона мутантных клеток в исследованном клиническом материале). В целом представленные результаты свидетельствуют об адекватности примененного нами подхода поставленной задаче.

Заключение

Таким образом, таргетная жидкостная биопсия посредством «обогащенной» ПЦР и последующего анализа плавления ДНК оказалась успешной у ~35 % исследованных нами больных. С учетом того факта, что анализ плазмы крови пациентов проводили, как правило, после неоднократных лечебных процедур (хирургического вмешательства и циклов химиотерапии), приводящих к элиминации основной массы опухолевых клеток, реальная эффективность данного метода может оказаться значительно выше (необходимо заметить, что временной интервал между взятием образцов опухолевой ткани и крови составлял от нескольких недель до многих месяцев). Планируемое нами наблюдение больных на протяжении длительного времени позволит оценить прогностический и диагностический потенциал нашего подхода.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Adalsteinsson V.A., Ha G., Freeman S.S. et al. Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors. *Nat Commun* 2017;8(1):1324. DOI: 10.1038/s41467-017-00965-y. PMID: 29109393.
2. Chaudhuri A.A., Chabon J.J., Lovejoy A.F. et al. Early detection of molecular residual disease in localized lung cancer by circulating tumor DNA profiling. *Cancer Discov* 2017;7(12):1394–403. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0716. PMID: 28899864.
3. Comino-Mendez I., Turner N. Predicting relapse with circulating tumor DNA analysis in lung cancer. *Cancer Discov* 2017;7(12):1368–70. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-1086. PMID: 29208774.
4. Goodall J., Mateo J., Yuan W. et al. Circulating cell-free DNA to guide prostate cancer treatment with PARP inhibition. *Cancer Discov* 2017;7(9):1006–17. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0261. PMID: 28450425.
5. Kato S., Krishnamurthy N., Banks K.C. et al. Utility of genomic analysis in circulating tumor DNA from patients with carcinoma of unknown primary. *Cancer Res* 2017;77(16):4238–46. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0628. PMID: 28642281.
6. Kis O., Kaedbey R., Chow S. et al. Circulating tumour DNA sequence analysis as an alternative to multiple myeloma bone

- marrow aspirates. *Nat Commun* 2017;8:15086. DOI: 10.1038/ncomms15086. PMID: 28492226.
7. Quigley D., Alumkal J.J., Wyatt A.W. et al. Analysis of circulating cell-free DNA identifies multiclonal heterogeneity of BRCA2 reversion mutations associated with resistance to PARP inhibitors. *Cancer Discov* 2017;7:999–1005. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0146. PMID: 28450426.
 8. Wan J.C.M., Massie C., Garcia-Corbacho J. et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 2017;17(4):223–38. DOI: 10.1038/nrc.2017.7. PMID: 28233803.
 9. Tie J., Wang Y., Tomasetti C. et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016;8(346):346ra92. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf6219. PMID: 27384348.
 10. Narayan A., Carriero N.J., Gettinger S.N. et al. Ultrasensitive measurement of hotspot mutations in tumor DNA in blood using error-suppressed multiplexed deep sequencing. *Cancer Res* 2012;72(14):3492–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4037. PMID: 22581825.
 11. Ponomaryova A.A., Cherdintseva N.V., Bondar A.A. et al. Dynamics of line-1 retrotransposon methylation levels in circulating DNA from lung cancer patients undergoing antitumor therapy. *Mol Biol (Mosk)* 2017;51(4):622–8. DOI: 10.7868/S0026898417040140. PMID: 28900080.
 12. Garcia-Fernandez N., Macher H.C., Rubio A. et al. Detection of p53 mutations in circulating DNA of transplanted hepatocellular carcinoma patients as a biomarker of tumor recurrence. *Adv Exp Med Biol* 2016;924:25–8. DOI: 10.1007/978-3-319-42044-8_5. PMID: 27753013.
 13. Gonzalez-Cao M., Mayo-de-Las-Casas C., Molina-Vila M.A. et al. BRAF mutation analysis in circulating free tumor DNA of melanoma patients treated with BRAF inhibitors. *Melanoma Res* 2015;25(6):486–95. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000187. PMID: 26366702.
 14. Karachaliou N., Mayo-de las Casas C., Queralt C. et al. Association of EGFR L858R mutation in circulating free DNA with survival in the EORTC trial. *JAMA Oncol* 2015;1(2):149–57. DOI: 10.1001/jamaoncol.2014.257. PMID: 26181014.
 15. Thierry A.R., Mouliere F., El Messaoudi S. et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* 2014;20(4):430–5. DOI: 10.1038/nm.3511. PMID: 24658074.
 16. Thierry A.R. A targeted Q-PCR-based method for point mutation testing by analyzing circulating DNA for cancer management care. *Methods Mol Biol* 2016;1392:1–16. DOI: 10.1007/978-1-4939-3360-0_1. PMID: 26843041.
 17. Xu R.H., Wei W., Krawczyk M. et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nat Mater* 2017;16(11):1155–61. DOI: 10.1038/nmat4997. PMID: 29035356.
 18. Bryzgunova O.E., Laktionov P.P. Current methods of extracellular DNA methylation analysis. *Mol Biol (Mosk)* 2017;51(2):195–214. DOI: 10.7868/S0026898417010074. PMID: 28537228.
 19. Huang Q., Liu Z., Liao Y. et al. Multiplex fluorescence melting curve analysis for mutation detection with dual-labeled, self-quenched probes. *PLoS One* 2011;6(4):e19206. DOI: 10.1371/journal.pone.0019206. PMID: 21552536.
 20. Ботезату И.В., Панчук И.О., Строганова А.М. и др. Высокочувствительное сканирование генных мутаций: зонды TaqMan как блокирующие агенты. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(2):42–9. [Botezatu I.V., Panchuk I.O., Stroganova A.M. et al. Highly sensitive scanning of gene mutations: TaqMan probes as blocking agents. *Uspehi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;3(2):42–9. (In Russ.)].
 21. Botezatu I.V., Panchuk I.O., Stroganova A.M. et al. TaqMan probes as blocking agents for enriched PCR amplification and DNA melting analysis of mutant genes. *Biotechniques* 2017;62(2):62–8. DOI: 10.2144/000114515. PMID: 28193149.
 22. Prior I.A., Lewis P.D., Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 2012;72:2457–67. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2612. PMID: 22589270.
 23. Mazurenko N.N., Gagarin I.M., Tsyganova I.V. et al. The frequency and spectrum of KRAS mutations in metastatic colorectal cancer. *Vopr Onkol* 2013;59(6):751–5. PMID: 24624786.
 24. Mouliere F., El Messaoudi S., Gongora C. et al. Circulating cell-free DNA from colorectal cancer patients may reveal high KRAS or BRAF mutation load. *Transl Oncol* 2013;6(3):319–28. PMID: 23730412.
 25. Mouliere F., El Messaoudi S., Pang D. et al. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Mol Oncol* 2014;8(5):927–41. DOI: 10.1016/j.molonc.2014.02.005. PMID: 24698732.
 26. El Messaoudi S., Mouliere F., Du M.S. et al. Circulating DNA as a strong multi-marker prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care. *Clin Cancer Res* 2016;22(12):3067–77. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0297. PMID: 26847055.
 27. Schutz E., von Ahsen N. Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. *Biotechniques* 1999;27(6):1218–22, 1224. PMID: 10631501.
 28. Botezatu I.V., Nechaeva I.O., Stroganova A.M. et al. Asymmetric real-time PCR and multiplex melting curve analysis with TaqMan probes for detecting PIK3CA mutations. *Data Brief* 2015;5:913–7. DOI: 10.1016/j.dib.2015.10.046. PMID: 26702420.
 29. Montgomery J.L., Rejali N., Wittwer C.T. The influence of nucleotide sequence and temperature on the activity of thermostable DNA polymerases. *J Mol Diagn* 2014;16(3):305–13. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2014.01.006. PMID: 24607271.
 30. Capon D.J., Seeburg P.H., McGrath J.P. et al. Activation of Ki-ras2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature* 1983;304(5926):507–13. PMID: 6308467.

Вклад авторов

И.В. Ботезату, И.О. Панчук, В.Н. Кондратова: эксперименты мутационного сканирования;
 А.А. Коломейцева, А.А. Феденко: получение и анализ клинических данных;
 Н.Н. Мазуренко, О.Ю. Сусова: анализ полученных данных;
 И.В. Цыганова: получение данных для анализа;
 В.П. Шелепов: обзор публикаций по теме статьи;
 А.В. Лихтенштейн: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи.

Authors' contributions

I.V. Botezatu, I.O. Panchuk, V.N. Kondratova: mutant scanning experiments;
A.A. Kolomeytseva, A.A. Fedenko: clinical data acquisition and analysis;
N.N. Mazurenko, O.Yu. Susova: analysis of the obtained data;
I.V. Tsyganova: obtaining data for analysis;
V.P. Shelepov: reviewing of publications of the article's theme;
A.V. Lichtenstein: developing the research design, article writing.

ORCID авторов

И.В. Ботезату: <https://orcid.org/0000-0002-0297-4963>
И.О. Панчук: <https://orcid.org/0000-0002-1323-8638>
А.А. Коломейцева: <https://orcid.org/0000-0002-6762-9511>
А.А. Феденко: <https://orcid.org/0000-0003-4927-5585>
В.Н. Кондратова: <https://orcid.org/0000-0003-0614-8789>
В.П. Шелепов: <https://orcid.org/0000-0002-9837-7273>
А.В. Лихтенштейн: <https://orcid.org/0000-0002-0190-5069>

ORCID of authors

I.V. Botezatu: <https://orcid.org/0000-0002-0297-4963>
I.O. Panchuk: <https://orcid.org/0000-0002-1323-8638>
A.A. Kolomeytseva: <https://orcid.org/0000-0002-6762-9511>
A.A. Fedenko: <https://orcid.org/0000-0003-4927-5585>
V.N. Kondratova: <https://orcid.org/0000-0003-0614-8789>
V.P. Shelepov: <https://orcid.org/0000-0002-9837-7273>
A.V. Lichtenstein: <https://orcid.org/0000-0002-0190-5069>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 12.02.2018. **Принята к публикации:** 15.02.2018.

Article received: 12.02.2018. **Accepted for publication:** 15.02.2018.

Распределение генов HLA II у больных раком носоглотки, ассоциированным с вирусом Эпштейна–Барр, и другими опухолями ротовой полости в России

Н.Б. Сеньюта¹, М.Н. Болдырева², Е.В. Гончарова¹, Д.М. Максимович¹, Л.Н. Щербак¹,
Т.Е. Душенькина¹, В.Э. Гурцевич¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России»; Россия, 115478 Москва,
Каширское шоссе, 24, корп. 2

Контакты: Наталья Борисовна Сеньюта nat.senyuta@yandex.ru

Введение. Насофарингеальная карцинома (рак носоглотки, РНГ), как известно, строго ассоциирована с вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ). Однако ВЭБ является убиквитарной инфекцией, тогда как РНГ развивается довольно редко и характеризуется географически и этнически неоднородным распространением, что позволяет предположить важную роль других кофакторов в патогенезе РНГ, таких как окружающая среда и генетическая предрасположенность. Среди известных генетических факторов, ассоциированных с РНГ, главный комплекс гистосовместимости (лейкоцитарный антиген человека, human leukocyte antigen (HLA)) занимает важное положение, так как играет ключевую роль в презентации вирусных антигенов иммунной системы. В России изучение ассоциации аллелей HLA с риском развития РНГ, связанного с ВЭБ, не проводилось, а в литературе существуют противоречивые сведения о роли разных HLA-генов как в возникновении и развитии РНГ, так и в инициации и особенностях иммунного ответа к белкам ВЭБ.

Цель исследования — изучение распределения вариантов DQA1-, DQB1-, DRB1-генов HLA класса II у больных РНГ и пациентов с другими опухолями полости рта (ДОПР), ассоциированными и не ассоциированными с ВЭБ, в группах с высоким и низким уровнем гуморального иммунного ответа к основным белкам ВЭБ по сравнению с контрольной группой здоровых лиц.

Материалы и методы. Всего в исследование вошли 62 больных недифференцированным РНГ и 44 пациента с ДОПР, а также 300 здоровых лиц. Сыворотка крови всех больных была протестирована на наличие антител иммуноглобулинов классов G и A к капсидному и раннему антигенам ВЭБ методом непрямой иммунофлюоресценции. Все образцы генотипированы на HLA-DQA1, -DQB1 и -DRB1 с помощью мультипраймерной амплификации сиквенса-специфическими праймерами методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. Показано увеличение частоты HLA-DRB1*08 у пациентов с РНГ по сравнению с контролем (5,6 % против 1,8 %; отношение шансов (ОШ) 3,2; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,1–9,1; $p = 0,02$). Возможно, ген HLA-DRB1*08 ассоциирован с повышенной чувствительностью к РНГ. В то же время у пациентов с РНГ была выявлена более низкая, чем в контроле, частота HLA-DQB1*0301 (16,1 % против 25,3 %; $p < 0,05$). Вариант HLA-DQB1*0502–4, наоборот, реже встречался у пациентов с ДОПР, чем в контроле (1,1 % против 6,8 %; $p < 0,05$). Аналогичные наблюдения касаются HLA-DRB1*16, частота которого у пациентов с ДОПР была ниже, чем в контроле (1,1 % против 6,7 %; ОШ 0,16; 95 % ДИ 0,01–1,08; $p < 0,05$), т. е. ген HLA-DQB1*0301 ассоциирован с резистентностью к РНГ, а варианты HLA-DQB1*0502–4 и HLA-DRB1*16 – с резистентностью к ДОПР.

Интересен факт обнаружения различий в частоте HLA-DRB1*13 у пациентов с РНГ и ДОПР (17,7 % против 6,8 %; ОШ 2,9; 95 % ДИ 1,1–8,6; $p < 0,05$). Эти различия могут быть связаны с доказанным участием ВЭБ в развитии РНГ. Других различий по частотам генов HLA класса II между группами пациентов с РНГ и ДОПР не выявлено.

Впервые в России проведено изучение связи аллелей DQA1, DQB1 и DRB1 гена HLA с развитием насофарингеальной карциномы (РНГ) и ДОПР, ассоциированных и не ассоциированных с ВЭБ.

Заключение. Наши исследования в совокупности с уже известными данными позволяют заключить, что имеется определенная связь генов HLA класса II с развитием РНГ, однако для установления строгой ассоциации аллелей HLA класса II с РНГ и другими опухолями области головы и шеи полученных сведений недостаточно из-за сложности и вариабельности генетического контроля иммунных реакций, контролирующих опухолевый процесс.

Ключевые слова: рак носоглотки, вирус Эпштейна–Барр, лейкоцитарный антиген человека II класса, ассоциация с опухолевыми заболеваниями носоглотки

Для цитирования: Сеньюта Н.Б., Болдырева М.Н., Гончарова Е.В. и др. Распределение генов HLA II у больных раком носоглотки, ассоциированным с вирусом Эпштейна–Барр, и другими опухолями ротовой полости в России. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(1):43–52.

HLA II genes distribution in Epstein–Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma and other tumors of the oral cavity patients in Russia

N.B. Senyuta¹, M.N. Boldyreva², E.V. Goncharova¹, D.M. Maximovich¹, L.N. Shcherbak¹,
T.E. Dushenkina¹, V.E. Gurtsevitch¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²State Research Center “Institute of Immunology”, Federal Medical-Biological Agency of Russia;
Build. 2, 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. It has been proved that for the nasopharyngeal carcinoma (NPC) the etiological agent is the Epstein–Barr virus (EBV). Being an ubiquitous infection, EBV, under certain conditions, is able to display its oncogenic potential. Among a wide range of tumors associated with EBV, the NPC occupies a special place because it is characterized by a geographically and ethnically heterogeneous distribution, suggesting that in the pathogenesis of NPC, in addition to EBV, an important role is played by other factors, such as genetic predisposition to this neoplasm. Among known genetic factors influencing the frequency of NPC development, the human leukocyte antigen (HLA) complex occupies an important place, as it plays a central role in the presentation of viral antigens to the immune system. In Russia, the association of HLA alleles with the risk of EBV associated forms of NPC development and with development of other oral cavity tumors (OOC), not associated with the virus, has not been studied. In the literature there are contradictory information about HLA genes, which determine the predisposition to the emergence of these tumors, and their role in the initiation and formation an immune response to EBV proteins.

Objective: to study the distribution of the of DQA1-, DQB1-, DRB1-HLA class II gene variants associated with respectively the risk or resistance to the development of NPC and OOC and with a high and low level of antibody response to EBV main proteins. A group of healthy persons served as a control.

