

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Определение
химиорезистентности клеток
рака яичников in vitro*

*Молекулярно-генетические
критерии синдрома Линча*

*Метилирование гена Sept9
при гепатоцеллюлярной
карциноме*

*Противоопухолевая активность
кураксина CBL0137*

ТОМ 6 № 4
2019



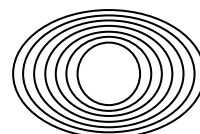
Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук.

Журнал включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор, зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью идентификатора цифрового объекта (DOI).

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



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

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

Е Ж Е К В А Р Т А Л Ь Н Ы Й Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й Р Е Ц Е Н З И Р У Е М Ы Й Ж У Р Н А Л

Главная задача журнала «Успехи молекулярной онкологии» – публикация современной информации о проведенных фундаментальных и клинико-экспериментальных исследованиях в области молекулярной онкологии.

Цель издания – дать читателям представление об актуальных направлениях современной молекулярной онкологии, представить наиболее значимые работы отечественных и зарубежных исследователей в этой области, создать общую площадку, на которой специалисты разных областей, включая онкологов, молекулярных биологов, генетиков, биохимиков, вирусологов, химиотерапевтов, смогут поделиться результатами своих научных исследований.

4 ТОМ 6
'19

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

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

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

Прием статей:
онлайн на сайте

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

*Выпускающий редактор Н.В. Жукова
Корректор Р.В. Журавлёва
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка Е.С. Останкова*

*Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru*

*Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору*

*в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций
(ПИ № ФС77-57560 от 08.04.2014 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.
2019. Том 6. № 4. 1–76

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2019

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»

Тираж 1000 экз.

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)

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

Бойчук Сергей Васильевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей патологии, декан медико-биологического факультета ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Казань, Россия)

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

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

Животовский Борис Давидович, д.б.н., профессор, лауреат Государственной премии СССР, заведующий лабораторией исследования механизмов апоптоза факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», профессор Каролинского института (Стокгольм, Швеция)

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

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

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 Мангейма университета Гейдельберга (Гейдельберг, Германия)

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

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

Мишкин 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 имени П.А. Герцена — филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., директор Департамента комплексных программ и проектов Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (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)

Юрисич Владимир, профессор факультета медицинских наук Университета Крагуеваца (Крагуевац, Сербия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

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

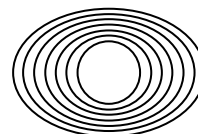
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

The journal is included in the Scientific Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor; it is registered in the CrossRef, its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

The journal's electronic version is available in the DOAJ.

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

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



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

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

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

The main objective of the journal "Advances in Molecular Oncology" is publication of current information on basic, clinical and experimental research in molecular oncology.

The publication aim to provide insight into currently important areas of modern molecular oncology; present the most significant studies from Russian and foreign specialists in this field; create a forum for various researchers, including oncologists, molecular biologists, geneticists, biochemists, virologists, chemotherapists to share the results of their scientific research.

FOUNDED IN 2014

4^{Vol. 6}
'19

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 R.V. Zhuravlyova
Designer E.V. Stepanova
Maker-up E.S. Ostankova

Subscription & Distribution Service
I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

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

Technologies, and Mass Media
(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. 2019. Vol. 6
No. 4. 1—76

© PH "ABV-Press", 2019

Pressa Rossii catalogue
index: 93562

Printed at the Mediacolor LLC
1,000 copies

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

EXECUTIVE EDITOR

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

EDITORIAL BOARD

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

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

Boychuk Sergey V., MD, PhD, Professor, Head of the Department of General Pathology, Dean of the Faculty of Medicine and Biology, Kazan State Medical University (Kazan, Russia)

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

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

Zhivotovskiy Boris D., DSc, PhD, Professor, Laureate of the State Award of the USSR, Head of the Department of Apoptosis Mechanisms, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Professor of the Karolinska Institute (Stockholm, Sweden)

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

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

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

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

Lazarevich Natalia L., DSc, PhD, Professor, Head of the Department of the 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)

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

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

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

Stepanova Evgenia V., MD, PhD, Director of the Department of Complex Programs and Projects, Ministry of Science and Higher Education of Russia (Moscow, Russia)

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

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

Jurisc Vladimir, Professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (Kragujevac, Serbia)

EDITORIAL COUNCIL

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

Gurtsevitch Vladimir E., MD, PhD, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Viral Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

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

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

Kopnin Boris P., DSc, PhD, Professor, Head Researcher at the Cytogenetics Laboratory, Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Kubasova Irina Yu., PhD, Scientific Secretary of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

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

Lichtenstein Anatoly V., DSc, PhD, Head of the Tumor Biochemistry Group, Department of Experimental Tumor Biology of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

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

Информация для авторов

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

1. Общие правила

Статья должна сопровождаться официальным направлением учреждения, в котором проведена данная работа, с подписью руководителя, заверенной печатью учреждения.

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 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 подрисуночными 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 подрисуночной подписи. Подписи к рисункам даются на русском и английском языках на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле. Все надписи на рисунках также должны быть переведены на английский язык.

Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице. Вся информация, содержащаяся в таблице, включая ее название и примечание (если есть), должна быть переведена на английский язык.

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, 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, DOI статьи (при наличии). При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания, число страниц. В ссылках на русскоязычные источники необходимо дополнительно указывать информацию для цитирования на латинице.

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

Общие положения:

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

Материалы для публикации принимаются по адресу онлайн на сайте <http://umo.abvpress.ru/jour>.

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

К.А. Кузин, Т.И. Фетисов, Р.И. Князев, Л.Я. Фомина, Л.В. Мехеда, Е.А. Лесовая,
Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов

Определение химиорезистентности клеток рака яичников *in vitro* 8

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Н.Л. Лазаревич, П.М. Абрамов, М.Д. Федорова, И.Ф. Кустова, Д.А. Шавочкина,
А.Н. Катаргин, Н.П. Киселева, Н.А. Дьякова, И.В. Ботезату, В.Н. Кондратова,
Н.Е. Кудашкин, Ю.И. Патютко, А.В. Лихтенштейн, С.В. Винокурова

**Идентификация нового сайта метилирования в промоторном районе гена *Sept9*
для диагностики гепатоцеллюлярной карциномы 26**

А.В. Семьянихина, Н.И. Поспехова, М.Г. Филиппова, Д.А. Головина, А.О. Расулов, Л.Н. Любченко

Клинико-anamnestические и молекулярно-генетические критерии синдрома Линча 38

А.А. Вартанян, О.С. Бурова, Х.С. Вишнякова, И.В. Самойленко, В.А. Мисюрин,
Е.Е. Егоров, О.О. Рябая, М.А. Барышникова

Резистентные к вемурафенибу клетки меланомы приобретают свойства мезенхимальных стволовых клеток ... 47

Т.И. Фетисов, К.И. Кирсанов, А.А. Борунова, М.Н. Зацепина, Е.А. Лесовая, Т.Н. Заботина,
Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская

Противоопухолевая активность кураксина CBLO137 на моделях острых лейкозов *in vitro* 58

Ю.А. Хоченкова, И.Г. Дырда, Ю.С. Мачкова, Э.Ш. Соломко, Т.А. Сидорова,
Д.А. Хоченков, Е.А. Авилова

Новые подходы в 3D-моделировании роста *in vitro* первичных культур злокачественных глиом 69

REVIEWS

*K.A. Kuzin, T.I. Fetisov, R.I. Knyazev, L.Ya. Fomina, L.V. Meheda, E.A. Lesovaya,
G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov*

Determination of chemoresistance of ovarian cancer cells *in vitro* 8

EXPERIMENTAL REPORTS

*N.L. Lazarevich, P.M. Abramov, M.D. Fedorova, I.F. Kustova, D.A. Shavochkina,
A.N. Katargin, N.P. Kisseljova, N.A. Dyakova, I.V. Botezatu1, V.N. Kondratova,
N.E. Kudashkin, Yu.I. Patyutko, A.V. Lichtenstein, S.V. Vinokurova*

Identification of a new methylation site in the *Sept9* promoter region for the diagnosis of hepatocellular carcinoma 26

A.V. Semyanikhina, N.I. Pospekhova, M.G. Filippova, D.A. Golovina, A.O. Rasulov, L.N. Lyubchenko

Clinical, anamnestic, molecular and genetic criteria for Lynch syndrome 38

*A.A. Vartanian, O.S. Burova, Kh. S. Vishnyakova, I.V. Samoylenko, V.A. Misyurin,
E.E. Egorov, O.O. Ryabaya, M.A. Baryshnikova*

Vemurafenib resistant melanoma cells acquire mesenchymal stem cell-like properties 47

*T.I. Fetisov, K.I. Kirsanov, A.A. Borunova, M.N. Zatsepina, E.A. Lesovaya, T.N. Zabolina,
G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya*

Anti-cancer activity of curaxin CBL0137 on the models of acute leukemia *in vitro* 58

*Yu.A. Khochenkova, I.G. Dyrda, Yu.S. Machkova, E.Sh. Solomko, T.A. Sidorova,
D.A. Khochenkov, E.A. Avilova*

New approaches in 3D modeling of *in vitro* growth of primary cultures of malignant gliomas 69

Определение химиорезистентности клеток рака яичников *in vitro*

К.А. Кузин¹, Т.И. Фетисов¹, Р.И. Князев^{1,2}, Л.Я. Фомина¹, Л.В. Мехеда¹, Е.А. Лесовая^{1,3}, Г.А. Белицкий¹, М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,4}

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

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 123242 Москва, ул. Баррикадная, 2/1;

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

⁴ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Контакты: Константин Александрович Кузин kuzin_konstantin@mail.ru

Цель исследования — представить обоснование существующих подходов к тестированию химиорезистентности рака яичников *in vitro*, провести их сравнительный анализ и дать оценку перспектив их дальнейшего применения.

Материалы и методы. При подготовке обзора были проанализированы статьи по теме прогнозного определения химиорезистентности рака яичников к химиотерапевтическим препаратам, имеющиеся в информационных базах биомедицинской литературы SciVerse Scopus (158), PubMed (323), Web of Science (285), РИНЦ (64). В обзоре процитированы 37 современных публикаций, 12 работ из которых были опубликованы в течение последних 3 лет, а 16 статей относятся к первым публикациям по разработанным методикам, которые продолжают использовать в наши дни.

Результаты. Рассмотрены особенности основных методов оценки резистентности/чувствительности рака яичников к различным химиотерапевтическим препаратам с использованием первичных культур опухолевых клеток, получаемых из биопсийного/операционного материала. При тестировании в качестве основных оцениваемых характеристик опухолевых клеток рассмотрены пролиферативная и метаболическая активность, а также уровень клеточной гибели. Обсуждены методические особенности описываемых методов, а также перспективы их дальнейшего применения.

Заключение. Прогнозное выявление химиорезистентности рака яичников проводится на основании тестирования жизнеспособности опухолевых клеток в присутствии химиотерапевтического препарата. Обоснованием для совершенствования такого тестирования *in vitro* служат результаты исследований ключевых механизмов развития химиорезистентности опухолевых клеток.

Ключевые слова: рак яичников, платиносодержащий препарат, химиорезистентность, тест на химиорезистентность и чувствительность клеток, пролиферативная активность, жизнеспособность опухолевых клеток

Для цитирования: Кузин К.А., Фетисов Т.И., Князев Р.И. и др. Определение химиорезистентности клеток рака яичников *in vitro*. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(4):8–25.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-8-25

Determination of chemoresistance of ovarian cancer cells *in vitro*

K.A. Kuzin¹, T.I. Fetisov¹, R.I. Knyazev^{1,2}, L. Ya. Fomina¹, L.V. Meheda¹, E.A. Lesovaya^{1,3}, G.A. Belitsky¹, M.G. Yakubovskaya¹, K.I. Kirsanov^{1,4}

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

²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Health of Russia; 2/1 Barrikadnaya St., 125993 Moscow, Russia;

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

⁴Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

Objectives: to provide a rationale for existing approaches for the evaluation of chemoresistance of ovarian cancer *in vitro*, to perform a comparative analysis of the methods and to assess the perspectives of their further application.

Materials and methods. For the review preparation, we analyzed articles on experimental testing of ovarian cancer resistance to chemotherapeutic agents, available at biomedical literature databases SciVerse Scopus (158), PubMed (323), Web of Science (285), RSCI (64). The review cited 37 recent publications, 12 of them being published over the past three years, and 16 articles being referred as pioneer publications on techniques previously and used today.

Results. Peculiarities of the main methods for assessing the resistance and sensitivity of a cancer to various chemotherapeutic drugs using primary cultures of tumor cells obtained from biopsy or surgical material are analyzed. Proliferative and metabolic activities as well as

the level of cell death were considered as the main evaluated characteristics of tumor cells. The methodological features of the described methods are discussed, as well as the prospects for their further application.

Conclusion. Predictive detection of chemoresistance of ovarian cancer is based on testing the viability of tumor cells in the presence of a chemotherapeutic drug. The results of studies of the key mechanisms of chemoresistance development in tumor cells provide the rationale for improving *in vitro* testing.

Key words: ovarian cancer, platinum-containing chemotherapy, chemoresistance, cell sensitivity and resistance assay, proliferative activity, tumor cell viability

For citation: Kuzin K.A., Fetisov T.I., Knyazev R.I. et al. Determination of chemoresistance of ovarian cancer cells *in vitro*. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2019;6(4):8–25. (In Russ.).