Materials and methods. Blood samples from 62 patients with NPC, 44 patients with OOC, and as control, 300 healthy individuals, were used in the study. The blood serum samples of NPC and OOC patients were tested for the presence of immunoglobulin classes G and A antibodies to capsid and early EBV antigens by indirect immunofluorescence. All serum samples of patients and healthy individuals were genotyped on HLA-DQA1-, -DQB1 and -DRB1 by the method of multi-primer amplification by sequence-specific primers by real-time polymerase chain reaction.

Results. In NPC patients, an increase in the frequency of HLA-DRB1*08 was found when compared with the frequency of a similar allele in healthy individuals (5.6 % vs 1.8 %; odds ratio (OR) 3.2; 95 % confidence interval (CI) 1.1–9.1; $p = 0.02$), and, on the contrary, a lower HLA-DQB1*0301 frequency was detected (16.1 % vs 25.3 %; $p < 0.05$) than in healthy individuals. The data obtained suggest that the HLA-DRB1*08 gene is associated with an increased sensitivity to NPC.

In OOC patients, HLA-DQB1*0502–4 and HLA-DRB1*16 variants were less common than in healthy individuals (1.1 % vs 6.8 %; $p < 0.05$ and 1.1 % vs 6.7 %; OR 0.16; 95 % CI 0.01–1.08; $p < 0.05$, respectively), suggesting that the HLA-DQB1*0301 gene is associated with resistance to NPC, and HLA-DQB1*0502–4 and HLA-DRB1*16 variants – with resistance to OOC.

It is interesting to note the difference in the frequency of HLA-DRB1*13 between NPC and OOC patients (17.7 % vs 6.8 %; OR 2.9; 95 % CI 1.1–8.6; $p < 0.05$). One can suggest that this difference is related to the proven involvement of EBV in the NPC development. There were no other differences in the frequencies of class II HLA genes between the groups of NPC and OOC patients.

For the first time in Russia the importance of alleles DQA1, DQB1 and DRB1 of the HLA gene for the NPC and OOC development, malignant tumors, respectively associated and non-associated with EBV, was studied. The results of the investigation completed together with known literature data allow us to conclude that the above alleles of the HLA class II gene can serve as a factor predisposing to the development of NPC in Russia.

Conclusion. However, in order to establish a strict association between a specific HLA haplotype and the NPC and OOC incidence, the information obtained is insufficient due to the complexity and variability of the genetic control of immune responses controlling the tumor process. A comprehensive study of this issue using different immune response genes and populations of different ethnic origins will probably help to elucidate the effect of genetic polymorphism on the risk of NPC and OOC development in Russia.

Key words: nasopharyngeal carcinoma, Epstein–Barr virus, human leukocyte antigen class II, association with tumor diseases of the nasopharynx

For citation: Senyuta N.B., Boldyreva M.N., Goncharova E.V. et al. HLA II genes distribution in Epstein–Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma and other tumors of the oral cavity patients in Russia. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(1):43–52.

Введение

Насофарингеальная карцинома (рак носоглотки, РНГ) – опухоль эпителиального происхождения. Она морфологически подразделяется на ороговевающий и неороговевающий рак, в состав которого как подтип входит недифференцированный РНГ (нРНГ) [1].

Как известно, насофарингеальная карцинома строго ассоциирована с вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ). Эта ассоциация имеет неоспоримые доказательства,

такие как присутствие клональных геномов вируса в предраковых и раковых образованиях носоглотки и экспрессия в опухолевых клетках целого спектра вирусных маркеров, а также образование у больных нРНГ вирусоспецифических антител к основным белкам ВЭБ [2–5]. Установлено, что нРНГ, в отличие от РНГ другого типа, практически в 100 % случаев ВЭБ-положительный и сопровождается высокими титрами гуморальных антител к основным белкам ВЭБ, которые

увеличиваются до высоких уровней задолго до установления диагноза и снижаются до нормальных показателей в случае успешного лечения [6].

ВЭБ является убиквитарным, заражает в основном детей в раннем возрасте с установлением латентной инфекции в В-лимфоцитах, периодически реактивирующейся в эпителиальных клетках гортани. Несмотря на широкое распространение ВЭБ, РНГ развивается довольно редко, что позволяет предположить, что инфицирования ВЭБ недостаточно для развития рака и что другие кофакторы играют важную роль в патогенезе РНГ [7]. Для РНГ характерны неравномерное географическое распространение и семейная предрасположенность, что вызывает широкое обсуждение возможной связи генетической предрасположенности с риском развития РНГ в определенных популяционных группах населения. Согласно данным Международного противоракового агентства существуют зоны с высоким (Восточная и Юго-Восточная Азия), средним (Северная Африка и Арктика) и низким (большинство европейских стран) уровнем заболеваемости РНГ.

Ряд исследований показал, что примерно 10 % больных РНГ имеют семейную предрасположенность [8]. Результаты исследований, проведенных в Гонконге и Китае, продемонстрировали, что у родственников больных РНГ риск возникновения этого заболевания в 9,3 раза выше популяционного, что также подтверждается частым развитием данной патологии в семьях мигрантов из районов с высоким уровнем заболеваемости РНГ [9].

Среди генетических факторов, возможно ассоциированных с РНГ, гены главного комплекса тканевой совместимости человека (лейкоцитарный антиген человека, human leukocyte antigen (HLA)) занимают важное место, так как играют центральную роль в презентации вирусных антигенов клетками иммунной системы [10]. Система генов HLA является самой полиморфной из всех известных систем в геноме человека. Определенные варианты генов HLA ассоциированы с чувствительностью и устойчивостью организма к развитию различных заболеваний, в том числе инфекционных и опухолевых [11].

Впервые об ассоциации аллелей HLA с РНГ было сообщено в 1974 г. [12]. Сейчас важность генов HLA в регуляции чувствительности либо устойчивости к развитию РНГ становится все более очевидной.

Большинство работ, посвященных изучению ассоциации аллелей HLA с чувствительностью к РНГ, проводилось у пациентов из районов южного и северо-западного Китая [13, 14], являющихся эндемичными для РНГ.

В работе X. Li и соавт. [14] сообщается об ассоциации этнической принадлежности популяции, ее географического ареала с развитием РНГ. Распределение аллелей HLA среди населения в географической зоне с высоким уровнем заболеваемости РНГ значительно отличается, а иногда противоположно тому, что наблюдается среди населения с низкой заболеваемостью РНГ.

По современным представлениям, система HLA в зависимости от генетического варианта может влиять на развитие ряда злокачественных новообразований (лимфомы Ходжкина, саркомы Капоши, лимфомы Беркитта, РНГ и т. д.) [15]. С этой точки зрения варианты генов HLA могут быть связаны не только с повышением (либо понижением) чувствительности к развитию опухоли, но также и с модуляцией иммунного ответа различными канцерогенными факторами, в данном случае ВЭБ.

Известно, что наиболее важную роль в регуляции иммунного ответа на разные специфические антигены, в том числе вирусные, выполняют молекулы HLA класса II [11]. Ряд исследователей подтвердили взаимосвязь между комплексом HLA, генетической чувствительностью к РНГ и иммунным ответом к ВЭБ [16]. Предполагается, что локусы *HLA-DRB1* и *HLA-DQB1* могут влиять на гуморальный ответ к инфекции ВЭБ [17].

С учетом вышесказанного генетическая предрасположенность к развитию РНГ представляется весьма вероятной. Поскольку Россия относится к странам с низким уровнем заболеваемости РНГ, изучение ассоциации аллелей HLA с риском развития данной патологии, ассоциированной с ВЭБ, в России не проводилось. Работы по изучению генетической предрасположенности к РНГ представляются интересными и важными для понимания особенностей инфицированности населения России ВЭБ и развития ВЭБ-ассоциированных и ВЭБ-неассоциированных опухолей носоглотки.

В литературе существуют противоречивые сведения о роли различных генов HLA как в возникновении РНГ, так и в инициации и особенностях иммунного ответа к белкам ВЭБ.

Цель исследования — изучение распределения вариантов *DQA1*-, *DQB1*-, *DRB1*-генов HLA класса II у больных РНГ и другими опухолями полости рта (ДОПР), ассоциированными и не ассоциированными с ВЭБ, в группах с высоким и низким уровнем гуморального иммунного ответа к основным белкам ВЭБ по сравнению с контрольной группой здоровых лиц.

Материалы и методы

Образцы крови от 62 больных нРНГ и 44 пациентов с ДОПР собраны в отделении опухолей головы и шеи НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». Образцы хранились при температуре -20°C . В группу пациентов с ДОПР вошли больные РНГ другой морфологической формы, раком слизистой оболочки полости рта, языка, подязычной миндалины и с некоторыми другими новообразованиями полости рта. Диагнозы опухолевых патологий устанавливали на основании клинической картины, гистологических и серологических исследований. Пациенты с РНГ и ДОПР были включены в исследование с их согласия, в результате случайной выборки.

Проведение исследования одобрено Комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина».

Сыворотка крови всех больных была протестирована на наличие антител иммуноглобулинов классов G и A (IgG и IgA) к капсидному и раннему антигенам ВЭБ методом непрямой иммунофлюоресценции. Для проведения реакции использовали конъюгированные козьи антитела против IgG и IgA человека. Методика постановки реакции иммунофлюоресценции описана ранее [18]. Диагностику РНГ, ассоциированного с ВЭБ, выполняли с помощью решающего правила для дифференциальной диагностики РНГ по титрам гуморальных антител к ВЭБ-ассоциированным антигенам [19].

Геномную ДНК из образцов периферической крови выделяли методом высаливания по стандартной процедуре [20]. Генотипирование проводили с помощью мультипраймерной амплификации сиквенс-специфическими праймерами методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Для типирования генов HLA класса II (*DQA1*, *DQB1*, *DRB1*) использовали наборы HLA-ДНК-Тех (ДНК-Технология, Москва). Набор для HLA-типирования позволял определить 14 вариантов гена *DRB1*, 12 вариантов (аллелей и групп аллелей) гена *DQB1* и 8 вариантов гена *DQA1*. Полимеразную цепную реакцию с автоматической регистрацией результата в режиме реального времени выполняли на приборе ДТ-96 (ДНК-Технология, Москва) по программам, рекомен-

дованным производителями набора. Характер распределения генов HLA у пациентов с РНГ и ДОПР сравнивали с иммуногенетическими параметрами здоровых лиц. Группу сравнения составили 300 доноров, проживающих в г. Москве.

Статистический анализ. Частоты вариантов генов HLA рассчитывали с помощью компьютерной программы Арлекин, версия 2.1 (<http://anthro.unige.ch/arlequin>). При статистической обработке данных достоверность определяли по двустороннему точному критерию Фишера. Для выявления значимости вариантов генов HLA в развитии заболеваний использовали отношение шансов (ОШ) и доверительный интервал (ДИ).

Результаты

На 1-м этапе проведено исследование гуморального ответа к белкам ВЭБ у больных нРНГ и пациентов с ДОПР. Титры вирусоспецифических антител у больных нРНГ существенно отличались от таковых у пациентов с ДОПР. Среднегеометрические значения титров антител IgG к капсидному и раннему антигенам ВЭБ у больных нРНГ были в десятки раз выше, чем у пациентов с ДОПР (1:690 и 1:83 для капсидного антигена и 1:238 и 1:4 для раннего антигена соответственно). Антитела IgA к капсидному и раннему антигену ВЭБ, наличие которых особенно характерно для нРНГ, у пациентов с ДОПР полностью отсутствовали (табл. 1).

Таблица 1. Антитела к ВЭБ в плазме крови больных раком носоглотки и пациентов с другими опухолями полости рта

Table 1. Antibodies against EBV in plasma of patients with nasopharyngeal cancer and patients with other tumors of the oral cavity

Параметр Parameter	Иммуноглобулин класса G Immunoglobulin G		Иммуноглобулин класса A Immunoglobulin A	
	Капсидный антиген ВЭБ EBV viral capsid antigen	Ранний антиген ВЭБ EBV early antigen	Капсидный антиген ВЭБ EBV viral capsid antigen	Ранний антиген ВЭБ EBV early antigen
Гуморальный ответ к ВЭБ у больных раком носоглотки (n = 62) <i>Humoral response to EBV in patients with nasopharyngeal cancer (n = 62)</i>				
Число сероположительных больных, % Number of seropositive patients, %	100	100	100	100
Среднегеометрическое значение титров антител Geometric mean of antibody titres	909,7*	310,2	260,8	190,8
Гуморальный ответ к ВЭБ у больных с другими опухолями полости рта (n = 44) <i>Humoral response to EBV in patients with other tumors of the oral cavity (n = 44)</i>				
Число сероположительных больных, % Number of seropositive patients, %	86,3	18,1	6,8	0
Среднегеометрическое значение титров антител Geometric mean of antibody titres	83,4	4,6	2,0	0

*Для определения титров антител иммуноглобулинов классов G и A к капсидному и раннему антигенам ВЭБ использовали десятикратные разведения плазмы крови.

Примечание. ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр.

*Determination of antibody titres of immunoglobulins G and A against EBV viral capsid and early antigens was performed on tenfold dilutions of plasma.

Note. EBV – Epstein–Barr virus.

Полученные данные о наличии выраженной иммунной реакции на ВЭБ у пациентов с нРНГ подтверждают вирусную природу данного заболевания, однако при этом не исключается генетическая предрасположенность как к развитию опухолей в области ротоглотки, так и к формированию гуморального ответа на экспрессию вирусных белков ВЭБ.

Следующий этап исследований был направлен на изучение частоты распределения вариантов генов *HLA-DQA1*, *-DQB1* и *-DRB1* в группах пациентов с РНГ и ДОПР по сравнению с контрольной группой. Результаты представлены в табл. 2–4.

В локусе *DQA1* различий в частоте встречаемости вариантов гена *DQA1* как между группами больных, так

Таблица 2. Распределение вариантов гена *HLA-DQA1* в группах пациентов с раком носоглотки и другими опухолями полости рта и в контрольной группе
Table 2. Distribution of the *HLA-DQA1* gene variants in the groups of patients with nasopharyngeal cancer and other tumors of the oral cavity and in the control group

Аллель <i>DQA1</i> <i>DQA1</i> allele	Пациенты с раком носоглотки (<i>n</i> = 62) Patients with nasopharyngeal cancer (<i>n</i> = 62)		Пациенты с другими опухолями полости рта (<i>n</i> = 44) Patients with other tumors of the oral cavity (<i>n</i> = 44)		Контрольная группа (<i>n</i> = 300) Control group (<i>n</i> = 300)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
0101	13	10,5	14	15,9	78	13,0
0102	33	26,6	14	15,9	114	19,0
0103	12	9,7	5	5,7	64	10,7
0201	19	15,3	16	18,2	87	14,5
0301	15	12,1	13	14,8	72	12,0
0401	4	3,2	1	1,1	9	1,5
0501	28	22,6	24	27,3	174	29,0
0601	0	0	1	1,1	2	0,3

Таблица 3. Распределение вариантов гена *HLA-DQB1* в группах пациентов с раком носоглотки и другими опухолями полости рта и в контрольной группе
Table 3. Distribution of the *HLA-DQB1* gene variants in the groups of patients with nasopharyngeal cancer and other tumors of the oral cavity and in the control group

Аллель <i>DQB1</i> <i>DQB1</i> allele	Пациенты с раком носоглотки (<i>n</i> = 62) Patients with nasopharyngeal cancer (<i>n</i> = 62)		Пациенты с другими опухолями полости рта (<i>n</i> = 44) Patients with other tumors of the oral cavity (<i>n</i> = 44)		Контрольная группа (<i>n</i> = 300) Control group (<i>n</i> = 300)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
0201	21	16,9	19	21,6	117	19,5
0301	20	16,1 (<i>p</i> < 0,05)	21	23,9	152	25,3
0302	10	8,1	8	9,1	42	7
0303	7	5,6	4	4,6	20	3,3
0304	2	1,6	1	1,1	1	0,2
0305	0	0	1	1,1	0	0
0401/2	5	4,0	1	1,1	10	1,7
0501	11	8,9	11	12,5	65	10,8
0502–4	10	8,1 (<i>p</i> < 0,05)	1	1,1 (<i>p</i> < 0,05)	41	6,8
0503	2	1,6	3	3,4	13	2,2
0601	6	4,8	3	3,4	19	3,2
0602–8	30	24,2	15	17,1	120	20,0

Таблица 4. Распределение вариантов гена *HLA-DRB1* в группах пациентов с раком носоглотки и другими опухолями полости рта и в контрольной группе

Table 4. Distribution of the *HLA-DRB1* gene variants in the groups of patients with nasopharyngeal cancer and other tumors of the oral cavity and in the control group

Аллель <i>DRB1</i> <i>DRB1</i> allele	Пациенты с раком носоглотки (<i>n</i> = 62) Patients with nasopharyngeal cancer (<i>n</i> = 62)		Пациенты с другими опухолями полости рта (<i>n</i> = 44) Patients with other tumors of the oral cavity (<i>n</i> = 44)		Контрольная группа (<i>n</i> = 300) Control group (<i>n</i> = 300)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
01	12	9,7	11	12,5	57	9,5
03	9	7,3	8	9,1	45	7,5
04	15	12,1	12	13,6	69	11,5
07	17	13,7	17	19,3	86	14,3
08	7	5,6 (<i>p</i> < 0,05)	1	1,1	11	1,8
09	0	0	0	0	4	0,6
10	0	0	0	0	8	1,3
11	14	11,3	13	14,8	85	14,2
12	2	1,6	3	3,4	19	3,2
13	22	17,7 (<i>p</i> < 0,05)	6	6,8	83	13,8
14	2	1,6	3	3,4	14	2,3
15	17	13,8	13	14,8	79	13,2
16	7	5,6	1	1,1 (<i>p</i> < 0,05)	40	6,7

и между пациентами и контрольной группой не обнаружено (см. табл. 2).