Введение

Злокачественные новообразования яичников являются одной из лидирующих гинекологических патологий по распространенности, заболеваемости и смертности. В 2018 г. в России был выявлен 13 701 новый случай злокачественных новообразований яичников, распространенность данного заболевания составила 76,2 случая на 100 тыс. населения [1]. Рак яичников (РЯ) — самая распространенная форма злокачественных новообразований яичников. Алгоритм лечебных мероприятий при выявлении РЯ включает циторедуктивное хирургическое вмешательство в сочетании с платиносодержащей химиотерапией [2]. Выбор платиносодержащих препаратов 1-й линии химиотерапии основан на эмпирических данных крупных рандомизированных клинических исследований, показавших эффективность для большинства пациенток. При этом персонализация лечения при 1-й линии не проводится, несмотря на тот факт, что такая терапия неэффективна для 10–40 % пациенток с РЯ (в зависимости от гистологического подтипа) [3, 4]. Эффективность проведенной терапии, которую определяют по длительности интервала без платиносодержащей химиотерапии при отсутствии прогрессирования заболевания, т. е. оценивают по фактум по данным инструментального обследования и уровню опухолеассоциированного антигена СА125, служит обоснованием заключения о резистентности или чувствительности опухоли к производным платины. Если у пациента выявляют развитие резистентности к платиносодержащим препаратам по появлению платинорефрактерных (в процессе проведения терапии или в течение 1 мес после ее завершения) или платинорезистентных (в интервале от 1 до 6 мес) рецидивов, проводят химиотерапию с использованием паклитаксела, доцетаксела, доксорубина, гемцитабина, винорелбина, этопозиды, топотекана и других препаратов. Выбор другого химиотерапевтического средства (или их комбинации) также проводится без оценки потенциальной химиорезистентности [2].

Следует отметить, что все используемые в настоящее время для лечения РЯ химиотерапевтические препараты вызывают побочные эффекты, в том числе развитие анемии, осложнений со стороны желудочно-кишечного тракта, аллопеций и др., что приводит

к существенному ухудшению качества жизни. Многие из этих препаратов обладают генотоксической активностью, их действие на организм пациента может приводить к развитию вторичных опухолей, индуцированных химиотерапией [5, 6]. Кроме этого, их воздействие на опухолевые клетки приводит к повышению нестабильности генома и ускорению процесса прогрессии опухоли [7, 8]. С учетом того, что стратегия лечения РЯ построена на оценке результата предыдущего курса химиотерапии и все пациенты в конечном итоге получают курс токсического и неэффективного лечения платиносодержащими препаратами, а затем, возможно, и другими химиотерапевтическими препаратами, развитие методов прогнозирования химиорезистентности для проведения на этой основе персонализированного лечения чрезвычайно актуально для современной онкологии.

Одним из перспективных подходов к определению потенциальной химиорезистентности опухоли у пациентов с онкологическими заболеваниями является экспериментальное определение химиорезистентности/чувствительности опухолевых клеток *in vitro*. В представляемом обзоре обсуждены биологические детерминанты развития резистентности опухоли к химиотерапии, рассмотрены принципы определения химиорезистентности опухолевых клеток в системах *in vitro*, представлен сравнительный анализ ряда методических подходов, апробированных для выявления потенциальной химиорезистентности РЯ, и дана оценка перспектив развития экспериментального тестирования химиорезистентности РЯ.

Детерминанты развития резистентности опухоли к химиотерапии

Развитие резистентности опухоли к действию химиотерапевтических препаратов является центральной проблемой современной онкологии. Изучению этого процесса посвящены многие клинические и экспериментальные исследования, которые позволили определить основные детерминанты этого процесса и ключевые механизмы развития. При проведении химиотерапии действие препарата реализуется по 3 направлениям: 1) на опухолевые клетки, влияя на их жизнеспособность; 2) на нормальные клетки и организм пациента в целом, вызывая местные

и системные эффекты; 3) на взаимоотношения опухоли и организма [7]. Каждое из этих направлений характеризуется многофакторностью происходящих процессов, и разработка алгоритмов для их консолидированного анализа находится лишь в стадии развития. Так, интересной находкой клинических исследований по оценке системного действия химиотерапии на организм стали данные о существенной вариабельности фармакокинетики химиотерапевтических препаратов между пациентами [9]. В результате системное воздействие этих препаратов, которое обуславливает противоопухолевые и побочные эффекты, может различаться между пациентами в несколько раз при расчете дозы препарата с учетом площади поверхности тела. Это означает, что современный подход к расчету дозы препарата не является полностью оправданным, необходимо проведение корректировки дозы препарата на основании данных фармакокинетики.

На моделях *in vivo* было установлено, что изменения, происходящие под действием химиотерапевтического препарата в строме и микроокружении опухоли, включая формирование пула макрофагов, ассоциированных с опухолью, могут способствовать развитию химиорезистентности [8, 10].

Использование культур опухолевых клеток позволило наиболее полно изучить механизмы развития химиорезистентности при действии различных препаратов непосредственно в опухолевых клетках [8]. К таким механизмам относят: 1) увеличение активности пролиферации опухолевых клеток; 2) активацию компонентов системы множественной лекарственной устойчивости, обеспечивающей выведение токсических соединений из клетки; 3) активацию процессов детоксикации химиотерапевтических препаратов и продуктов их метаболизма; 4) снижение чувствительности к проапоптотическим сигналам; 5) увеличение активности репарации ДНК; 6) снижение уровня экспрессии генов белков, являющихся мишенями при таргетной терапии, а также изменения в их структуре.

Одни и те же механизмы развития резистентности могут включаться при действии различных химиотерапевтических средств, в то же время один препарат может запускать развитие резистентности одновременно по нескольким механизмам (табл. 1).

Общепринятая теория развития химиорезистентности опухоли, в том числе при РЯ, базируется на представлениях о дарвиновском естественном отборе резистентного опухолевого клона под действием химиотерапевтического препарата в качестве фактора селекции [11]. Данные исследования R.F. Schwarz и соавт. о гетерозиготности и клональной эволюции опухолей яичников хорошо согласуются с этими представлениями [12]. Тем не менее скорость приобретения химиорезистентности свидетельствует о существовании в опухолевых клетках механизмов адаптации к условиям существования в присутствии цитотоксических

агентов [8], а также о возможности горизонтального переноса генетической информации между опухолевыми клетками [13, 14].

Химиотерапия платиносодержащими препаратами вызывает повреждение ДНК путем образования межцепочечных «сшивок», что приводит к блокировке репликации, остановке клеточного цикла, нарушению процесса пролиферации и активации апоптоза [11]. При РЯ были описаны механизмы резистентности опухолевых клеток к платиносодержащим препаратам как существующие до лечения, так и приобретенные в процессе химиотерапии. Анализ опухолевых образцов, полученных от большого числа пациенток с резистентным РЯ, свидетельствовал о снижении внутриклеточного накопления цисплатина вследствие изменений в трансмембранном транспорте и эндоцитозе, об активации процессов репарации ДНК, изменении функционирования сигнальных путей, обеспечивающем усиление эпителиально-мезенхимального перехода и высокий уровень пролиферации. Важным молекулярным механизмом изменения активности сигнальных путей у пациенток с РЯ, обеспечивающим развитие химиорезистентности к препаратам платины, является гипо- и aberrантное метилирование ДНК. Поиск драйверных мутаций, которые ассоциированы с развитием приобретенной резистентности, выявил реверсные мутации генов *BRCA1/2* и потерю метилирования промотора *BRCA1*. В то же время эти молекулярно-генетические исследования обнаружили высокую частоту дисфункций системы рекомбинационной репарации и возможность создания «синтетической летали» путем применения ингибиторов PARP1.

Экспериментальное тестирование резистентности и чувствительности опухолевых клеток *in vitro*

Большинство противоопухолевых препаратов после распределения в организме и непосредственного попадания в опухолевые клетки реализуют свой цитотоксический эффект, влияя на жизненно важные клеточные биологические процессы. Биологические процессы, посредством которых противоопухолевые препараты реализуют свое цитотоксическое действие, наиболее активно происходят в быстро пролиферирующих клетках, к которым, несомненно, относятся опухолевые [9].

На уровне организма гибель злокачественных клеток после проведения химиотерапии выражается в уменьшении объема и количества опухолевых очагов, что позволяет оценить эффективность химиотерапии инструментальными методами (спиральная компьютерная томография, магнитно-резонансная томография). Существует несколько шкал оценки, в рамках которых полное исчезновение всех проявлений опухолевого процесса после химиотерапии по данным инструментальных методов обследования расценивается как полный ответ, уменьшение опухолевых очагов — как частичный ответ, отсутствие изменений

Таблица 1. Механизмы развития химиорезистентности в опухолевой клетке, выявляемые при действии различных препаратов

Table 1. Mechanisms of chemoresistance development in tumor cells for various drugs

Механизм развития химиорезистентности Mechanism of chemoresistance development	Группа химиотерапевтических препаратов Group of chemotherapeutical drugs	Механизм химиотерапевтического действия Mechanism of chemotherapeutical action
Увеличение активности пролиферации Increased proliferative activity	Платиносодержащие препараты Platinum-containing drugs	Образование в ДНК межцепочечных «сшивок» Formation of DNA interstrand cross-links
	Алкилирующие агенты Alkylating agents	Модификация оснований ДНК DNA base modification
	Антрациклины Anthracyclines	Образование аддуктов ДНК, ингибирование топоизомеразы II The formation of DNA adducts, inhibition of topoisomerase II
	Ингибиторы тирозинных киназ Tyrosine kinase inhibitors	Ингибирование передачи активирующего сигнала Inhibition of activating signal transduction
Активация компонентов системы множественной лекарственной устойчивости Activation of components of multiple drug resistance	Таксаны Taxanes	Взаимодействуя с тубулином, нарушают работу микротрубочек, останавливают сегрегацию хроматид и запускают таким образом апоптоз Disrupt microtubule functioning, stop chromatid segregation inducing apoptosis due to interaction with tubulin
	Антрациклины Anthracyclines	Интеркалируют в ДНК, нарушают работу топоизомеразы II, останавливают биосинтез ДНК Intercalate into DNA, disrupt topoisomerase II functioning, stop DNA biosynthesis
	Винкаалкалоиды Vinca alkaloids	Взаимодействуя с тубулином, нарушают работу микротрубочек, таким образом останавливают сегрегацию хроматид, что препятствует делению и запускает апоптоз Interact with tubulin, disrupt microtubule functioning leading to arrested chromatid segregation which prevents division and initiates apoptosis
	Ингибиторы тирозинных киназ Tyrosine kinase inhibitors	Ингибирование передачи активирующего сигнала Inhibition of activating signal transduction
Активация детоксикации химиотерапевтических препаратов и продуктов их метаболизма Activation of detoxication of chemotherapeutic drugs and their metabolic products	Все цитостатики All cytostatics	Разные механизмы действия Various mechanisms of action
	Ингибиторы тирозинных киназ Tyrosine kinase inhibitors	Ингибирование передачи активирующего сигнала Inhibition of activating signal transduction
Снижение чувствительности к проапоптотическим сигналам Decreased sensitivity to pro-apoptotic signals	Все цитостатики All cytostatics	Разные механизмы действия Various mechanisms of action
	Ингибиторы тирозинных киназ Tyrosine kinase inhibitors	Ингибирование передачи активирующего сигнала Inhibition of activating signal transduction
	АТ к онкобелкам Abs to oncoproteins	Ингибирование онкобелков Inhibition of oncoproteins
Увеличение активности репарации ДНК Increased DNA repair	Платиносодержащие препараты Platinum-containing drugs	Образование в ДНК межцепочечных «сшивок» Formation of DNA interstrand cross-links
	Алкилирующие агенты Alkylating agents	Модификация оснований ДНК DNA base modification
Снижение экспрессии, изменения в структуре белков, являющихся мишенями при таргетной терапии Decreased expression, changes in the structure of chemotherapy target proteins	Таргетные препараты Targeted drugs	Взаимодействие с белками — компонентами активированных сигнальных путей — и их инактивация Interaction with proteins — components of activated signaling pathways — and their inactivation

в опухолевом процессе — как стабилизация процесса и, наконец, рост существующих или появление новых очагов — как прогрессирование заболевания. Кроме вышеприведенного метода эффективность химиотерапии в клинической практике можно оценивать посредством анализа: 1) выживаемости пациентов без прогрессирования заболевания, определяемой как период времени от момента рандомизации до появления рецидива опухоли или смерти пациента после получения противоопухолевой терапии; 2) общей выживаемости, определяемой как время от момента рандомизации или начала терапии до смерти пациента независимо от причины [15].

В соответствии с ответом на терапию злокачественные опухоли *in vivo* можно разделить на чувствительные к определенному химиотерапевтическому препарату, характеризующиеся полным исчезновением или уменьшением размеров очагов после проведения лечения (полный или частичный ответ) и резистентные к определенному цитостатику, характеризующиеся ростом или появлением новых очагов на фоне проведения химиотерапии.

Как было отмечено ранее, резистентность злокачественных клеток к противоопухолевым препаратам — основная проблема клинической онкологии. Ряд злокачественных опухолей являются резистентными к химиотерапии до лечения, у других резистентность может развиваться на фоне или после его проведения.

В настоящее время резистентность опухоли к химиотерапевтическому препарату определяется по результатам объективного обследования пациента после проведения химиотерапии. В то же время есть основания утверждать, что резистентность опухоли может быть предсказана с помощью лабораторных тестов по определению чувствительности и резистентности опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам (Chemotherapy Sensitivity and Resistance assays, CSR-тесты).