В локусе *DQB1* в группе больных РНГ выявлена более низкая, чем в контрольной группе, пропорция варианта *DQB1*0301* (16,1 % против 25,3 %; ОШ 0,57; 95 % ДИ 0,33–0,97; *p* = 0,03). У пациентов с ДОПР частота варианта *DQB1*0502–4* была ниже, чем в контрольной группе (1,1 % против 6,8 %; ОШ 0,16; 95 % ДИ 0,01–1,08; *p* < 0,05) и в группе больных РНГ (1,1 % против 8,1 %; ОШ 0,13; 95 % ДИ 0,01–1,02; *p* < 0,05) (см. табл. 3).

В локусе *DRB1* частота *HLA-DRB1*08* в группе больных РНГ была выше, чем в контрольной группе (5,6 % против 1,8 %; ОШ 3,2; 95 % ДИ 1,1–9,1; *p* < 0,05). В группе больных РНГ чаще, чем в группе пациентов с ДОПР, встречался вариант *HLA-DRB1*13* (17,7 % против 6,8 %; ОШ 2,9; 95 % ДИ 1,1–8,6; *p* < 0,05). В то же время значимых различий обеих групп пациентов по *HLA-DRB1*13* с контрольной группой не обнаружено. У пациентов с ДОПР частота *HLA-DRB1*16* была ниже, чем в контрольной группе (1,1 % против 6,7 %; ОШ 0,16; 95 % ДИ 0,01–1,08; *p* < 0,05). Различия с группой больных РНГ не были значимыми из-за малочисленности выборки (см. табл. 4).

Обсуждение

На сегодняшний день опубликовано немного работ, посвященных поиску ассоциации генов HLA

класса II с РНГ, и их результаты достаточно противоречивы.

В литературе имеются единичные работы, посвященные исследованию распределения частот этого гена у пациентов с РНГ. Опубликована работа, в которой авторы отмечают снижение частоты аллелей *DQA1*0103* и *DQA1*0201* у пациентов с РНГ греческого происхождения [21]. У представителей народности хань из Китая с диагностированным РНГ было выявлено снижение частоты аллеля *DQA1*0201* и увеличение частоты аллеля *DQA1*0101* [22]. В нашем исследовании различий в частотах гена *HLA* между пациентами с РНГ, ДОПР и контрольной группой не найдено.

При исследовании популяции хань из Китая не удалось обнаружить изменений в распределении гена *DQB1* у пациентов с РНГ по сравнению с контрольной группой [13, 22]. Также не найдено подобных различий и в греческой популяции [21]. Единственная работа, в которой упоминается связь чувствительности к РНГ и гена *DQB1*, — это исследование, выполненное в Тунисе, в котором с чувствительностью к РНГ был ассоциирован *DQB1*02*, а с устойчивостью к этому заболеванию — *DQB1*05* [23].

В нашем исследовании у пациентов с РНГ выявлена более низкая, чем в контрольной группе, частота *HLA-DQB1*0301* (16,1 % против 25,3 %; *p* < 0,05), а у пациентов с ДОПР она не отличалась от таковой

в контрольной группе. Вариант *HLA-DQB1*0502-4*, наоборот, реже встречался у пациентов с ДОПР, чем в контрольной группе (1,1 % против 6,8 %; $p < 0,05$) и у больных РНГ (1,1 % против 8,1 %; ОШ 0,13; 95 % ДИ 0,01–1,02; $p < 0,05$), а его частота у пациентов с РНГ не отличалась от контрольной группы. Аналогичные наблюдения касаются *HLA-DRB1*16*, частота которого у пациентов с ДОПР была ниже, чем в контрольной группе (1,1 % против 6,7 %; ОШ 0,16; 95 % ДИ 0,01–1,08; $p < 0,05$), а у больных РНГ не отличалась от этого показателя в контрольной группе. Сходство, вероятно, связано с тем, что указанные варианты генов *DRB1* и *DQB1* очень часто встречаются в виде гаплотипа *DRB1*16-DQB1*0502-4*. Трудно найти объяснение тому, что такое сочетание генов HLA реже встречается у пациентов с ДОПР. Возможно, это свидетельствует о различных вариантах иммунного ответа на разные типы опухолей, однако данное предположение требует дальнейшего подтверждения.

Наибольшее количество данных о связи генов HLA класса II с РНГ получено относительно гена *DRB1*, самого полиморфного среди генов HLA класса II. Поскольку РНГ эндемичен для Китая, большинство работ выполнено учеными из этой страны. Так, исследования ассоциаций HLA и РНГ на основе метаанализов были выполнены 2 группами китайских ученых последовательно в 2016 и 2017 гг. Для работы обе группы использовали практически одни и те же источники информации: PubMed, Web of Science, China National Knowledge Internet (CNKI), Wanfang, за исключением двух. Одна группа применяла дополнительно Embase, другая — Weipu. В работе Н. Yang и соавт., опубликованной в 2016 г., при анализе результатов 8 исследований (778 пациентов с РНГ и 1148 здоровых лиц) было сделано общее заключение о наличии связи вариантов *HLA-DRB1*01*, **03*, **09* и **10* с чувствительностью к РНГ [24]. В той же работе отмечено, что связь вариантов *HLA-DRB1*08*, **11* и **16* с риском развития РНГ значительно различается в зависимости от этнической принадлежности. В более позднем исследовании, выполненном К. Yao и соавт., на основании анализа 12 работ (1152 пациента с РНГ и 1600 здоровых лиц) сделано заключение о том, что варианты *HLA-DRB1*03*, **08*, **09* и **10* ассоциированы с чувствительностью к РНГ, а варианты *HLA-DRB1*11* и **12* могут быть важными протективными факторами для развития этого заболевания, особенно для популяций азиатского происхождения [25]. После стратификации результатов исследований с учетом популяционной принадлежности пациентов, по данным Н. Yang и соавт. [24], для азиатских популяций чувствительность к РНГ связана с вариантами *HLA-DRB1*03*, **08* и **10*, по данным К. Yao и соавт. [25] — с *HLA-DRB1*03*, **08*, а также с вариантом *HLA-DRB1*09*, который в работе Н. Yang и соавт. [24] был протективным. В исследовании К. Yao и соавт. [25] для популяций азиатского происхождения протективными были *HLA-DRB1*11* и **12*, что полностью

совпадает с данными, полученными Н. Yang и соавт. [24]. X. Geng и соавт. [26] установили, что аллель *HLA-DRB1*0701* у китайских уйгуров ассоциируется с трехкратным увеличением риска развития РНГ, а у китайской народности хань аллель *HLA-DRB1*0101* ассоциирован с устойчивостью к РНГ, т. е. в популяциях, имеющих одно и то же азиатское происхождение, встречается разнообразие как чувствительных, так и устойчивых вариантов среди генов HLA класса II.

Для жителей Туниса, имеющих североафриканско-средиземноморское происхождение, по результатам одного метаанализа, в качестве чувствительного к РНГ упоминается только аллель *HLA-DRB1*03*, протективными были аллели *HLA-DRB1*01* и **11* [24]; по данным другого метаанализа, чувствительными к РНГ являлись *HLA-DRB1*01* и **03* [25], протективным — только *HLA-DRB1*11*. По результатам исследования [23], чувствительность к РНГ ассоциирована с *HLA-DRB1*03*, **13*, а устойчивость — с *DRB1*01*. Таким образом, даже в работах, базирующихся на одних и тех же источниках информации, присутствуют расхождения, вплоть до изменения направления ассоциации на противоположное.

Данных об ассоциации РНГ с генами HLA класса II у европейцев практически нет, вероятно, из-за редкой встречаемости этого заболевания. По результатам одного метаанализа, у европейцев с чувствительностью к РНГ ассоциированы аллели *HLA-DRB1*01* и **03*, а протективным является *HLA-DRB1*16* [24]. Авторы более позднего метаанализа сообщают об отсутствии у европейцев значимых ассоциаций генов HLA класса II с чувствительностью или устойчивостью к РНГ [25]. У пациентов греческого происхождения с РНГ установлено увеличение частоты встречаемости *DRB1*07* [21]. У американцев европейского происхождения с повышенной чувствительностью к развитию РНГ был ассоциирован аллель *DRB1*0405*, с устойчивостью к РНГ — *DRB1*1501*, однако авторы работы предупредили о том, что к этим данным нужно относиться с осторожностью из-за множественности сравнений [27].

В нашей работе у пациентов с РНГ продемонстрировано увеличение частоты *HLA-DRB1*08* по сравнению с контрольной группой (5,6 % против 1,8 %; ОШ 3,2; 95 % ДИ 1,1–9,1; $p < 0,05$). Вариант гена *HLA-DRB1*08* также упоминается в литературе как определяющий чувствительность к РНГ в азиатских популяциях [24]. Аналогичных данных по России до настоящего исследования опубликовано не было.

Следует отметить, что вариант *HLA-DRB1*08* ассоциирован с рядом аутоиммунных заболеваний в разных популяционных группах: у китайцев — с первичным билиарным циррозом [28], у иранцев — с аутоиммунным гепатитом [29], у португальцев — с системной красной волчанкой [30], у мексиканцев — с аутоиммунным диабетом [31]. Как уже было сказано, чаще в качестве ассоциированного с РНГ в разных популяциях упоминается вариант гена *HLA-DRB1*03* [24, 25], который также связан с различными аутоиммунными

заболеваниями [32, 33]. Неожиданные находки маркеров аутоиммунных заболеваний у онкологических пациентов наводят на мысль об исходе хронического, в том числе, возможно, и аутоиммунного, воспаления в рак в результате «истощения» иммунной системы. Связь аутоиммунных заболеваний с возникновением злокачественных опухолей в настоящее время активно изучается [34], но это направление только начинает развиваться.

Интересным является факт обнаружения в нашей работе различий в частоте *HLA-DRB1*13* между пациентами с РНГ и ДОПР (17,7 % против 6,8 %; ОШ 2,9; 95 % ДИ 1,1–8,6; $p < 0,05$). Эти различия могут быть связаны с доказанным участием ВЭБ в развитии РНГ, поскольку имеются данные о связи *HLA-DRB1*13* с чувствительностью к папилломавирус-ассоциированному раку шейки матки, влагалища, полового члена, вульвы и ротоглотки [35]. Других различий по частотам генов HLA класса II между группами пациентов с РНГ и ДОПР не обнаружено, несмотря на то, что больные нРНГ имели высокие титры антител к белкам ВЭБ, тогда как у пациентов с ДОПР наблюдался низкий уровень гуморального ответа, что соответствует общему гуморальному фону к ВЭБ среди здорового населе-

ния России [18]. Одинаковый уровень антител IgA к капсидному антигену ВЭБ у жителей Китая, относящихся к разным этническим группам (уйгуры и хань) и имевших разные HLA-маркеры чувствительности и устойчивости к РНГ, позволяет сделать заключение о том, что характер распределения генов *HLA-DRB1* в этих 2 этнических группах не связан с инфицированием ВЭБ [26]. Авторы, исследовавшие греческую популяцию, также пришли к выводу о том, что предрасположенность к РНГ независима от присутствия ВЭБ [21].

Заключение

Таким образом, наши исследования в совокупности с уже известными данными, полученными ранее, позволяют сделать заключение о том, что имеется определенная связь генов HLA класса II с развитием РНГ, однако полученных сведений недостаточно из-за сложности и вариабельности генетического контроля иммунных реакций, контролирующих опухолевый процесс. Необходимо более широкое изучение вопроса влияния генетического полиморфизма на риск развития РНГ, причем среди различных генов иммунного ответа и популяций разного этнического происхождения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Barnes L., Evenson J.W., Reichart P. et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press, 2005.
- zur Hausen H., Schulte-Holthausen H., Klein G. et al. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinoma of the nasopharynx. *Nature* 1970;228(5276):1056–8. PMID: 4320657.
- Ho H.C., Ng M.H., Kwan Y.C., Chau J.C. Epstein–Barr-virus-specific IgA and IgG serum antibodies in nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer* 1976;34(6):655–60.
- Pearson G.R. Epstein–Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *J Cell Biochem Suppl* 1993;17F:150–4. PMID: 8412186.
- Tsang C.M., Tsao S.W. The role of Epstein–Barr virus infection in pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Virol Sin* 2015;30(2):107–21. DOI: 10.1007/s12250-015-3592-5. PMID: 25910483.
- Ho H.C., Kwan H.C., Ng M.H., de The G. Serum IgA antibodies to Epstein–Barr virus capsid antigen preceding symptoms of nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 1978;1(8061):436. PMID: 75457.
- Chang E.T., Adami H.O. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(10):1765–77. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0353. PMID: 17035381.
- Huang T., Liu Q., Huang H., Cao S. Study on genetic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in Guangdong, China. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2002;19(2):134–7. PMID: 11941590.
- Grulich A.E., McCredie M., Coates M. Cancer incidence in Asian migrants to New South Wales, Australia. *Br J Cancer* 1995;71(2):400–8. PMID: 7841061.
- Nikolich-Zugich J., Fremont D.H., Miley M.J., Messaoudi I. The role of MHC polymorphism in anti-microbial resistance. *Microbes Infect* 2004;6(5):501–12. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.01.006. PMID: 15109966.
- Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Физиологическая роль главного комплекса гистосовместимости человека. *Иммунология* 2001;(3):4–11. [Khaitov R.M., Alekseev L.P. Physiological role of the human major histocompatibility complex. *Immunologiya = Immunology* 2001;(3):4–11. (In Russ.)].
- Simons M.J., Day N.E., Wee G.B. et al. Nasopharyngeal carcinoma immunogenetic studies of Southeast Asian ethnic groups with high and low risk for the tumor. *Cancer Res* 1974;34(5):1192–5. PMID: 4842362.
- Wang R., Hu Y., Yindom L.M. et al. Association analysis between *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, and *DQB1* with nasopharyngeal carcinoma among a Han population in Northwestern China. *Hum Immunol* 2014;75(3):197–202. DOI: 10.1016/j.humimm.2013.12.015. PMID: 24389314.
- Li X., Fasano R., Wang E. et al. HLA associations with nasopharyngeal carcinoma. *Curr Mol Med* 2009;9(6):751–65. PMID: 19689302.
- Bateman A.C., Howell W.M. Human leukocyte antigens and cancer: is it in our genes? *J Pathol* 1999;188(3):231–6. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199907)188:3<231::AID-PATH325>3.0.CO;2-A. PMID: 10419588.
- Lung M.L., Cheung A.K., Ko J.M. et al. The interplay of host genetic factors and Epstein–Barr virus in the development of nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Cancer* 2014;33(11):556–68. DOI: 10.5732/cjc.014.10170. PMID: 25367335.
- Rubicz R., Yolken R., Drigalenko E. et al. A genome-wide integrative genomic study localizes genetic factors influencing antibodies against Epstein–Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA-1). *PLoS Genet* 2013;9(1):e1003147. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003147. PMID: 23326239.