CSR-тесты были разработаны и используются с середины XX века [16]. Основным принципом CSR-тестов является оценка жизнеспособности опухолевых клеток, полученных от пациента после их обработки или в присутствии цитостатического агента. Технология получения результатов в различных видах CSR-теста отличается, но все они включают следующие этапы: 1) выделение опухолевых клеток и помещение их в среду *in vitro*; 2) культивирование опухолевых клеток после обработки или совместно с химиотерапевтическими препаратами; 3) количественную оценку показателя, который позволяет определить чувствительность или резистентность опухолевых клеток к цитостатику; 4) интерпретацию полученных результатов и создание отчета о чувствительности или резистентности клеток.

При тестировании химиорезистентности РЯ выделение опухолевых клеток из асцитической жидкости осуществляют методом центрифугирования; выделение

из образцов опухолевой ткани — методами механической и ферментативной диссоциации. Культивирование клеток *in vitro* проводят в виде суспензии, в условиях двух- или трехмерного роста. В качестве основных показателей, по которым судят о чувствительности или резистентности опухолевых клеток к химиотерапевтическому препарату, используют: 1) активность пролиферации (клоногенный тест, тест на включение $^3\text{[H]}$ -тимидина); 2) активность метаболизма (МТТ-тест, АТФ-тесты); 3) активность клеточной гибели (MiСК-тест, ChemoFX-тест). При интерпретации полученных данных чувствительными к химиотерапевтическому препарату считают опухолевые клетки, большинство из которых неспособны пролиферировать или погибают при культивировании в его присутствии *in vitro*, резистентными — клетки, которые сохраняют жизнеспособность в присутствии цитостатика.

Очевидно, что методика культивирования опухолевых клеток совместно с цитостатиками, используемая в CSR-тестах, является моделированием процесса химиотерапевтического лечения пациента. Следует признать, что при культивировании опухолевых клеток пациента *in vitro* нельзя точно воспроизвести микроокружение опухоли *in vivo* и закономерности экспозиции опухолевых клеток цитостатикам в организме. Этим отчасти объясняется некоторое расхождение результатов экспериментального тестирования и наблюдаемых в клинической практике. Тем не менее способность к пролиферации и высокая метаболическая активность опухолевых клеток в присутствии химиотерапевтического препарата в условиях *in vitro*, несомненно, свидетельствуют о существовании в опухоли клона клеток, резистентных к химиотерапии.

За более чем полувековую историю использования CSR-тестов были проведены исследования по сопоставлению результатов тестирования опухолевых клеток на резистентность/чувствительность *in vitro* и эффективности химиотерапии при различных видах злокачественных опухолей. В 2017 г. были опубликованы результаты метаанализа, в который авторы включили 34 исследования, позволяющие рассчитать чувствительность, специфичность и точность тестов, отражающих их корреляцию с ответом опухоли на химиотерапию при различных нозологиях у 1835 пациентов. Под чувствительностью теста авторы подразумевали долю больных с истинной чувствительностью в популяции, у которых наблюдался ответ на химиотерапию; под специфичностью — долю пациентов с истинной резистентностью в популяции, у которых не наблюдалось ответа на химиотерапию; под точностью теста — долю больных с истинной чувствительностью и истинной резистентностью в общей популяции пациентов, которым проводилось тестирование. В соответствии с данными метаанализа в подавляющем большинстве исследований точность CSR-тестов была выше 80 %, что подтверждает гипотезу о высокой вероятности правильного прогнозирования ответа опухоли на химиотерапию

по результатам тестирования резистентности/чувствительности опухолевых клеток к цитостатикам *in vitro* [17]. При этом возможность увеличения выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости при проведении химиотерапии в соответствии с результатами CSR-тестов остается открытым вопросом, так как истинное влияние уменьшения размеров опухолевых узлов, обусловленное действием цитостатиков на продолжительность жизни пациентов, до сих пор не изучено, и уменьшение размеров опухолевой массы может не приводить к увеличению ни выживаемости без прогрессирования, ни общей выживаемости. Отдельно следует сказать о прогностической значимости выявления чувствительности опухолевых клеток, определяемой как вероятность ответа опухоли на химиотерапию при выявлении чувствительности опухолевых клеток *in vitro*, и прогностической значимости выявления резистентности опухолевых клеток, определяемой как вероятность отсутствия ответа опухоли на химиотерапию при выявлении резистентности *in vitro* (табл. 2). С учетом того, что CSR-тесты проводятся с использованием биопсийного материала и результаты тестирования не могут экстраполироваться на все опухолевые клетки в организме в силу гетерогенности опухоли [12], следует признать, что прогностическая значимость выявления резистентности в CSR-тестах должна быть выше, чем прогностическая значимость выявления чувствительности, так как всегда остается вероятность существования резистентного клона в опухолевой ткани, не попавшего в анализируемый образец.

В табл. 2 представлена стандартная схема оценки результатов для расчета диагностической чувствительности, специфичности и прогностической значимости использования CSR-тестов.

Таблица 2. Оценка результатов использования CSR-тестов

Table 2. Evaluation of CSR tests

Чувствительность опухолевых клеток в эксперименте <i>in vitro</i> Tumor cell sensitivity <i>in vitro</i>	Ответ опухоли на химиотерапевтическое лечение Tumor response to chemotherapeutic treatment	
	Присутствует Present	Отсутствует Absent
Присутствует Present	Число пациентов с истинной чувствительностью, определенной по результатам тестирования <i>in vitro</i> (ИЧ) Number of patients with true sensitivity determined by the results of an <i>in vitro</i> test (TS)	Число пациентов с ложной чувствительностью, определенной по результатам тестирования <i>in vitro</i> (ЛЧ) Number of patients with false sensitivity determined by the results of an <i>in vitro</i> test (FS)
Отсутствует Absent	Число пациентов с ложной резистентностью, определенной по результатам тестирования <i>in vitro</i> (ЛР) Number of patients with false resistance determined by the results of an <i>in vitro</i> test (FR)	Число пациентов с истинной резистентностью, определенной по результатам тестирования <i>in vitro</i> (ИР) Number of patients with true resistance determined by the results of an <i>in vitro</i> test (TR)

Примечание. Чувствительность теста = $ИЧ/(ИЧ + ЛР)$; специфичность теста = $ИР/(ИР + ЛЧ)$; прогностическая значимость выявления чувствительности = $ИЧ/(ИЧ + ЛЧ)$; прогностическая значимость выявления резистентности = $ИР/(ИР + ЛР)$; точность теста = $(ИЧ + ИР)/(ИЧ + ЛЧ + ИР + ЛР)$.