18. Гурцевич В.Э., Сенюта Н.Б., Ломая М.В. и др. Серологические маркеры вируса Эпштейна–Барр у больных раком носоглотки в случаях невыявленного первичного очага. Вопросы вирусологии 2016;(61):205–12. [Gurtsevich V.E., Senyuta N.B., Lomaya M.V. et al. Diagnostic value of the Epstein–Barr virus serological markers in patients with nasopharyngeal carcinoma in cases of undetectable primary tumor location. Voprosy virusologii = Problems of Virology 2016;(61):205–12. (In Russ.)].
19. Гурцевич В.Э., Степина В.Н., Сенюта Н.Б. и др. Гуморальный иммунный ответ к вирусу Эпштейна–Барр в диагностике рака носоглотки (обзор литературы и 30-летний опыт собственных исследований). Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2011;(22): 20–30. [Gurtsevich V.E., Stepina V.N., Senyuta N.B. et al. Humoral immune response to Epstein–Barr virus in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma (literature review and 30-year authors own experience). Vestnik RONC im. N.N. Blokhina RAMN = Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS 2011;(22):20–30. (In Russ.)].
20. Miller S.A., Dykes D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16(3):1215. PMID: 3344216.
21. Karanikiotis C., Danilidis M., Karyotis N. et al. HLA Class II alleles and the presence of circulating Epstein–Barr virus DNA in Greek patients with nasopharyngeal carcinoma. Strahlenther Onkol 2008;184(6):325–31. DOI: 10.1007/s00066-008-1816-4. PMID: 18535809.
22. Zhou J.F., Guo S.S., Yu P. Association study on *HLA-DP* and *-DQ* allelic polymorphisms and nasopharyngeal carcinoma in the Han nationality in Hunan province. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 2003;20(3):262–4. PMID: 12778461.
23. Makni H., Daoud J., Ben Salah H. et al. HLA association with nasopharyngeal carcinoma in Southern Tunisia. Mol Biol Rep 2010;37(5):2533–9. DOI: 10.1007/s11033-009-9769-y. PMID: 19714482.
24. Yang H., Yu K., Zhang R. et al. The *HLA-DRB1* allele polymorphisms and nasopharyngeal carcinoma. Tumor Biol 2016;37(6):7119–28. DOI: 10.1007/s13277-016-5051-9. PMID: 27535842.
25. Yao K., Yang S., Shen J. et al. *HLA-DRB1* allele polymorphism and nasopharyngeal carcinoma risk: a meta-analysis. Eur Arch Otorhinolaryngol 2017;274(1):297–303. DOI: 10.1007/s00405-016-4264-2. PMID: 27535842.
26. Geng X.T., Hu Y.H., Dong T., Wang R.Z. Associations of human leukocyte antigen-DRB1 alleles with nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance in Xinjiang Uyghur autonomous region of China. Chin Med J (Engl) 2016;129(11):1347–54. DOI: 10.4103/0366-6999.182833. PMID: 27231174.
27. Burt R.D., Vaughan T.L., McKnight B. et al. Associations between human leukocyte antigen type and nasopharyngeal carcinoma in Caucasians in the United States. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1996;5(11):879–87. PMID: 8922295.
28. Zhao D.T., Liao H.Y., Zhang X. et al. Human leukocyte antigen alleles and haplotypes and their associations with antinuclear antibodies features in Chinese patients with primary biliary cirrhosis. Liver Int 2014;34(2):220–6. DOI: 10.1111/liv.12236. PMID: 23809616.
29. Baharlou R., Faghihi-Kashani A., Faraji F. et al. *HLA-DRB1* alleles of susceptibility and protection in Iranians with autoimmune hepatitis. Hum Immunol 2016;77(4):330–5. DOI: 10.1016/j.humimm.2016.01.007. PMID: 26780502.
30. Vasconcelos C., Carvalho C., Leal B. et al. HLA in Portuguese systemic lupus erythematosus patients and their relation to clinical features. Ann N Y Acad Sci 2009;1173:575–80. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04873.x. PMID: 19758202.
31. Rodriguez-Ventura A.L., Yamamoto-Furusho J.K., Coyote N. et al. *HLA-DRB1*08* allele may help to distinguish between type 1 diabetes mellitus and type 2 diabetes mellitus in Mexican children. Pediatr Diabetes 2007;8(1):5–10. DOI: 10.1111/j.1399-5448.2006.00221.x. PMID: 17341285.
32. Junge N., Tiedau M., Verboom M. et al. Human leukocyte antigens and pediatric autoimmune liver disease: diagnosis and prognosis. Eur J Pediatr 2016;175(4):527–37. DOI: 10.1007/s00431-015-2662-x. PMID: 26567543.
33. Beradhi B.S., Flesch B.K., Hansen M.P. et al. *HLA* class II differentiates between thyroid and polyglandular autoimmunity. Horm Metab Res 2016;48(4):232–7. DOI: 10.1055/s-0035-1559622. PMID: 26317691.
34. Giat E., Ehrenfeld M., Shoenfeld Y. Cancer and autoimmune diseases. Autoimmun Rev 2017;16(20):1049–57. DOI: 10.1016/17.07.022. PMID: 28778707.
35. Madeleine M.M., Finch J.L., Lynch C.F. et al. HPV-related cancers after solid organ transplantation in the United States. Am J Transplant 2013;13(12):3202–9. DOI: 10.1111/ajt.12472. PMID: 24119294.

Вклад авторов

Н.Б. Сенюта: анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;
 М.Н. Болдырева: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;
 Е.В. Гончарова: получение данных для анализа;
 Д.М. Максимович: статистическая обработка полученных данных;
 Л.Н. Щербак, Т.Е. Душенькина: получение данных для анализа;
 В.Э. Гурцевич: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

N.B. Senyuta: analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing;
 M.N. Boldyreva: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data;
 E.V. Goncharova: obtaining data for analysis;
 D.M. Maximovich: statistical processing of the obtained data;
 L.N. Shcherbak, T.E. Dushenkina: obtaining data for analysis;
 V.E. Gurtsevich: developing the research design.

ORCID авторов

Н.Б. Сенюта: <https://orcid.org/0000-0001-8915-8274>
 М.Н. Болдырева: <https://orcid.org/0000-0003-2641-3471>

Е. В. Гончарова: <https://orcid.org/0000-0001-6274-1849>

Д. М. Максимович: <https://orcid.org/0000-0001-7560-5088>

Л. Н. Щербак: <https://orcid.org/0000-0002-7048-4691>

В. Э. Гурцевич: <https://orcid.org/0000-00031840-4364>

ORCID of authors

N. B. Senyuta: <https://orcid.org/0000-0001-8915-8274>

M. N. Boldyreva: <https://orcid.org/0000-0003-2641-3471>

E. V. Goncharova: <https://orcid.org/0000-0001-6274-1849>

D. M. Maximovich: <https://orcid.org/0000-0001-7560-5088>

L. N. Shcherbak: <https://orcid.org/0000-0002-7048-4691>

V. E. Gurtsevitch: <https://orcid.org/0000-00031840-4364>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

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

Статья поступила: 31.10.2017. **Принята к публикации:** 06.02.2018.

Article received: 31.10.2017. **Accepted for publication:** 06.02.2018.

Экспрессия мРНК гена *BRCA1* в опухолях молочной железы как предиктор ответа на неоадъювантную химиотерапию

М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова, И.В. Дерюшева, П.В. Казанцева, Е.Ю. Гарбуков,
Е.М. Слонимская, Н.В. Литвяков

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

Контакты: Матвей Михайлович Цыганов TsyganovMM@yandex.ru

Введение. Большинство современных исследований ограничены изучением лишь герминальных мутаций гена *BRCA1* (чаще всего 5382insC), а работ, характеризующих различные соматические изменения гена *BRCA1* в опухолях, в частности экспрессию этого гена и ее связь с эффектом химиотерапии, очень мало. С учетом данных о связи наличия наследственной мутации *BRCA1* с высокой эффективностью препаратов платины можно предположить, что экспрессия гена *BRCA1* также будет ассоциирована с высокой чувствительностью новообразования к препаратам платины.

Цель исследования — оценить связь экспрессии гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с эффективностью неоадъювантной химиотерапии (НХТ).

Материалы и методы. В исследование включены данные 105 больных с морфологически верифицированным диагнозом рака молочной железы (РМЖ) стадии T1–4N0–3M0 (IIA–IIIB). Оценена начальная экспрессия гена *BRCA1* в опухолевом материале. Из биопсийного материала опухолевой ткани молочной железы выделяли РНК. Уровень экспрессии гена *BRCA1* оценивали с помощью количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени.

Результаты. В результате проведенного исследования оценена экспрессия гена *BRCA1* в ткани РМЖ. Выявлена слабая корреляция данного параметра с клинико-морфологическими характеристиками пациентов и параметрами опухолевого процесса. Установлено, что объективный ответ на НХТ сопряжен с высоким уровнем *BRCA1* при применении таксотера в монорежиме ($p = 0,03$) и при схеме САХ (циклофосфан, доксорубин, кселода) ($p = 0,05$). Тем не менее показано, что вне зависимости от применяемой схемы и количества курсов в общей группе больных РМЖ, получающих НХТ, высокая ($>1,5$) экспрессия исследуемого гена в первичной опухоли в 70 % случаев обуславливает отсутствие объективного ответа на лечение по сравнению с низким ($<0,3$) уровнем (тест Фишера; $p = 0,03$).

Заключение. Данные об экспрессии гена *BRCA1* до лечения могут являться предиктивным маркером эффективности НХТ у больных РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, экспрессия генов, *BRCA1*, неоадъювантная химиотерапия, эффективность химиотерапии

Для цитирования: Цыганов М.М., Ибрагимова М.К., Дерюшева И.В. и др. Экспрессия мРНК гена *BRCA1* в опухолях молочной железы как предиктор ответа на неоадъювантную химиотерапию. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(1):53–9.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-1-53-59

BRCA1 mRNA expression levels as an predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer

M.M. Tsyganov, M.K. Ibragimova, I.V. Deryusheva, P.V. Kazantseva, E.Yu. Garbukov, E.M. Slonimskaya, N.V. Litviakov

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

Background. Most modern studies are limited to the study of only germline mutations of the *BRCA1* gene (most often 5382insC). And there are very few works that characterize the different somatic changes in the *BRCA1* gene in the tumor, in particular the expression of this gene and its relation to the effect of chemotherapy. Given the linkage of the hereditary *BRCA1* mutation with the high efficacy of platinum drugs, it can be assumed that the expression of the *BRCA1* gene will be associated with a high sensitivity of the neoplasm to platinum drugs as well.

Objective: study of the relationship of *BRCA1* gene expression to the efficacy of neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast tumors.

Materials and methods. Study included 105 patients with breast cancer T1–4N0–3M0 (IIA–IIIB stage). The diagnosis of breast cancer was verified morphologically. The initial expression of *BRCA1* was evaluated in the tumor material. RNA was extracted from biopsy specimens of breast tumor tissue. Expression profiling of the *BRCA1* gene was carried out using quantitative real-time polymerase chain reaction.

Results. Expression of the *BRCA1* gene was evaluated as a result of the study. There was shown its weak correlation with clinico-morphological parameters of patients with breast cancer and parameters of the tumor process. It has been established that an objective response to NAC is associated with a high level of *BRCA1* when taxotere is used in monoregime ($p = 0.03$) and in the CAX (cyclophosphamide, doxorubicin, xeloda) scheme ($p = 0.05$). Nevertheless, it was shown that, regardless of the regimen used and the number of another NAC courses, high expression of the gene being studied (more than 1.5) in the primary tumor in 70 % of cases generally results in a lack of an objective response to treatment, compared with a low level (less than 0.3) (Fisher test; $p = 0.03$).

Conclusion. The obtained data on the relationship of expression of the *BRCA1* gene before treatment may be a predictive marker of the efficacy of NAC in patients with breast cancer.

Key words: breast cancer, genes expression, *BRCA1*, neoadjuvant chemotherapy, chemotherapy efficacy

For citation: Tsyganov M.M., Ibragimova M.K., Deryusheva I.V. et al. *BRCA1* mRNA expression levels as an predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2018;5(1):53–9.

Введение

Ген *BRCA1* расположен на длинном плече хромосомы 17 (17q21.31) и кодирует ядерный фосфобелок, который участвует в репарации ДНК и регуляции клеточного цикла (PubMed; OMIM 113705).

Это первый ген, для которого определено явное участие в этиологии семейного рака молочной железы (РМЖ) [1]. Герминальная мутация гена *BRCA1* также увеличивает риск развития рака шейки и тела матки, поджелудочной железы и толстой кишки [2]. В 1994 г. была впервые выявлена герминальная мутация *BRCA1*5382insC в экзоне 20 и показана ее сопряженность с высоким риском развития наследственного РМЖ и рака яичников [3]. Это наиболее распространенная мутация гена *BRCA1*, которая составляет 80 % мутаций данного гена и 60 % от общего объема мутаций в генах *BRCA1/2* для славянского населения [4]. Показано, что больные РМЖ с наличием данной мутации *BRCA1* особенно чувствительны к неoadъювантной химиотерапии (НХТ) с использованием препаратов платины [5, 6]. Это объясняется тем, что продукт гена-супрессора *BRCA1* входит в репарационный комплекс, обладающий высокой чувствительностью к повреждению ДНК. При возникновении генетических дефектов в работе белков комплекса нарушается процесс репарации ДНК и мутантные клетки, как правило, погибают. Этим объясняется тот факт, что генетические дефекты в белках системы репарации двунитевых разрывов ДНК, и в частности мутации в гене *BRCA1*, сопровождаются резким повышением чувствительности клеток к генотоксическим агентам, в том числе к препаратам платины [7, 8]. При этом современные исследования, как правило, ограничены изучением лишь герминальных мутаций, и имеется очень мало работ, характеризующих различные соматические изменения интактного гена *BRCA1* в опухоли молочной железы, в частности его экспрессию, что может играть немаловажную роль в выборе дальнейшей тактики лечения пациентов.

Цель исследования — изучение связи экспрессии гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с эффективностью НХТ.

Материалы и методы

В исследование включены 105 больных с морфологически верифицированным диагнозом РМЖ стадии T1–4N0–3M0 (IIA–IIIB) в возрасте 26–68 лет (средний возраст $47,7 \pm 0,9$ года) (табл. 1). В соответствии с Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast (April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania) [9] все больные получали 2–6 курсов НХТ

по схемам FAC (фторурацил, доксорубин, циклофосфан), САХ (циклофосфан, доксорубин, кселода), САР (циклофосфан, цисплатин) и монотерапию таксотером. Через 3–5 нед после НХТ выполняли операцию в объеме радикальной мастэктомии, радикальной резекции или секторальной резекции, затем больным проводили 2 курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC, лучевую терапию и/или гормональное лечение назначали по показаниям. Исследование выполняли в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (модифицированной в 1975 и 1983 гг.), получено разрешение локального этического комитета НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 1 от 14.01.2013). Всеми пациентами было подписано информированное согласие на исследование и проведение лечения.

В качестве исследуемого материала использованы биопсийные опухолевые образцы (~10 мм³), взятые до лечения под контролем ультразвукового исследования. Образцы опухоли помещали в раствор RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, США) и сохраняли при температуре –80 °С (после 24-часовой инкубации при температуре +4 °С) для дальнейшего выделения РНК и ДНК. Все пациенты не имели герминальных мутаций гена *BRCA1*.

Выделение РНК. Тотальная РНК была выделена из 105 образцов опухоли до лечения с использованием набора RNeasy mini kit Plus, содержащего ДНКазу I (Qiagen, Германия), с добавлением в раствор РНК-ингибитора РНКаз Ribolock (Fermentas, Литва). Концентрацию и чистоту выделения РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США) (125–210 нг/мкл; $A_{260}/A_{280} = 1,85–1,95$; $A_{260}/A_{230} = 1,80–2,00$). RIN составил 6,6–8,0. Для получения комплементарной ДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid™ (Fermentas, Литва) со случайными гексануклеотидами.

Количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР). Уровень экспрессии гена *BRCA1* (PubMed NM_007294.3) оценивали с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени с оригинальными праймерами и зондами по технологии TaqMan (Forward primer 5'-acagctgtgtggtgctctgtg-3'; Reverse primer 5'-cattgtcctctgtccaggcatc-3'; Probe FAM-5'-catcattcacccttgccacaggtgt-3'-BHQ1; Amplicon 107 bp) на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Австралия). ПЦР ставили в 3 репликах в объеме 15 мкл, содержащем 250 мкМ dNTPs (Sibenzyme, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2,5 мМ MgCl₂, 19 SE буфера (67 мМ Tris-HCl pH 8,8 при 25 °С,

Таблица 1. Клинико-морфологические параметры обследованных больных раком молочной железы**Table 1.** Clinical and morphological parameters of the examined patients with breast cancer

Параметр Parameter	n	%
Возраст, лет: Age, years:		
≤45	38	36,2
>45	67	63,8
Менструальный статус: Menstrual status:		
пременопауза premenopause	37	35,2
постменопауза postmenopause	68	64,8
Гистологический тип: Histological type:		
инвазивный протоковый рак invasive ductal carcinoma	90	85,7
инвазивный дольковый рак invasive lobular carcinoma	7	6,7
медулярный рак medullary carcinoma	5	4,8
другие типы other types	3	2,9
Размер опухоли: Tumor size:		
T1	14	13,3
T2	76	72,4
T3	6	5,7
T4	9	8,6
Лимфогенное метастазирование: Lymphatic metastasis:		
N0	42	40,0
N1	45	42,9
N2	8	7,6
N3	10	9,5
Рецепторы эстрогена: Estrogen receptors:		
+	72	68,6
—	33	31,4
Рецепторы прогестерона: Progesterone receptors:		
+	69	65,7
—	36	34,3
Рецепторы эпидермального фактора роста HER2: HER2 epidermal growth factor receptors:		
0/+	84	80,0
++	12	11,4
+++	9	8,6
Молекулярный подтип: Molecular subtype:		
люминальный В luminal B	79	75,2
трижды негативный triple negative	15	14,3
HER2-положительный HER2-positive	11	10,5

Гистологическая форма: Histological subtype:		
уницентрическая unicentric	73	69,5
мультицентрическая multicentric	32	30,5
Схема неоадьювантной химиотерапии: Neoadjuvant chemotherapy scheme:		
CAX	25	23,8
FAC	44	41,9
таксотер taxotere	26	24,8
CAP	10	9,5
Ответ на неоадьювантную химиотерапию: Response to neoadjuvant chemotherapy:		
прогрессирование progression	18	17,1
стабилизация stabilization	25	23,8
частичная регрессия partial regression	50	47,6
полная регрессия full regression	12	11,4

16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20), 2,5 ед. HotStart Taq polymerase (Sibenzyme, Россия) и 50 нг комплементарной ДНК. Двухшаговая программа амплификации включала: 1 цикл (предварительная денатурация) — 94 °С, 10 мин; 40 циклов: 1-й шаг — 94 °С, 10 с и 2-й шаг — 60 °С, 20 с. В качестве референсных использовали 2 гена: *GAPDH* (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase) и *ACTB* (actin beta). Уровень экспрессии гена *BRCA1* нормализовали по отношению к экспрессии референсных генов и измеряли в условных единицах. Относительную экспрессию оценивали с помощью метода М. W. Pfaffl [10]. В качестве калибратора использовали пулированную от 10 пациентов РНК, выделенную из морфологически нормальной ткани молочной железы, полученной во время операции от больных, которым не проводили НХТ.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами применяли критерий Вилкоксона—Манна—Уитни. Сравнение частот по качественным данным анализировали с помощью двустороннего критерия Фишера (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>).

Результаты

На первом этапе нашего исследования мы оценили начальный уровень экспрессии гена *BRCA1*. Среднее значение его экспрессии до лечения составило 0,93 ± 0,08. В табл. 2 представлены данные о связи экспрессии гена *BRCA1* с основными клинико-морфологическими параметрами.

Таблица 2. Связь экспрессии гена *BRCA1* с основными клинико-морфологическими параметрами пациентовTable 2. Relationship between *BRCA1* gene expression and the patients' main clinical and morphological parameters

Параметр Parameter	Экспрессия до лечения Expression prior to treatment	<i>p</i>
Возраст, лет: Age, years:		
≤45	0,80 ± 0,17	0,92
>45	0,90 ± 0,15	
Менструальный статус: Menstrual status:		
пременопауза premenopause	0,79 ± 0,13	0,35
постменопауза postmenopause	0,97 ± 0,20	
Размер опухоли: Tumor size:		
T1–2	0,87 ± 0,12	0,73
T3–4	0,87 ± 0,28	
Лимфогенное метастазирование: Lymphatic metastasis:		
N0	0,97 ± 0,24	0,82
N1–3	0,80 ± 0,11	
Молекулярный подтип: Molecular subtype:		
люминальный В luminal B	1,04 ± 0,16	0,03
трижды негативный triple negative	0,56 ± 0,09	
HER2-положительный HER2-positive	0,41 ± 0,17	
Гистологическая форма: Histological subtype:		
уницентрическая unicentric	0,80 ± 0,15	0,40
мультицентрическая multicentric	0,98 ± 0,17	

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые результаты.

Note. Bold type has statistically significant results.

В результате анализа установлено, что экспрессия изучаемого гена слабо коррелирует с основными клинико-морфологическими параметрами. Статистически значимые различия были выявлены лишь для HER2-положительного молекулярного подтипа РМЖ (см. табл. 2).

Поскольку при изучении гена *BRCA1* важным является учет схемы НХТ, мы оценили связь начального уровня экспрессии исследуемого гена в зависимости от эффективности НХТ в общей группе больных, а также при разных схемах химиотерапии (см. рисунок).

Оценка связи экспрессии исследуемого гена с эффективностью НХТ показала, что статистически достоверные различия между группами с наличием объективного ответа на НХТ и без такового характерны

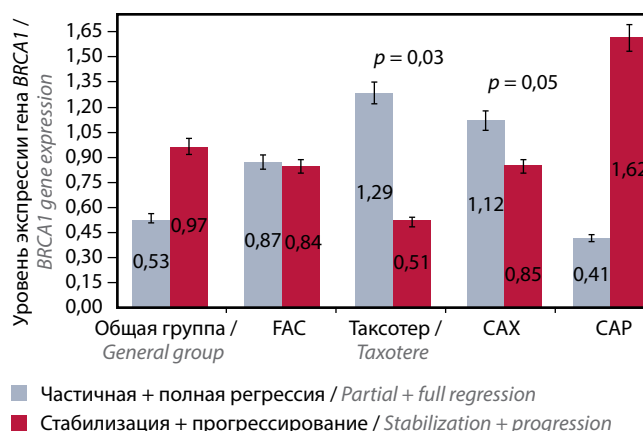
для группы больных со схемой САХ ($p = 0,05$) и для пациентов, пролеченных таксотером в монорежиме ($p = 0,03$) (см. рисунок). В обоих случаях уровень экспрессии исследуемого гена выше в группе пациентов с наличием объективного ответа на НХТ. Обращают на себя внимание показатели сопоставления экспрессии гена *BRCA1* и ответа на НХТ в группе САР, однако группа пациентов с данной схемой включала всего 10 лиц, из которых только у 2 больных наблюдалось отсутствие ответа на НХТ, и статистически значимых различий не выявлено (из-за эффекта малых выборок).

Важно отметить, что экспрессия мРНК является вариабельной величиной. Таким образом, для более точного определения связи экспрессии исследуемого гена с эффективностью НХТ с помощью статистического анализа уровень экспрессии *BRCA1* был разделен на тертили (табл. 3). Для гена *BRCA1* нижний и верхний тертили составили 0,3 и 1,5 соответственно. В итоге были сформированы 3 группы пациентов: 1-я – с экспрессией *BRCA1* <0,3; 2-я – с экспрессией 0,3–1,5; 3-я – с экспрессией >1,5.

Высокая (>1,5) экспрессия исследуемого гена в общей группе опухолей молочной железы в 70 % случаев (19 из 27) обуславливает отсутствие объективного ответа на лечение по сравнению с низким (<0,3) уровнем экспрессии (тест Фишера; $p = 0,03$) (см. табл. 3).

Обсуждение

Несмотря на то, что ген *BRCA1* хорошо изучен при РМЖ, данных по сопоставлению его экспрессии с клиническими показателями явно недостаточно. В недавнем исследовании российских коллег на нейроэндокринных опухолях желудочно-кишечного тракта была показана связь экспрессии *BRCA1* с прогнозом заболевания. Авторы установили, что низкая (<2,0) экспрессия этого гена сопряжена с более высокими показателями безрецидивной ($p < 0,05$) и общей ($p = 0,12$)



Связь начального уровня экспрессии гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с эффективностью неoadъювантной химиотерапии в общей группе больных и при разных схемах лечения
Relationship between the baseline level of *BRCA1* gene expression in breast tumor and the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy in the complete patient group and for different treatment schemes

Таблица 3. Ответ на неоадьювантную химиотерапию в зависимости от групп экспрессии гена *BRCA1* в общей группе пациентов и при разных схемах
Table 3. Response to neoadjuvant chemotherapy depending on the *BRCA1* gene expression group in the complete patient group and for different treatment schemes

Группа пациентов Patient group	Уровень экспрессии гена <i>BRCA1</i> <i>BRCA1</i> gene expression level	n	Эффективность неоадьювантной химиотерапии, n (%) Neoadjuvant chemotherapy effectiveness, n (%)		p		
			частичная + полная регрессия partial + full regression	стабилизация + прогрессирование stabilization + progression	группа 1/2 group 1/2	группа 1/3 group 1/3	группа 2/3 group 2/3
Общая Complete	<0,3	29	17 (59)	12 (41)	0,09	0,03	0,61
	0,3–1,5	49	31 (63)	18 (37)			
	>1,5	27	8 (30)	19 (70)			
СAX	<0,3	7	2 (29)	5 (71)	0,36	0,10	0,31
	0,3–1,5	11	6 (55)	5 (45)			
	>1,5	7	6 (86)	1 (14)			
FAC	<0,3	11	4 (36)	7 (64)	0,27	1	0,44
	0,3–1,5	24	15 (62)	9 (38)			
	>1,5	9	4 (44)	5 (56)			
Таксотер Taxotere	<0,3	6	2 (33)	4 (67)	0,33	0,08	0,31
	0,3–1,5	11	7 (64)	4 (36)			
	>1,5	9	8 (89)	1 (11)			
CAP	<0,3	5	4 (80)	1 (20)	1	1	0,39
	0,3–1,5	3	3 (100)	0 (0)			
	>1,5	2	1 (50)	1 (50)			

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые результаты.

Note. Bold type has statistically significant results.

выживаемости по сравнению с группой больных, у которых экспрессия *BRCA1* была выше 2,0 [7]. В другом исследовании продемонстрировано, что отсутствие экспрессии *BRCA1* является независимым предиктором низких показателей безрецидивной выживаемости у пациентов, получавших химиотерапию на основе таксанов [11]. Результаты исследования экспрессии белка *BRCA1* при РМЖ коррелируют с плохим прогнозом и агрессивным течением заболевания [12]. Полученные нами результаты для антрациклинсодержащих схем согласуются с данными литературы. Так, С. Егawa и соавт. установили, что повышенная экспрессия мРНК гена *BRCA1* связана с благоприятным ответом на антрациклинсодержащую схему НХТ при РМЖ [13]. Показано, что среднее значение экспрессии у пациентов без ответа на НХТ оказалось статистически достоверно ниже, чем у больных с объективным ответом на лечение ($p < 0,05$). Кроме этого, авторы установили, что частота ответа на проведенную химиотерапию для опухолей с высоким уровнем мРНК гена *BRCA1* достоверно выше ($p < 0,05$), чем для опухолей с низким уровнем мРНК *BRCA1* (65 % против 32 %).

Уменьшение экспрессии гена *BRCA1* в клеточных линиях РМЖ повышает чувствительность к цисплатину, но приводит к резистентности к паклитакселу и винорелбину [14]. Это можно объяснить тем, что индукция

экспрессии гена *BRCA1* после воздействия паклитаксела ведет к активации контрольной точки митоза (т. е. остановке деления клетки) и последующей клеточной гибели [15, 16]. При этом дефицит продукта гена *BRCA1*, наоборот, приводит к тому, что апоптоз опухолевых клеток под действием таксанов не индуцируется.

В последнее время набирает оборот изучение транскрипционного нуклеарного фактора κB (NF- κB), фактора транскрипции, отвечающего за адаптивные реакции клеток, в частности в ответ на повреждение ДНК. В недавнем исследовании показано, что NF- κB участвует в опосредованной резистентности опухолевых клеток (с диким типом *BRCA1*) к ДНК-повреждающим агентам [17]. Установлено, что у *BRCA1*-дефицитных опухолевых клеток, не способных к репарации ДНК, наблюдается высокая экспрессия NF- κB . Это приводит к ингибированию процессов апоптоза и возникновению химиорезистентности [18].

Заключение

Таким образом, несмотря на хорошую изученность гена *BRCA1* при РМЖ, данные о его связи с клиническими параметрами не всегда однозначны, а утверждения о клинической значимости его функциональных нарушений до сих пор остаются весьма спорными. Результаты нашего исследования показали, что низкая

экспрессия *BRCA1* связана с хорошим ответом на НХТ при схеме САХ и при применении таксотера, что, казалось бы, противоречит многим данным литературы. Однако с учетом результатов, полученных авторами для NF-κB, можно предположить, что именно комплекс-

ный подход в изучении вопроса влияния *BRCA1* на эффект лечения поможет выявить новые маркеры эффективности НХТ. Это подтверждает несомненную актуальность исследования, но требует дальнейшего детального изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Johnson N., Fletcher O., Palles C. et al. Counting potentially functional variants in *BRCA1*, *BRCA2* and *ATM* predicts breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet* 2007;16(9):1051–7. DOI: 10.1093/hmg/ddm050. PMID: 17341484.
2. Kadouri L., Hubert A., Rotenberg Y. et al. Cancer risks in carriers of the *BRCA1/2* Ashkenazi founder mutations. *J Med Genet* 2007;44(7):467–71. DOI: 10.1136/jmg.2006.048173. PMID: 17307836.
3. Simard J., Tonin P., Durocher F. et al. Common origins of *BRCA1* mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. *Nat Genet* 1994;8(4):392–8. DOI: 10.1038/ng1294-392. PMID: 7894492.
4. Palmero E.I., Alemar B., Schüller-Faccini L. et al. Screening for germline *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* and *CHEK2* mutations in families at-risk for hereditary breast cancer identified in a population-based study from Southern Brazil. *Genet Mol Biol* 2016;39(2):210–22. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2014-0363. PMID: 27223485.
5. Byrski T., Huzarski T., Dent R. et al. Pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin in *BRCA1*-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2014;147(2):401–5. DOI: 10.1007/s10549-014-3100-x. PMID: 25129345.
6. Byrski T., Gronwald J., Huzarski T. et al. Pathologic complete response rates in young women with *BRCA1*-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2010;28(3):375–9.
7. Гафтон И.Г., Имянитов Е.Н., Семиглазов В.В. и др. Экспрессия гена *BRCA1* при нейроэндокринных опухолях желудочно-кишечного тракта. *Сибирский онкологический журнал* 2014;16(4):11–5. [Gafton I.G., Imyaninov E.N., Semiglazov V.V. et al. *BRCA1* gene expression in endocrine tumors of the gastrointestinal tract. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2014;16(4):11–5. (In Russ.)].
8. Imyaninov E.N., Moiseyenko V.M. Drug therapy for hereditary cancers. *Hered Cancer Clin Pract* 2011;9(1):5. DOI: 10.1186/1897-4287-9-5. PMID: 21819606.
9. 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.
10. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):e45. PMID: 11328886.
11. Kurebayashi J., Yamamoto Y., Kurosumi M. et al. Loss of *BRCA1* expression may predict shorter time-to-progression in metastatic breast cancer patients treated with taxanes. *Anticancer Res* 2006;26(1):695–701. PMID: 16739340.
12. Mahmoud A.M., Macias V., Al-Alem U. et al. *BRCA1* protein expression and subcellular localization in primary breast cancer: automated digital microscopy analysis of tissue microarrays. *PLoS One* 2017;12(9):e0184385. DOI: 10.1371/journal.pone.0184385. PMID: 28863181.
13. Egawa C., Motomura K., Miyoshi Y. et al. Increased expression of *BRCA1* mRNA predicts favorable response to anthracycline-containing chemotherapy in breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2003;78(1):45–50. PMID: 12611456.
14. Lafarge S., Sylvain V., Ferrara M., Bignon Y.J. Inhibition of *BRCA1* leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. *Oncogene* 2001;20(45):6597–606. DOI: 10.1038/sj.onc.1204812. PMID: 11641785.
15. Mullan P.B., Quinn J.E., Gilmore P.M. et al. *BRCA1* and *GADD45* mediated G2/M cell cycle arrest in response to antimicrotubule agents. *Oncogene* 2001;20(43):6123–31. DOI: 10.1038/sj.onc.1204712. PMID: 11593420.
16. Quinn J.E., Kennedy R.D., Mullan P.B. et al. *BRCA1* functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 2003;63(19):6221–8. PMID: 14559807.
17. Harte M.T., Gorski J.J., Savage K.I. et al. NF-κB is a critical mediator of *BRCA1*-induced chemoresistance. *Oncogene* 2014;33(1):713–23. DOI: 10.1038/ncr.2013.10. PMID: 23435429.
18. Sau A., Lau R., Cabrita M.A. et al. Persistent activation of NF-κB in *BRCA1*-deficient mammary progenitors drives aberrant proliferation and accumulation of DNA damage. *Cell Stem Cell* 2016;19(1):52–65. DOI: 10.1016/j.stem.2016.05.003. PMID: 27292187.