Note. Test sensitivity = $TS/(TS + FR)$; test specificity = $TR/(TR + FS)$; prognostic value of sensitivity determination = $TS/(TS + FS)$; prognostic value of resistance determination = $TR/(TR + FR)$; test accuracy = $(TS + TR)/(TS + FS + TR + FR)$.

CSR-тесты в клинических исследованиях химиорезистентности рака яичников

Стратегия выполнения всех CSR-тестов в опубликованных исследованиях по прогностическому определению химиорезистентности РЯ заключалась в оценке жизнеспособности опухолевых клеток при их культивировании в присутствии анализируемых препаратов. Для определения жизнеспособности опухолевых клеток в качестве оцениваемой характеристики рассматривали: 1) пролиферативную активность; 2) метаболическую активность; 3) степень индукции гибели клеток. При этом были использованы различные методические подходы, которые приведены далее.

CSR-тесты, оценивающие пролиферативную активность опухолевых клеток

Тест на колониеобразование (Human Tumor Cloning Assay, HTCA) является исторически первым тестом, разработанным в 1970-х годах А. Hamburger и S. E. Salmon для определения чувствительности первичных культур опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам [18]. Клоногенный тест основан на способности отдельных опухолевых клеток делиться и давать начало колониям при культивировании в обогащенном агаре. Результаты тестирования получают путем подсчета и дальнейшего сравнения количества колоний, выросших из предварительно обработанных и необработанных химиотерапевтическим агентом опухолевых клеток.

Тест на экстремальную резистентность к химиотерапевтическому препарату (Extreme Drug Resistance Assay, EDRA) был разработан D. H. Kern и соавт. в 1980-х годах [19]. Тест основан на использовании меченного

тритием нуклеозида тимидина для оценки интенсивности биосинтеза ДНК, которая отражает пролиферативную активность опухолевых клеток.

Добавление в среду культивирования радиоактивного тимидина с последующей его детекцией позволяет оценивать уровень пролиферативной активности опухолевых клеток, обработанных и необработанных химиотерапевтическими препаратами. Особенностью теста, отраженной в названии EDRA, является культивирование в процессе тестирования опухолевых клеток в концентрациях цитостатиков, многократно превышающих терапевтические, что обеспечивает высокую прогностическую значимость выявления этим тестом резистентности опухолевых клеток.

Тесты, оценивающие метаболическую активность опухолевых клеток

Тест с МТТ-реагентом (МТТ-тест) основан на способности митохондрий живых клеток восстанавливать растворимую соль тетразолия (3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразол — МТТ-реагент) в нерастворимые кристаллы формазана. Метод впервые был описан Black и Speer в 1953 г. [20], и адаптирован Т. Mosman в 1983 г. [21]. Методика теста сводится к культивированию выделенных опухолевых клеток в среде с цитостатиками и без них с последующей инкубацией клеток с МТТ-реагентом. Образовавшиеся окрашенные кристаллы формазана растворяют с использованием диметилсульфоксида (ДМСО) или изопропанола и оценивают уровень метаболической активности по интенсивности окрашивания раствора с помощью колориметрии. Результаты тестирования получают при сравнении показателей клеток до культивирования с химиотерапевтическим агентом и после него. Согласно данным J.M. Sargent чувствительность МТТ-теста при опухолях яичников составляет 81 %. При этом 5-летняя выживаемость пациентов, получивших препараты, к которым опухолевые клетки были чувствительны в *in vitro*-тесте, была статистически значимо выше, чем у пациентов, получивших препараты, к которым наблюдалась резистентность (табл. 3) [22].

HDRA (Histoculture Drug Response Assay) — модификация МТТ-теста, при которой оценку метаболической активности проводят с использованием гистокультуры, полученной из опухолевого образца. HDRA был предложен в 1991 г. Его особенностью является использование тонких срезов фрагментов опухолевой ткани, культивируемых на коллагеновой подложке, что позволяет в большей степени сохранять гистоархитектонику опухолевой ткани и в максимально возможной степени для экспериментов *in vitro* воспроизводить микроокружение исходной опухоли.

Тесты, основанные на оценке количества аденозинтрифосфата (АТФ). К данной категории относят тесты, в основе которых лежит измерение уровня АТФ, соответствующего уровню метаболической активности

клеток. Известно, что для реализации широкого ряда метаболических процессов клетке необходимо определенное количество АТФ, а после гибели клетки уровень метаболизма быстро снижается и содержание АТФ падает. Содержание АТФ оценивают в лизате клеток с помощью реакции превращения люциферина в оксифуоресцин, поскольку энергетическим источником реакции служит АТФ и по регистрации уровня биолюминесценции можно оценить его содержание в опухолевых клетках.

Особенностью данных тестов является возможность использования гипoadгезионных условий культивирования, обеспечивающих селективный рост злокачественных клеток в среде [23].

Тесты, оценивающие степень индукции гибели опухолевых клеток

Оценка кинетики оптических характеристик микрокультуры (MicroCulture Kinetic assay, MiCK-тест). MiCK-тест основан на изменении оптической плотности суспензии опухолевых клеток при развитии апоптоза. По степени изменения оптической плотности в суспензии опухолевых клеток после их обработки химиотерапевтическими препаратами в сравнении с характеристикой необработанных клеток можно судить об их химиорезистентности [24].

Chemo FX — коммерческое название теста, в основе которого лежит подсчет количества жизнеспособных клеток после их окрашивания красителем DAPI. Методика ChemoFX-теста является многоэтапной и включает получение первичной культуры опухолевых клеток, последующую морфологическую и иммунофенотипическую верификацию злокачественного характера полученных клеток с дальнейшим культивированием совместно с химиотерапевтическими препаратами и без них. Результаты тестирования получают путем сравнения количества жизнеспособных клеток при культивировании в присутствии цитостатиков и без них. Особенностями теста являются этап морфологического и иммунофенотипического подтверждения злокачественной природы клеток в первичной культуре и автоматизированный подсчет количества жизнеспособных клеток [25].

В табл. 3 приведена краткая характеристика клинических исследований, а также популяции пациенток и основные результаты, полученные при сопоставлении данных тестирования опухолевых клеток на резистентность/чувствительность *in vitro* с эффективностью химиотерапии у пациенток с диагнозом РЯ.

К сожалению, подход к оценке результатов в большинстве исследований различался, при этом в ряде исследований в качестве результата химиотерапии рассматривалась выживаемость пациентов, в других — объективный ответ опухоли, оцениваемый с помощью инструментальных методов. Следует отметить, что большинство исследований носило ретроспективный характер, дизайн многих из них был неудачным.