Вклад авторов

М.М. Цыганов: написание текста рукописи;

М.К. Ибрагимова, И.В. Дерюшева: анализ полученных данных;

П.В. Казанцева: получение данных для анализа;

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

Е.М. Слонимская, Н.В. Литвяков: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

M.M. Tsyganov: article writing;

M.K. Ibragimova, I.V. Deryusheva: analysis of the obtained data;

P.V. Kazantseva: obtaining data for analysis;

E. Yu. Garbukov: obtaining data for analysis, reviewing of publications of the article's theme;
E. M. Slonimskaya, N. V. Litviakov: developing the research design.

ORCID авторов

М. М. Цыганов: <https://orcid.org/0000-0001-7419-4512>
М. К. Ибрагимова: <https://orcid.org/0000-0001-8815-2786>
И. В. Дерюшева: <https://orcid.org/0000-0002-9568-3371>
П. В. Казанцева: <https://orcid.org/0000-0002-2953-0350>
Е. Ю. Гарбуков: <https://orcid.org/0000-0002-2917-8158>
Е. М. Слонимская: <https://orcid.org/0000-0003-4382-5697>
Н. В. Литвяков: <https://orcid.org/0000-0002-0714-8927>

ORCID of authors

M. M. Tsyganov: <https://orcid.org/0000-0001-7419-4512>
M. K. Ibragimova: <https://orcid.org/0000-0001-8815-2786>
I. V. Deryusheva: <https://orcid.org/0000-0002-9568-3371>
P. V. Kazantseva: <https://orcid.org/0000-0002-2953-0350>
E. Yu. Garbukov: <https://orcid.org/0000-0002-2917-8158>
E. M. Slonimskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4382-5697>
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 выполнена в рамках конкурса 2018–2020 гг. на получение стипендии Президента РФ молодым ученым и аспирантам.

Financing. The work was carried out within the framework of the contest in 2018–2020 for the scholarship of the President of the Russian Federation to young scientists and post-graduate students.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

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

Статья поступила: 12.01.2018. **Принята к публикации:** 15.02.2018.

Article received: 12.01.2018. **Accepted for publication:** 15.02.2018.

Экзосомальные протеины – потенциальные маркеры для диагностики множественной миеломы

В.Е. Шевченко¹, А.С. Брюховецкий², М.В. Филатов³, В.С. Бурдаков³, З.Н. Никифорова⁴,
И.С. Брюховецкий^{5,6}, Ю.Д. Василец⁷, Т.И. Кушнир⁷, Н.Е. Арноцкая¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ЗАО «Клиника восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «НейроВита»; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23;

³Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова»; Россия, 188300 Ленинградская обл., Гатчина, мкр. Орлова роща, 1;

⁴ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»; Россия, 123022 Москва, Звенигородское шоссе, 5;

⁵Школа биомедицины ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»; Россия, 690091 Владивосток, ул. Суханова, 8;

⁶ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения РАН; Россия, 690059 Владивосток, ул. Пальчевского, 17;

⁷ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина»; Россия, 109472 Москва, ул. Академика Скрябина, 23

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Введение. Множественная миелома (ММ) — злокачественная гематологическая опухоль из плазматических клеток. Микроокружение играет ключевую роль в выживании клеток ММ и их резистентности к лекарственным препаратам путем выделения растворимых факторов, повышения экспрессии молекул адгезии и высвобождения экзосом (ЭС). Роль, которую ЭС, секретируемые клетками ММ, играют в межклеточных взаимодействиях и передаче сигнальной информации в костном мозге, в настоящее время неизвестна. ЭС как источник маркеров для диагностики ММ также не исследованы.

Цель исследования — использование протеомного профилирования ЭС в качестве инструмента для идентификации маркеров опухолевого роста у пациентов с ММ.

Результаты. Впервые изучен протеомный состав ЭС, полученных из плазмы крови пациентов с ММ и рассеянным склерозом. С помощью метода нано-высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии (нано-ВЭЖХ-МС/МС) идентифицированы в целом 332 белка в ЭС обеих групп больных и установлена близость их качественного состава. Впервые обнаружены 12 дифференциально экспрессированных белков, уровни которых значительно повышены в ЭС больных ММ, что позволило рассматривать их в качестве потенциальных маркеров заболевания.

Заключение. Протеомный анализ ЭС, полученных из плазмы крови больных ММ, является важным методом для поиска маркеров заболевания.

Ключевые слова: экзосома, плазма крови, протеом, масс-спектрометрия, множественная миелома, рассеянный склероз

Для цитирования: Шевченко В.Е., Брюховецкий А.С., Филатов М.В. и др. Экзосомальные протеины — потенциальные маркеры для диагностики множественной миеломы. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(1):60–9.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-1-60-69

Exosomal proteins as potential markers of multiple myeloma diagnostics

V.E. Shevchenko¹, A.S. Bryukhovetskiy², M.V. Filatov³, V.S. Burdakov³, Z.N. Nikiforova⁴, I.S. Bryukhovetskiy^{5,6},
Yu.D. Vasilets⁷, T.I. Kushnir⁷, N.E. Arnotskaya¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²NeuroVita Clinic of Interventional and Restorative Neurology and Therapy; 23 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

³National Research Center “Kurchatov Institute”, B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute; 1 Orlova Roshcha microdistrict, Gatchina, Leningrad Region 188300, Russia;

⁴All-Russian State Center for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed; 5 Zvenigorodskoe Shosse, Moscow 123022, Russia;

⁵School of Biomedicine, Far Eastern Federal University; 8 Sukhanova St., Vladivostok 690091, Russia;

⁶National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences; 17 Pal'chevskogo St., Vladivostok 690059, Russia;

⁷K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology; 23 Akademika Skryabina St., Moscow 109472, Russia

Background. Multiple myeloma (MM) is a hematologic malignancy of plasma cells. The microenvironment plays a key role in MM cell survival and drug resistance through release of soluble factors, expression of adhesion molecules and release of exosomes (EXs). The role that EXs, released by MM cells have in cell-to-cell communication and signaling in the bone marrow is currently unknown. EXs as a source of markers for MM diagnostics are also not studied.

Objective: to use proteomic profiling of EXs as a tool to identify circulating tumor associated markers in MM patients.

Results. The proteome composition of EXs obtained from plasma of patients with MM and multiple sclerosis was studied for the first time. nano-HPLC-MS/MS analysis identified a total of 332 proteins in the EXs of both groups of patients and determined the proximity of their qualitative composition. For the first time, 12 differentially expressed proteins were detected, the levels of which were significantly increased in EXs from patients with MM. This allowed us to consider them as potential markers of the disease.

Conclusion. Proteomic analysis of EXs obtained from plasma of patients with MM is an important method for finding disease markers.

Key words: exosome, blood plasma, proteome, mass-spectrometry, multiple myeloma, multiple sclerosis

For citation: Shevchenko V.E., Bryukhovetskiy A.S., Filatov M.V. et al. Exosomal proteins as potential markers of multiple myeloma diagnostics. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2018;5(1):60–9.

Введение

Множественная миелома (ММ), генерализованная плазмочитома — злокачественная гематологическая опухоль из плазматических клеток (дифференцированных В-лимфоцитов, продуцирующих антитела) с преимущественной локализацией в костном мозге. ММ занимает 18 % в структуре смертности от гематологических опухолей, от нее ежегодно умирают порядка 80 тыс. больных во всем мире [1]. Внедрение новых противоопухолевых препаратов, включая ингибиторы протеасом и иммуномодулирующие препараты, увеличило медиану 5-летней выживаемости пациентов с ММ [2]. Показано, что клетки ММ зависят от состояния их микроокружения в костном мозге (например, стромальных клеток костного мозга, макрофагов и т. д.) и активно взаимодействуют с ним [3]. Этот процесс играет ключевую роль в регуляции роста и выживаемости клеток ММ, а также их резистентности к лекарственным препаратам. Межклеточные взаимодействия осуществляются путем прямого контакта через адгезивные молекулы или растворимые факторы, включая цитокины (интерлейкины 6, 8 и фактор роста эндотелия сосудов), а также реализацию экстраклеточных везикул (ЭВ) [4]. Последние, в том числе экзосомы (ЭС), секретируются почти всеми типами клеток и являются важнейшими элементами бесконтактной коммуникации между клетками [5]. Недавно обнаружено, что ЭС индуцируют выживаемость и резистентность к лекарственным препаратам клеток ММ человека *in vitro* [6]. Использование белкового содержимого ЭС в качестве источника биомаркеров для диагностики начала заболевания, его прогрессирования и лекарственной резистентности недостаточно изучено. Таким образом, идентификация новых белков в ЭС, продуцируемых клетками ММ, поможет в выяснении молекулярных механизмов патогенеза этого опасного заболевания, его ранней диагностике и лечении.

Цель исследования — разработка анализа методом нано-высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии (нано-ВЭЖХ-МС/МС) протеома ЭС плазмы крови человека для поиска маркеров опухолевого роста.

Материалы и методы

Реактивы. Для всех процедур использовали дистиллированную воду, очищенную и обессоленную с помощью Milli-Q (Millipore Corporation, США). Ацетонитрил (ACN) HPLC gradient grade был получен из Prolabo (США); 98–100 % муравьиная кислота (FA) — из Merck (США); дитиотреитол, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), трис-(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР), трифторуксусная кислота (ТФА) и мочевины — из Fluka (США); фосфатный буферный раствор (ФБР), 99,7 % уксусная кислота, 99,5 % 2,2,2-трифторэтанол (TFE), иодацетамид и трипсин, метилированный по лизинам, — из Sigma Aldrich (США); соляная кислота (чистая) — из «Химмед» (Россия). Для процедур типирования и определения количественного содержания ЭС с учетом экспрессии тетраспанинов CD63 и CD81 в качестве маркеров ЭС использовали коммерческие наборы (System Biosciences (SBI), США): CD63 ExoELISA (каталожный номер # EXOEL-CD63A-1), CD81 ExoELISA (каталожный номер # EXOEL-CD81A-1).

Выделение ЭС из плазмы крови человека. Образцы плазмы крови (по 100 мл) без тромбоцитов и эритроцитов получены от 3 больных с клиническим диагнозом ММ (НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России) и 3 пациентов с рассеянным склерозом (РС), не имеющих других онкологических заболеваний (Клиника восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «НейроВита»). РС был выбран нами в качестве контроля, так как является системным хроническим аутоиммунным заболеванием неонкологической природы, при котором также поражается миелиновая оболочка нервных волокон.

Опытные образцы ЭС получали следующим образом.

1. Плазму крови разводили раствором ФБР/ЭДТА (20 мМ) в соотношении 1:1 и помещали по 50 мл каждого образца в 4 полипропиленовые пробирки для дифференциального центрифугирования.
2. Первое центрифугирование проводили при 1300g в течение 15 мин при температуре +4 °C на центрифуге MF20-R (угловой ротор AMF-20-8) (Awel,

Франция). Надосадочную жидкость переносили в новые полипропиленовые центрифужные пробирки. Второе центрифугирование выполняли при 15 000g в течение 30 мин при температуре +4 °C на той же центрифуге.

3. Последующую фильтрацию полученной надосадочной жидкости проводили шприцом через фильтры Milipore Millex-HV 0,45 мкм и Millipore Sterivex 0,22 мкм.
 - Полученный фильтрат (200 мл) от каждого образца больных ММ и РС распределяли в 6 пробирок для ультрацентрифуги CP 80NX (Hitachi, Япония) по 34 мл и проводили 3 последовательных ультрацентрифугирования при 100 000g (28 000 rpm) в течение 2 ч на ультрацентрифуге CP 80NX (ротор P28S) (Hitachi, Япония) для выделения и промывки ЭС. После первого ультрацентрифугирования надосадочную жидкость удаляли, к осадку в каждый флакон добавляли по 100 мкл ФБР/ЭДТА (20 мМ) и тщательно пипетировали.
 - Затем пробы объединяли из 6 флаконов в 1 флакон для каждого больного (объем проб составлял 1000 мкл). Перед каждой отмывкой ЭС объем образцов доводили до 34 мл, добавляя 33 мл ФБР/ЭДТА (20 мМ), и тщательно пипетировали.
4. После каждой отмывки проводили измерение содержания белка с помощью спектрофотометра Nano-Drop ND-1000 (США).
5. После 3-го ультрацентрифугирования общий объем осадка доводили до 200 мкл dH₂O и содержимое разделяли на 2 части по 100 мкл. Одну часть образца использовали для масс-спектрометрического анализа, а во вторую часть с образцом добавляли 400 мкл буфера, связывающего ЭС (exosome binding buffer ELISA, System Biosciences, США), для постановки иммуноферментного анализа «сэндвич»-типа (ELISA). Образцы хранили в холодильнике при температуре +4 °C.

Определение и визуализация ЭС. Размер изолированных ЭВ определяли с помощью анализатора частиц Microtrac S3500 (Microtrac Inc., США) в соответствии с инструкцией производителя. Для визуализации ЭС использовали атомно-силовую микроскопию [7]. Фиксированные образцы сканировали на воздухе полуконтактным методом с помощью сканирующего микроскопа серии Solver BIO (NT-MDT, Россия). Полученные образцы содержали сферические микровезикулы размером 30–130 нм, что соответствовало фракции ЭС.

Типирование и количественное определение ЭС методом иммуноферментного анализа (ELISA) проводили по методике производителя (System Biosciences (SBI), США). Иммуноферментный анализ и обработку результатов выполняли с помощью прибора Bio-Rad 680. При построении линейной калибровочной кривой осуществляли регрессионный анализ.

Получение лизатов ЭС. Готовили 1 мл лизирующего буфера (Sigma Aldrich, США) по методике производителя. Все процедуры выполняли при температуре

+4 °C. В пробирки, содержащие 250 мкл суспензии ЭС в ФБР, добавляли 100 мкл лизирующего буфера, инкубировали в течение 15 мин в охлаждаемом шейкере Thermomixer Comfort (Eppendorf, Германия) и центрифугировали в течение 15 мин при температуре +4 °C в охлаждаемой центрифуге Centrifuge 5415F (Eppendorf, Германия) при 13 000 об/мин. Супернатанты отбирали и очищали от низкомолекулярных соединений с помощью Agilent Spin Concentrators for Proteins 5 кДа (США) по методике производителя. В пробах измеряли концентрацию белка и объединяли по 3 образца для каждой группы больных (ММ и РС) для дальнейшего исследования.

Подготовку образцов для протеомного картирования, анализ нано-ВЭЖХ-МС/МС и обработку полученных данных проводили по методикам, описанным ранее [8].

Результаты

ЭС выделяли путем последовательного центрифугирования плазмы крови, обедненной тромбоцитами и эритроцитами, которое состояло из нескольких этапов. Вначале проводили центрифугирование плазмы крови на малой (1500g) скорости для удаления мертвых клеток и крупных продуктов апоптоза, а затем центрифугировали на более высоких (15000g) скоростях, что позволяло удалять большие везикулы и продукты клеточного распада. Введенная нами дополнительно процедура фильтрования плазмы крови через 0,22 мкм фильтр избавляла от внеклеточных везикул с размером частиц >100 мкм и позволяла получать более чистые фракции ЭС. Фильтрат подвергали ультрацентрифугированию при 100 000g в течение 2 ч. Первая промывка снижала концентрацию высокопредставленных белков плазмы крови в образцах ЭС в ~50 раз. Двукратная промывка уменьшала уровни белков плазмы крови в ~140 раз по сравнению с исходным уровнем.

Типирование ЭС проводили по маркерам CD63 и CD81. Согласно полученным данным по маркеру CD63 количество ЭС, например, в пробах больного миеломой и больного РС составило 4,08E9 и 5,42E9 частиц/мл соответственно. По маркеру CD81 — 2,59E9 и 5,83E9 частиц/мл, что указывает на хорошее согласование данных по 2 маркерам.

Идентификацию белков в лизатах ЭС плазмы крови проводили с использованием label-free количественного протеомного анализа нано-ВЭЖХ-МС/МС. Разработанная нами методика позволила получить 2574 спектра МС/МС. С помощью программного пакета MaxQuant были просеквенированы 332 протеина по 2363 (1464 уникальным) пептидам при сравнении с данными базы SwissProt_human и ложным уровнем обнаружения (false discovery rate) 1 % для тройных повторов одного вида образцов. Диапазон молекулярного веса масс-протеинов изменялся от 2,58 до 964,83 кДа, из них 116 имели молекулярный вес до 30 кДа, 165 — 30–100 кДа, 43 — 100–300 кДа, 3 — 300–500 кДа, 5 — более 500 кДа. Процент покрытия анализируемых

белков варьировался от 0,2 до 86,4 %, из них 215 белков с покрытием до 20 %, 65 — 20–40 %, 42 — 40–60 %, 10 — 60,0–86,4 %.