Таблица 3. Результаты анализа влияния использования CSR-тестов в клинических исследованиях
Table 3. The results of analysis of using CSR-assays in clinical trials

Принцип метода Method principle	Название метода, авторы исследования Method name, study authors	Характеристики исследования. Популяция пациентов. Сравнимые группы Study characteristics. Patient populations. Compared groups			Основные результаты Main results
		1-я группа 1 st group	2-я группа 2 nd group	3-я группа 3 rd group	
Тесты, оценивающие пролиферативную активность опухолевых клеток Tests evaluating proliferative activity of cells	HTCA, Southwest Oncology Group [26]	Перспективное нерандомизированное. 108 пациенток с рецидивом рака яичников после предшествующей терапии Prospective non-randomized. 108 female patients with recurrent ovarian cancer after previous therapy			Статистически значимая разница в количестве объективных ответов между 1-й и 2-й группами: 28 и 11 % ($p = 0,03$). Отсутствие статистически значимой разницы в показателях общей выживаемости между 1-й и 2-й группами: 6,25 и 7,25 мес соответственно Statistically significant difference in the number of objective responses between the 1 st and 2 nd groups: 28 and 11 % ($p = 0.03$). Absence of statistically significant difference in overall survival between the 1 st and 2 nd groups: 6.25 and 7.25 months respectively
		18 пациенток, получивших терапию наиболее активными препаратами по результатам клоногенного теста 18 patients who received therapy with the most active drugs according to the clonogenic assay	90 пациенток, у которых не удалось определить чувствительность или которые были резистентны ко всем препаратам по результатам клоногенного теста, получили лечение на усмотрение лечащего врача 90 patients with undetermined sensitivity or who were resistant to all drugs according to the clonogenic assay, received treatment at the discretion of the attending physician	—	
		Ретроспективное, обсервационное. 93 пациентки с вновь установленным раком яичников стадий II–IV Retrospective observational. 93 female patients with repeat diagnosis of stage II–IV ovarian cancer			
	HTCA, М. Federico и соавт. [27] HTCA, M. Federico et al. [27]	20 пациенток, получивших препараты, к которым была выявлена чувствительность в тесте 20 patients receiving drugs with determined sensitivity in the test	73 пациентки, получившие препараты, к которым была выявлена резистентность в тесте 73 patients receiving drugs with undetermined sensitivity in the test	—	Статистически значимой разницы в показателях общей выживаемости между группами не наблюдалось: 41 мес (95 % ДИ 15–62 мес) для 1-й группы и 30 мес (95 % ДИ 22–38 мес) для 2-й ($p = 0,38$). No statistically significant difference in overall survival between the two groups: 41 months (95 % CI 15–62 months) for the 1 st group and 30 months (95 % CI 22–38 months) for the 2 nd group ($p = 0.38$)

Продолжение табл. 3
Continuation of table 3

Принцип метода Method principle	Название метода, авторы исследования Method name, study authors	Характеристики исследования. Популяция пациентов. Сравниваемые группы Study characteristics. Patient populations. Compared groups			Основные результаты Main results
		1-я группа 1 st group	2-я группа 2 nd group	3-я группа 3 rd group	
Тесты, оценивающие пролиферативную активность опухолевых клеток Tests evaluating proliferative activity of cells	EDRA, R.W. Holloway и соавт. [28] EDRA, R.W. Holloway et al. [28]	Ретроспективное, обсервационное. 79 пациенток с вновь выявленным раком яичников стадий ПС–IV Retrospective observational. 79 female patients with repeat diagnosis of stage PС–IV ovarian cancer			Медианы времени до прогрессирования и медианы общей выживаемости статистически значимо различаются для групп. Медиана времени до прогрессирования для 1-й группы – 6 мес, для 2-й – 24 мес (ОР 2,64; 95 % ДИ 1,43–4,89; $p = 0,0011$); медиана общей выживаемости – 24 мес для 1-й группы, не достигнута на сроке наблюдения 32 мес Median time to progression and median overall survival were significantly different between the groups. Median time to progression for the 1 st group was 6 months, for the 2 nd group – 24 months (OR 2.64; 95 % CI 1.43–4.89; $p = 0.0011$); median overall survival was 24 months in the 1 st group and wasn't reached in the 2 nd group at 32 months
		17 пациенток, у которых выявлена высокая резистентность к препаратам платины по данным теста 17 patients with identified high resistance to platinum drugs per the test	62 пациентки, у которых выявлена низкая резистентность к препаратам платины по данным теста 62 patients with identified low resistance to platinum drugs per the test	–	
	EDRA, W.D. Joo и соавт. [29] EDRA, W.D. Joo et al. [29]	Ретроспективное. 78 пациенток с диагнозом рака яичников, фаллопиевых труб или первичного рака брюшины Retrospective. 78 female patients with a diagnosis of ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancer			Отсутствие различий в объективном ответе на терапию между группами. Объективный ответ в 1-й группе – 87,5 %, во 2-й – 71,8 % ($p = 0,107$) Absence of differences in objective response to therapy between the groups. Objective response in the 1 st group was 87.5 %, in the 2 nd group – 71.8 % ($p = 0.107$)
		39 пациенток, которым был проведен EDRA-тест. По результатам теста препараты, к которым была выявлена резистентность, заменены. 39 patients who underwent the EDRA test. Per the test results, drugs which showed resistance were substituted	39 пациенток, которым не проводился EDRA-тест, получили стандартную химиотерапию 39 patients who didn't undergo the EDRA test and received standard chemotherapy	–	

Продолжение табл. 3
Continuation of table 3

Принцип метода Method principle	Название метода, авторы исследования Method name, study authors	Характеристики исследования. Популяция пациентов. Сравниваемые группы Study characteristics. Patient populations. Compared groups			Основные результаты Main results
		1-я группа 1 st group	2-я группа 2 nd group	3-я группа 3 rd group	
Тесты, оценивающие пролиферативную активность опухолевых клеток Tests evaluating proliferative activity of cells	EDRA, V. Loizzi и соавт. [30] EDRA, V. Loizzi et al. [30]	72 пациентки с платиночувствительным рецидивным раком яичников (рецидив >6 мес после окончания терапии) Retrospective. 72 female patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer (recurrence > 6 months after therapy completion)			Статистически значимая разница в объективном ответе: 65 % в 1-й группе и 35 % — во 2-й (<i>p</i> = 0,02). Статистически значимая разница в показателях выживаемости без прогрессирования: 15 мес — для 1-й группы и 7 мес — для 2-й (<i>p</i> = 0,0002). Статистически значимая разница в показателях общей выживаемости: 38 мес для 1-й группы и 21 мес для 2-й (<i>p</i> = 0,005) Statistically significant difference in objective response: 65 % in the 1 st group and 35 % in the 2 nd group (<i>p</i> = 0.02). Statistically significant difference in progression-free survival: 15 months in the 1 st group and 7 months in the 2 nd group (<i>p</i> = 0.0002). Statistically significant difference in overall survival: 38 months in the 1 st group and 21 months in the 2 nd group (<i>p</i> = 0.005)
		36 пациенток, получивших терапию препаратами, к которым наблюдалась низкая резистентность в EDRA-тесте 36 patients who received therapy with drugs that showed low resistance in the EDRA test	36 пациенток, которым не проводился EDRA-тест, получили терапию на усмотрение лечащего врача 36 patients who didn't receive the EDRA test, received therapy at the discretion of the attending physician	—	
		38 пациенток с платинорезистентным рецидивным раком яичников (рецидив <6 мес после окончания терапии) Retrospective. 38 female patients with platinum-resistant recurrent ovarian cancer (recurrence <6 months after therapy completion)			
		19 пациенток, получивших терапию препаратами, к которым наблюдалась низкая резистентность в EDRA-тесте 19 patients who received therapy with drugs that showed low resistance in the EDRA test	19 пациенток, которым не проводился EDRA-тест, получили терапию на усмотрение лечащего врача 19 patients who didn't receive the EDRA test, received therapy at the discretion of the attending physician	—	Отсутствие различий в ответе на терапию, выживаемости без прогрессирования, общей выживаемости. Объективный ответ для 1-й группы — 21 %, для 2-й — 16 % (<i>p</i> = 0,68). Выживаемость без прогрессирования для 1-й группы — 5 мес, для 2-й — 6 мес (<i>p</i> = 0,9). Общая выживаемость для 1-й группы — 13 мес, для 2-й — 12 мес (<i>p</i> = 0,88) No differences in therapy response, progression-free survival, overall survival. Objective response for the 1 st group was 21 %, for the 2 nd group — 16 % (<i>p</i> = 0.68). Progression-free survival for the 1 st group was 5 months, for the 2 nd group — 6 months (<i>p</i> = 0.9). Overall survival for the 1 st group was 13 months, for the 2 nd group — 12 months (<i>p</i> = 0.88)