Для идентификации белков, ранее обнаруженных во внеклеточных микровезикулах, анализировали базу данных везикулярных белков Vesiclepedia (версия 3 от 9.01.2015; microvesicles.org/download). Полученные результаты показали, что из 332 белков 100 ранее были найдены непосредственно в ЭС, секретируемых разными клетками, 46 — во внеклеточных частицах плазмы крови человека, а 62 — в микрочастицах крови. В микрочастицах, продуцируемых клетками различных видов рака, обнаружен 231 протеин. Анализ базы данных показал, что среди идентифицированных в ЭС протеинов часть выявлена ранее в микровезикулах, секретируемых лимфоцитами (126 протеинов), моноцитами (74 протеина), дендритными клетками (165 протеинов), нейтрофилами (116 протеинов), мезенхимальными стволовыми клетками (164 протеина), нейральными стволовыми клетками (2 протеина).

Таблица 1. Протеины, обычно представленные в экстраклеточных везикулах и идентифицированные в экзосомах плазмы крови больных множественной миеломой и рассеянным склерозом

Table 1. Proteins usually present in extracellular vesicles and identified in plasma exosomes of patients with multiple myeloma and multiple sclerosis

Количество идентифицированных пептидов Number of peptides identified	Молекулярный вес, кДа Molecular weight, kDa	Название протеина Protein name	Индекс гена Gene index
13	38,579	Актин, альфа скелетальный Actin alpha skeletal	<i>ACTA1</i>
24	41,792	Актин, цитоплазматический 2 Actin, cytoplasmic 2	<i>ACTB</i>
3	15,906	Тетраспанин; CD9 антиген Tetraspanin; CD9 antigen	<i>CD9</i>
2	14,265	Тетраспанин; CD63 антиген Tetraspanin; CD63 antigen	<i>CD63</i>
3	17,963	Тетраспанин; CD81 антиген Tetraspanin; CD81 antigen	<i>CD81</i>
3	29,643	Тетраспанин; CD82 антиген Tetraspanin; CD82 antigen	<i>CD82</i>
2	20,564	Тетраспанин 2 Tetraspanin 2	<i>TSPAN2</i>

2	23,918	Тетраспанин 14 Tetraspanin 14	<i>TSPAN14</i>
5	16,811	Кофилин 1 Cofilin 1	<i>CFL1</i>
7	36,053	Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>
5	129,29	Интегрин альфа 2 Integrin alpha 2	<i>ITGA2</i>
11	126,6	Интегрин альфа 6 Integrin alpha 6	<i>ITGA6</i>
32	113,38	Интегрин альфа IIb Integrin alpha IIb	<i>ITGA2B</i>
2	128,77	Интегрин альфа L Integrin alpha L	<i>ITGAL</i>
2	127,18	Интегрин альфа M Integrin alpha M	<i>ITGAM</i>
8	88,414	Интегрин бета 1 Integrin beta 1	<i>ITGB1</i>
5	77,354	Интегрин бета 2 Integrin beta 2	<i>ITGB2</i>
29	87,057	Интегрин бета 3 Integrin beta 3	<i>ITGB3</i>
18	67,819	Моэзин Moesin	<i>MSN</i>
9	15,054	Профилин 1 Profilin 1	<i>PFN1</i>
6	49,897	Пируваткиназа Pyruvate kinase	<i>PKM</i>
2	27,307	Тубулин бета n Tubulin beta n	<i>TUBB</i>
2	50,326	Тубулин бета 1 Tubulin beta 1	<i>TUBB1</i>
1	45,696	Тубулин бета 8 Tubulin beta 8	<i>TUBB8</i>

Разработанный метод позволил обнаружить известные маркерные белки мембран ЭС (табл. 1), такие как тетраспанины CD9, CD63, CD81, CD82 и др., что дополнительно подтвердило чистоту популяции ЭС, полученных нашим методом.

Данные протеомного картирования белков лизатов ЭС плазмы крови человека подвергали сравнительному биоинформационному анализу. По данным открытых баз, 332 протеинам, идентифицированным в лизатах ЭС, соответствовали 270 генов. Большая часть

белков относилась к ЭС (61,1 %), микровезикулам, продуцируемым форменными элементами крови (25,2 %), протеинам МНС класса I (16,8 %), мембранам фагоцитируемых везикул (18,5 %), интегральным компонентам люминальной стороны мембраны эндоплазматического ретикулума (17,3 %), мембранам эндосом (18,0 %).

Протеины дополнительно картировали по биологической роли в клетке, молекулярной функции и функциональному классу в соответствии с протеомно-геномной аналитической программой PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships; www.pantherdb.org).

Основная часть идентифицированных протеинов участвует в клеточных (GO: 0009987; 22,8 %) и метаболических (GO: 0008152; 14,5 %) процессах, а также в процессах отклика на стимулы (GO: 0050895; 10,7 %), локализации (GO: 0051179; 10,1 %), иммунных процессах (GO: 0002376; 9,9 %), биологической регуляции (GO: 0065007; 9,0 %). Большая часть белков проявляла каталитическую (GO: 0003824; 31,4 %), связывающую (GO: 0005488; 37,1 %), структурно-молекулярную (GO: 0005198; 12,9 %), транспортную (GO: 0005215; 9,0 %) и рецепторную (GO: 0004872; 6,7 %) активность. Основная часть белков представлена следующими классами: сигнальные молекулы (GO: PC00207; 12,3 %), гидролазы (GO: PC00121; 9,7 %), модуляторы энзимов (GO: PC00095; 10,7 %), рецепторы (GO: PC00197; 9,1 %).

При поиске потенциальных маркеров ММ использовали дифференциально экспрессированные белки (ДЭБ), уровни которых статистически значимо увеличивались более чем в 2 раза в ЭС плазмы крови больных ММ по сравнению с РС. Полученные данные представлены в табл. 2 и включают 12 протеинов, из которых фруктозобисфосфат-альдолаза (ALDOA), басигин (BSG), гомолог протеина 42, контролирующего клеточное деление (CDC42), молекула плотных межклеточных контактов A (JAM-A или F11R) детектировались нашим методом только в ЭС плазмы крови больных миеломой.

Обсуждение

Наиболее распространенными протеинами ЭВ являются белки мембранного транспорта и слитые белки (аннексины, GTPases и флотиллины), тетраспанины, белки теплового шока, белки, участвующие в биогенезе мультивезикулярного комплекса, а также фосфолипазы [9].

Семейство тетраспанинов включает большое количество протеинов, имеющих схожую структуру и экспрессирующихся на поверхности клеток и/или на внутриклеточных везикулах. Как видно из табл. 1, нами обнаружены 6 тетраспанинов.

Роль тетраспанинов отмечена в таких фундаментальных биологических процессах, как дифференцировка, пролиферация, адгезия, миграция, иммунный ответ и др. Тетраспанины участвуют в сортировке содер-

жимого микровезикул, а их набор служит «паролем» для попадания ЭС в определенные типы клеток [10]. Доказана связь этого семейства белков с канцерогенезом. Показано существование фенотипически-геномной корреляции экспрессии CD81 у пациентов с миеломой [11]. По мнению авторов, повышенная экспрессия CD81 в плазматических клетках при миеломе является независимым неблагоприятным прогностическим фактором для пациентов с симптоматической ММ.

Список белков, взаимодействующих с тетраспанинами, многообразен и включает интегрины, которые играют важную роль при межклеточных контактах, контроле миграции клеток, в осуществлении клеточного цикла и апоптозе клеток. Они регулируют эти функции в синергизме с другими сигнальными путями, включая тетраспанины в различных типах клеток человека [12]. Как видно из табл. 1, в ЭС были идентифицированы 8 интегринов, что указывает на важную роль ЭС в переносе этих протеинов для обмена информацией при межклеточном взаимодействии. Интегрины присутствуют на клеточной поверхности и воздействуют на различные компоненты внеклеточного матрикса и сигналы, исходящие от клеток микроокружения. Они формируют интегринзависимый сигналинг для регулирования пролиферации, миграции, инвазии, апоптоза и ангиогенеза [13].

Тетраспанины также активно взаимодействуют с матриксными металлопротеиназами (ММР), образуя комплексы [14]. Мы идентифицировали в ЭС больных склерозом ММР-8 и ММР-9, в то время как в ЭС больных ММ их уровни оказались за пределами чувствительности метода.

В дополнение к названным, в ЭВ повышены уровни цитоскелетных белков (актины, кофилин 1, эзрин/радиксин/мозин, профилин 1 и тубулины), метаболических ферментов (энолазы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, пероксиредоксины и пируваткиназа), интегринов, рибосомальных белков. Представители этих классов, обнаруженные в ЭС плазмы крови, полученной от больных ММ и РС, представлены в табл. 1.

В последнее время уделяется повышенное внимание внеклеточным везикулам из-за их важной роли в биологии раковых клеток, включая иммунный ответ, резистентность к противоопухолевым препаратам, метастазирование [15, 16]. Везикулярный протеом является перспективным источником для открытия биомаркеров. При разработке методики профилирования белкового состава ЭС плазмы крови человека в качестве объектов исследования были выбраны онкологическая и неонкологическая патологии (ММ и РС). Картирование протеома ЭС выполняли для 3 объединенных образцов от больных ММ и 3 — от больных РС. Предполагалось, что такой выбор патологий приведет к значительному различию в белковом содержимом ЭС, а использование дополнительных критериев отбора позволит идентифицировать ряд ДЭБ, которые потенциально можно рассматривать в качестве маркеров

миеломы. Несмотря на существенное различие в патологиях, анализ показал близость качественного состава ЭС для обеих групп: из 332 идентифицированных белков 261 протеин обнаружен в ЭС как больных ММ, так и РС. Различия зафиксировали для 72 протеинов, 40 из которых были идентифицированы только в ЭС плазмы крови больных ММ, а 32 — при РС. Отбор ДЭБ в качестве потенциальных маркеров ММ осуществляли с учетом выполнения всех нижеперечисленных критериев.

- Белки были ранее обнаружены в ЭВ линий клеток ММ [17].
- Протеины ранее наблюдали в ЭВ, полученных из костного мозга больных ММ [17].
- Уровни их экспрессии в ЭС больных ММ должны быть статистически значимо >2 по сравнению с РС.

Дополнительно проводили анализ данных других исследователей на предмет участия этих протеинов в канцерогенезе. Как видно из табл. 2, всем 3 критериям отбора удовлетворяли 11 протеинов, исключение составил F11R, который не обнаружен в ЭВ костного мозга больных ММ.

По нашему мнению, этому списку белков необходимо уделить в дальнейшем повышенное внимание, в частности провести их валидацию на большем количестве образцов при сравнении ЭС плазмы крови больных ММ с ЭС от доноров. Ниже представлена краткая аннотация биологической роли этих белков в канцерогенезе.

Фруктозобисфосфат-альдолаза, член семейства гликолитических ферментов, катализирующий обратимую конверсию фруктозо-1,6-бисфосфата в глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетонфосфат, представлена изомерами ALDOA, ALDOB и ALDOC. ALDOB участвует как в гликолизе, так и в глюконеогенезе, тогда как ALDOA и ALDOC в основном в гликолизе. Сообщается, что ALDOA активирована в различных типах опухолевых клеток [18]. В нашем опыте ALDOA определялась только в ЭС больных ММ и может рассматриваться как один из потенциальных маркеров ММ.

Аннексины представляют собой высококонсервативные Ca^{2+} -зависимые мембраносвязывающие белки, которые проявляют широкий спектр функций при клеточном развитии и дифференцировке. **Аннексин A2 (ANXA2)** способствует росту клеток миеломы, снижает апоптоз в линиях этих клеток и увеличивает образование остеокластов. ANXA2 экспрессируется клетками миеломы и клетками микросреды костного мозга. Высокая экспрессия ANXA2 в клетках миеломы ассоциируется со значительным снижением общей выживаемости независимо от обычных прогностических факторов [19].

Аннексин A6 (ANXA6) участвует в организации клеточной мембраны и цитоскелета, гомеостазе холестерина, нарушении обмена веществ, клеточной адгезии и трансдукции внутриклеточных сигналов. Уровни экспрессии ANXA6 тесно ассоциируются с многими

видами злокачественных новообразований, включая миелому (повышенная экспрессия). ANXA6 проявляет двойственные функции при раке, действуя либо как супрессор опухоли, либо как промотор в зависимости от типа рака и степени злокачественности [20]. Как видно из табл. 2, содержание ANXA2 и ANXA6 в ЭС больных ММ было выше в 3,4 и 2,6 раза соответственно по сравнению с РС.

Как отмечалось выше, внеклеточные MMP взаимодействуют с тетраспанинами и играют решающую роль в деградации белков. Они также включаются в пролиферацию, миграцию, дифференцировку, ангиогенез и апоптоз. Индуктор MMP (EMMPRIN), также известный как CD147 или **BSG**, представляет собой внутримембранный гликопротеин, продуцируемый в сетчатке, роговице, кератоцитами и нейронами [21]. Сверхэкспрессия BSG обнаружена во многих типах неопластических клеток [22]. Отмечена важная роль клеток миеломы в продукции и высвобождении металлопротеиназ в микроокружение. MMP-9 оказывает заметное влияние на прогрессирование заболевания и образование остеолитических повреждений [23]. Следует отметить, что содержание MMP-8 и MMP-9 в ЭС плазмы крови больных ММ не детектировалось нашим методом. Это указывает на слабую секрецию MMP-8 и MMP-9 клетками ММ в составе ЭВ, что подтверждается данными работы S.W. Harshman и соавт. [17].

Эзрин, член семейства белков-линкеров, действующих как сшивающий агент между мембранами и актиновым цитоскелетом, тем самым регулируя связь клеток с клетками и клеток с внеклеточным матриксом и подвижность клеток. Эзрин участвует в регуляции клеточной морфологии, клеточной адгезии и модуляции внутриклеточных сигнальных путей. Он экспрессируется во многих видах неопластических тканей и в значительно большей степени при злокачественных опухолях мезенхимного происхождения (саркомы) [24]. Уменьшение экспрессии эзрина обращает процесс эпителиально-мезенхимального перехода через изменение экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и снижение регуляции транскрипционных факторов [25].

ЈАМ-А представляет собой белок суперсемейства иммуноглобулинов, кодируемый геном *F11R*, и экспрессируется на циркулирующих нейтрофилах, моноцитах, лимфоцитах и тромбоцитах. Он регулирует образование плотных межклеточных контактов, трансмиграцию лейкоцитов (прохождение клеток через межэндотелиальные пространства и неповрежденные стенки капилляров и венул), дифференцировку эндотелиальных клеток-предшественников и активацию тромбоцитов [26]. Начинают появляться сообщения о роли ЈАМ-А как важного неблагоприятного прогностического показателя при регуляции опухолевой прогрессии и появления метастазов [27]. Имеются сообщения о высокой экспрессии ЈАМ-А в клетках ММ, ассоциированной с уменьшением выживаемости [28].

Таблица 2. Потенциальные маркеры множественной миеломы, идентифицированные в экзосомах плазмы крови

Table 2. Potential markers for multiple myeloma identified in plasma exosomes

Интенсивность сигнала (рассеянный склероз), произвольные единицы Signal intensity (multiple sclerosis), arbitrary units	Интенсивность сигнала (множественная миелома), произвольные единицы Signal intensity (multiple myeloma), arbitrary units	Название протеина Protein name	Индекс гена Gene index	Экстраклеточные везикулы клеток миеломы Extracellular vesicles of myeloma cell	Экстраклеточные везикулы костного мозга при миеломе Extracellular vesicles of bone marrow in myeloma
НД ND	150200	Фруктозобисфосфат-альдолаза Fructosebiphosphate aldolase	<i>ALDOA</i>	+	+
151460	514770	Аннексин А2 Annexin A2	<i>ANXA2</i>	+	+
674980	1526600	Аннексин А6 Annexin A6	<i>ANXA6</i>	+	+
1847600	4090700	Rho GDP ингибитор диссоциации 2 Rho GDP dissociation inhibitor 2	<i>ARHGDI2</i>	+	+
НД	80027	Басигин (EMMPRIN) Basigin (EMMPRIN)	<i>BSG</i>	+	+
НД	130400	Гомолог протеина 42, контролирующего клеточное деление Cell division control protein 42 homolog	<i>CDC42</i>	+	+
156690	902420	Эзрин Ezrin	<i>EZR</i>	+	+
НД	190320	Молекула плотных межклеточных контактов А Tight junction molecule A	<i>F11R</i>	+	+
254010	575720	Rab GDP ингибитор диссоциации бета Rab GDR dissociation inhibitor beta	<i>GDI2</i>	+	+
2729600	5887200	Белок теплового шока 5 Heat shock protein 5	<i>HSPA5</i>	+	+
46668	98995	Пластин 2 Plastin 2	<i>LCP1</i>	+	+
74800	215250	Дисульфид-изомераза А6 Disulfide isomerase A6	<i>PDIA6</i>	+	+

Примечание. НД — не детектируется.

Note. ND — non-detectable.

Rab GDP ингибитор диссоциации бета (GDI2) является членом семейства ингибиторов диссоциации гуанозиндифосфата, контролирующего рециркуляцию Rab GTPases, участвующих в мембранном трафике и необходимых для уменьшения адгезии и увеличения миграции раковых клеток, контролируя таким образом опухолевую прогрессию [29]. GDI2 действует в качестве регулирующего фактора для Rab-белков при развитии

многих опухолей. Результаты протеомного анализа показали, что экспрессия GDI2 в опухолевой ткани рака желудка [30] и рака яичников [31] снижена по сравнению с таковой в нормальной ткани. В нашем эксперименте наблюдалось увеличение в 2,3 раза экспрессии GDI2 в ЭС плазмы крови больных ММ по сравнению с РС.

Активация нарушений фолдинга (сворачивания) белков, названного нефолдинговым белковым ответом,

существенна при солидных опухолях и коррелирует с агрессивными типами рака [32]. Поскольку синтез белка возрастает в быстрорастущих солидных опухолях, раковые клетки нуждаются в усилении функционирования эндоплазматического ретикулаума [33]. **Белок теплового шока 5 (HSPA5)**, также известный как GRP78/BiP, является главным шапероном эндоплазматического ретикулаума, который отвечает за нефолдинговый белковый ответ и участвует во многих клеточных процессах, которые способствуют правильному фолдингу белков и предотвращают агрегацию вновь синтезированных протеинов [34]. Сверхэкспрессия HSPA5 отмечалась в опухолях различных локализаций, включая легкие, молочную железу, предстательную железу, толстую кишку, желудок и печень [35]. HSPA5 проявляет онкогенную активность, способствуя пролиферации, выживанию, метастазированию и лекарственной устойчивости опухолевых клеток, и его активность ассоциируется со злокачественностью новообразования и плохим прогнозом [36]. Мы также зафиксировали увеличение уровня HSPA5 в ЭС больных ММ в 2,16 раза.

Семейство человеческих пластеинов включает 3 белковые изоформы: Т-пластеин (PLS3), **Л-пластеин (LCP1)** и I-пластеин (PLS1), кодируемые различными генами. PLS1 специфически экспрессируется в клетках тонкой кишки и почки. Клеточная специфичность других изоформ (PLS3 и LCP1) регулируется физиологическими условиями. PLS3 экспрессируется в широком спектре клеток, за исключением гемопоэтических. Эктопическая экспрессия пластеинов в злокачественных клетках отмечалась во многих исследованиях [37]. Большинство неопластических клеток, полученных из солидных опухолей, также экспрессируют PLS3. В то же время LCP1 экспрессируется в клетках большинства случаев рака человека и линий гемопоэтических клеток [37]. В частности, повышенная экспрессия LCP1 играет значительную роль в пролиферации и инвазии линий клеток рака толстой кишки [38]. Считается, что LCP1 влияет на клеточную адгезию и подвижность через связывание актина [39].

PDIA6 является членом семейства дисульфид-изомераз (PDI) с тиоредоксиноподобным доменом. Члены семейства PDI функционируют как изомеразы и молекулярные шапероны и играют важную роль во многих биологических процессах. Однако точная

функция и молекулярные механизмы участия PDIA6 в канцерогенезе и противоопухолевой лекарственной устойчивости остаются в значительной степени неизвестными. В последние годы результаты многих исследований показали, что PDIA6 сверхэкспрессируется в клетках рака молочной железы и играет важную роль в иммунопрофилактике опухолевого роста. PDIA6 может способствовать развитию рака и резистентности к противоопухолевым препаратам, активируя сигнальный каскад Wnt/ β -катенин. По мнению ряда авторов, PDIA6 может быть потенциальной мишенью при таргетной терапии некоторых злокачественных новообразований [40]. По сравнению с ЭС больных РС уровень PDIA6 у больных ММ возрастает в 2,9 раза.

Заключение

В результате поискового исследования унифицирована и апробирована методика получения ЭС из плазмы крови человека, обедненной тромбоцитами и эритроцитами. Проведено типирование ЭС по маркерам CD63 и CD81, подтвердившее высокий выход ЭС и их чистоту. Разработан метод нано-ВЭЖХ-МС/МС анализа протеома ЭС плазмы крови человека, что позволило впервые идентифицировать 332 белка в образцах ЭС от больных ММ и РС.

Впервые обнаружены ДЭБ, уровни которых заметно повышены в ЭС плазмы пациентов со злокачественным поражением миеломных тканей. Биоинформационный анализ полученных результатов и сравнение их с данными литературы позволили обнаружить 12 полипептидов, статистически значимо различающихся в злокачественных неоплазиях и неонкологических поражениях нервной ткани (ММ и РС). Безусловно, это требует дополнительных исследований по валидации каждого из белков с использованием различных контролей, включая доноров. Мы предполагаем, что идентификация таких протеинов в клинических исследованиях позволит предварительно рассматривать их в качестве потенциальных маркеров ММ. Определение валидированных белков в ЭС и других микровезикулах плазмы крови или костном мозге в дальнейшем, по нашему мнению, может явиться очень перспективным тестом при мониторинге и лечении больных ММ с учетом проводимых при лечении последовательных аутологических и/или аллогенных трансплантаций костного мозга.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC Cancer Base 2012;11:1–10.
2. Kumar S.K., Rajkumar S.V., Dispenzieri A. et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008;111(5):2516–20. DOI: 10.1182/blood-2007-10-116129. PMID: 17975015.
3. Roccaro A.M., Sacco A., Maiso P. et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest* 2013;123(4):1542–55. DOI: 10.1172/JCI66517. PMID: 23454749.
4. Damiano J.S., Cress A.E., Hazlehurst L.A. et al. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 1999;93(5):1658–67. PMID: 10029595.
5. Thery C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol*

- Rep 2011;3:15. DOI: 10.3410/B3-15. PMID: 21876726.
6. Wang J., Hendrix A., Hernot S. et al. Bone marrow stromal cell-derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells. *Blood* 2014;124(4):555–66. DOI: 10.1182/blood-2014-03-562439. PMID: 24928860.
7. Samsonov R., Burdakov V., Shtam T. et al. Plasma exosomal miR-21 and miR-181a differentiates follicular from papillary thyroid cancer. *Tumour Biol* 2016;37(9):12011–21. DOI: 10.1007/s13277-016-5065-3. PMID: 27164936.
8. Bryukhovetskiy I., Shevchenko V. Molecular mechanisms of the effect of TGF- β 1 on U87 human glioblastoma cells. *Oncol Lett* 2016;12(2):1581–90. DOI: 10.3892/ol.2016.4756. PMID: 27446475.
9. Pocsfalvi G., Stanly C., Vilasi A. et al. Mass spectrometry of extracellular vesicles. *Mass Spectrom Rev* 2015;35(1):3–21. DOI: 10.1002/mas.21457. PMID: 25705034.
10. Andreu Z., Yanez-Mo M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* 2014;5:442. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00442. PMID: 25278937.
11. Paiva B., Gutierrez N.C., Chen X. et al. Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients. *Leukemia* 2012;26(8):1862–9. DOI: 10.1038/leu.2012.42. PMID: 22333880.
12. Maecker H.T., Todd S.C., Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 1997;11(6):428–42. PMID: 9194523.
13. Stupack D.G., Cheresh D.A. Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol* 2004;64:207–38. DOI: 10.1016/S0070-2153(04)64009-9. PMID: 15563949.
14. Schroder H.M., Hoffmann S.C., Hecker M. et al. The tetraspanin network modulates MT1-MMP cell surface trafficking. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45(6):1133–44. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.02.020. PMID: 23500527.
15. Azmi A.S., Bao B., Sarkar F.H. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metast Rev* 2013;32(3–4):623–42. DOI: 10.1007/s10555-013-9441-9. PMID: 23709120.
16. Kahlert C., Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* 2013;91(4):431–7. DOI: 10.1007/s00109-013-1020-6. PMID: 23519402.
17. Harshman S.W., Canella A., Ciarlariello P.D. et al. Proteomic characterization of circulating extracellular vesicles identifies novel serum myeloma associated markers. *J Proteomics* 2016;136:89–98. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.12.016. PMID: 26775013.
18. Chen X., Yang T.T., Zhou Y. et al. Proteomic profiling of osteosarcoma cells identifies ALDOA and SULT1A3 as negative survival markers of human osteosarcoma. *Mol Carcinog* 2014;53(2):138–44. DOI: 10.1002/mc.21957. PMID: 22949271.
19. Seckinger A., Meissner T., Moreaux J. et al. Clinical and prognostic role of annexin A2 in multiple myeloma. *Blood* 2012;120(5):1087–94. DOI: 10.1182/blood-2012-03-415588. PMID: 22705595.
20. Qi H., Liu S., Guo C. et al. Role of annexin A6 in cancer. *Oncol Lett* 2015;10(4):1947–52. DOI: 10.3892/ol.2015.3498. PMID: 26622779.
21. Yan L., Zucker S., Toole B.P. Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thromb Haemost* 2005;93(2):199–204. DOI: 10.1160/TH04-08-0536. PMID: 15711733.
22. Yaccoby S. Advances in the understanding of myeloma bone disease and tumor growth. *Br J Haematol* 2010;149(3):311–21. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08141.x. PMID: 20230410.
23. Zdzisinska B., Walter-Croneck A., Kandefer-Szerszen M. Matrix metalloproteinases-1 and -2, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 production is abnormal in bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients. *Leuk Res* 2008;32(11):1763–9. DOI: 10.1016/j.leukres.2008.04.001. PMID: 18472160.
24. Bruce B., Khanna G., Ren L. et al. Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers. *Clin Exp Metastasis* 2007;24(2):69–78. DOI: 10.1007/s10585-006-9050-x. PMID: 17370041.
25. He J., Ma G., Qian J. et al. Interaction between ezrin and cortactin in promoting epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells. *Med Sci Monit* 2017;23:1583–96. PMID: 28364518.
26. Fraemohs L., Koenen R.R., Ostermann G. et al. The functional interaction of the beta 2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1 with junctional adhesion molecule-A is mediated by the I domain. *J Immunol* 2004;173(10):6259–64. PMID: 15528364.
27. Zhang M., Luo W., Huang B. et al. Overexpression of JAM-A in non-small cell lung cancer correlates with tumor progression. *PLoS One* 2013;8(11):e79173. DOI: 10.1371/journal.pone.0079173. PMID: 24265754.
28. Kelly K.R., Espitia C.M., Zhao W. et al. Junctional adhesion molecule-A is overexpressed in advanced multiple myeloma and determines response to oncolytic reovirus. *Oncotarget* 2015;6(38):41275–89. DOI: 10.18632/oncotarget.5753. PMID: 26513296.
29. Subramani D., Alahari S.K. Integrin-mediated function of Rab GTPases in cancer progression. *Mol Cancer* 2010;9:312. DOI: 10.1186/1476-4598-9-312. PMID: 21143914.
30. Bai Z., Ye Y., Liang B. et al. Proteomics-based identification of a group of apoptosis-related proteins and biomarkers in gastric cancer. *Int J Oncol* 2011;38(2):375–83. DOI: 10.3892/ijo.2010.873. PMID: 21165559.
31. Lee D.H., Chung K., Song J.A. et al. Proteomic identification of paclitaxel-resistance associated hnRNP A2 and GDI2 proteins in human ovarian cancer cells. *J Proteome Res* 2010;9(11):5668–76. DOI: 10.1021/pr100478u. PMID: 20858016.
32. Ma Y., Hendershot L.M. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer* 2004;4(12):966–77. DOI: 10.1038/nrc1505. PMID: 15573118.
33. Lee A.S. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 2001;26(8):504–10. PMID: 11504627.
34. Ni M., Lee A.S. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* 2007;581(19):3641–51. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.04.045. PMID: 17481612.
35. Shuda M., Kondoh N., Imazeki N. et al. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2003;38(5):605–14. PMID: 12713871.
36. Dong D., Stapleton C., Luo B. et al. A critical role for GRP78/BiP in the tumor microenvironment for neovascularization during tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2011;71(8):2848–57. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3151. PMID: 21467168.
37. Park T., Chen Z.P., Leavitt J. Activation of the leukocyte plastin gene occurs in most human cancer cells. *Cancer Res* 1994;54(7):1775–81. PMID: 8137292.
38. Foran E., McWilliam P., Kelleher D. et al. The leukocyte protein L-plastin induces proliferation, invasion and loss of E-cadherin expression in colon cancer cells. *Int J Cancer* 2006;118(8):2098–104. DOI: 10.1002/ijc.21593. PMID: 16287074.
39. Klemke M., Rafael M.T., Wabnitz G.H. et al. Phosphorylation of ectopically expressed L-plastin enhances invasiveness of human melanoma cells. *Int J Cancer* 2007;120(12):2590–9. DOI: 10.1002/ijc.22589. PMID: 17290393.
40. Gao H., Sun B., Fu H. et al. PDIA6 promotes the proliferation of HeLa cells through activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncotarget* 2016;7(33):53289–98. DOI: 10.18632/oncotarget.10795. PMID: 27462866.

Вклад авторов

В.Е. Шевченко: протеомный анализ экзосом, анализ литературы, написание текста рукописи;
А.С. Брюховецкий: разработка дизайна исследования, забор клинического материала;
М.В. Филатов: определение и визуализация экзосом;
В.С. Бурдаков: определение и визуализация экзосом методом атомно-силовой микроскопии;
З.Н. Никифорова: типирование экзосом методом иммуноферментного анализа;
И.С. Брюховецкий: биоинформационный анализ полученных данных;
Ю.Д. Василец: получение экзосом дифференциальным центрифугированием;
Т.И. Кушнир: очистка экзосом методом ультрафильтрации;
Н.Е. Арноцкая: подготовка образцов экзосом для протеомного анализа.

Authors' contributions

V.E. Shevchenko: proteomic analysis of exosomes, literature analysis, article writing;
A.S. Bryukhovetskiy: study design development, clinical sampling;
M.V. Filatov: identification and visualization of exosomes;
V.S. Burdakov: identification and visualization of exosomes using atomic force microscopy;
Z.N. Nikiforova: exosome typing using ELISA;
I.S. Bryukhovetskiy: bioinformatics of the data;
Yu.D. Vasilets: exosome extraction by differential centrifugation;
T.I. Kushnir: exosome purification using ultrafiltration;
N.E. Arnotskaya: preparation of exosome samples for proteomic analysis.

ORCID авторов

В.Е. Шевченко: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>
А.С. Брюховецкий: <https://orcid.org/0000-0002-3141-1529>
М.В. Филатов: <https://orcid.org/0000-0003-3908-3061>
В.С. Бурдаков: <https://orcid.org/0000-0001-6025-7367>
З.Н. Никифорова: <https://orcid.org/0000-0001-7657-3735>
И.С. Брюховецкий: <https://orcid.org/0000-0003-3654-3069>
Ю.Д. Василец: <https://orcid.org/0000-0002-6367-3785>
Т.И. Кушнир: <https://orcid.org/0000-0001-9626-6847>
Н.Е. Арноцкая: <https://orcid.org/0000-0002-0154-8604>

ORCID of authors

V.E. Shevchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>
A.S. Bryukhovetskiy: <https://orcid.org/0000-0002-3141-1529>
M.V. Filatov: <https://orcid.org/0000-0003-3908-3061>
V.S. Burdakov: <https://orcid.org/0000-0001-6025-7367>
Z.N. Nikiforova: <https://orcid.org/0000-0001-7657-3735>
I.S. Bryukhovetskiy: <https://orcid.org/0000-0003-3654-3069>
Yu.D. Vasilets: <https://orcid.org/0000-0002-6367-3785>
T.I. Kushnir: <https://orcid.org/0000-0001-9626-6847>
N.E. Arnotskaya: <https://orcid.org/0000-0002-0154-8604>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 05.02.2018. **Принята к публикации:** 15.02.2018.

Article received: 05.02.2018. **Accepted for publication:** 15.02.2018.