Продолжение табл. 3
Continuation of table 3

		Continuation of table 2			
Принцип метода Method principle	Название метода, авторы исследования Method name, study authors	Характеристики исследования. Популяция пациентов. Сравнимые группы Study characteristics. Patient populations. Compared groups			Основные результаты Main results
		1-я группа 1 st group	2-я группа 2 nd group	3-я группа 3 rd group	
		Ретроспективное. 22 пациентки с диагнозом рака яичников, фаллопиевых труб или первичного рака брюшины стадий III–IV Retrospective. 22 female patients with a diagnosis of stage III–IV ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancer			
		7 пациенток, у которых по данным EDRA-теста не было определено резистентности к карбоплатину 7 patients without resistance to carboplatin per the EDRA test	15 пациенток, у которых по данным EDRA-теста была определена резистентность к карбоплатину 15 patients with resistance to carboplatin per the EDRA test	—	
		19 пациенток с диагнозом рака яичников, фаллопиевых труб или первичного рака брюшины стадий III–IV Retrospective. 19 female patients with a diagnosis of stage III–IV ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancer			
Тесты, оценивающие пролиферативную активность опухолевых клеток Tests evaluating proliferative activity of cells	EDRA, A.D. Tiersten и соавт. [31] EDRA, A.D. Tiersten et al. [31]	Ретроспективное. 10 пациенток, у которых по данным EDRA-теста была определена резистентность к паклитакселу 10 patients with resistance to paclitaxel per the EDRA test			Отсутствие различий в показателях выживаемости без прогрессирования между группами No differences in progression-free survival between the groups
		9 пациенток, у которых по данным EDRA-теста не было определено резистентности к паклитакселу 9 patients without resistance to paclitaxel per the EDRA test			

Продолжение табл. 3
Continuation of table 3

Принцип метода Method principle	Название метода, авторы исследования Method name, study authors	Характеристики исследования. Популяция пациентов. Сравнимые группы Study characteristics. Patient populations. Compared groups			Основные результаты Main results
		1-я группа 1 st group	2-я группа 2 nd group	3-я группа 3 rd group	
Тесты, оценивающие жизнеспособность клеток по их метаболической активности Tests evaluating cell viability per their metabolic activity	МТТ, Х. Ху и соавт. [32] МТТ, Х. Ху et al. [32]	Ретроспективное. 72 пациентки с диагнозом рака яичников стадий I–IV (FIGO), которым была проведена неоадьювантная химиотерапия препаратами карбоплатин и паклитаксел Retrospective. 72 female patients with a diagnosis of stage I–IV (FIGO) ovarian cancer who received neoadjuvant therapy with carboplatin and paclitaxel			Статистически значимая разница в объективном ответе между 1-й и 3-й группами. В 1-й группе объективный ответ (полный или частичный) наблюдался у 20 пациенток, во 2-й – у 18, в 3-й – у 9 Statistically significant difference in objective response between the 1 st and 3 rd groups. In the 1 st group objective response (either complete or partial response) was observed in 20 patients, in the 2 nd group in 18 patients, in the 3 rd group in 9 patients
		29 пациенток с опухолями, чувствительными к карбоплатину и паклитакселу 29 patients with tumors sensitive to carboplatin and paclitaxel	23 пациентки с опухолями, чувствительными либо к карбоплатину, либо к паклитакселу 23 patients with tumors sensitive to either carboplatin or paclitaxel	20 пациенток с опухолями, резистентными к карбоплатину и паклитакселу 20 patients with tumors resistant to carboplatin and paclitaxel	
		43 пациентки с диагнозом рака яичников стадий I–IV (FIGO), которым была проведена адьювантная химиотерапия препаратами карбоплатин и паклитаксел 43 female patients with a diagnosis of stage I–IV (FIGO) ovarian cancer who received neoadjuvant therapy with carboplatin and paclitaxel			
		16 пациенток с опухолями, чувствительными к карбоплатину и паклитакселу 16 patients with tumors sensitive to carboplatin and paclitaxel	11 пациенток с опухолями, чувствительными либо к карбоплатину, либо к паклитакселу 11 patients with tumors sensitive to either carboplatin or paclitaxel	16 пациенток с опухолями, резистентными к карбоплатину и паклитакселу 16 patients with tumors resistant to carboplatin and paclitaxel	Статистически значимая разница в объективном ответе между 1-й и 3-й группами. В 1-й группе объективный ответ (полный или частичный) наблюдался у 12 пациенток, во 2-й – у 8, в 3-й – у 5 Statistically significant difference in objective response between the 1 st and 3 rd groups. In the 1 st group objective response (either complete or partial response) was observed in 12 patients, in the 2 nd group in 8 patients, in the 3 rd group in 5 patients

Продолжение табл. 3
Continuation of table 3

Принцип метода Method principle	Название метода, авторы исследования Method name, study authors	Характеристики исследования. Популяция пациентов. Сравнимые группы Study characteristics. Patient populations. Compared groups			Основные результаты Main results
		1-я группа 1 st group	2-я группа 2 nd group	3-я группа 3 rd group	
Тесты, оценивающие жизнеспособность клеток по их метаболической активности Tests evaluating cell viability per their metabolic activity	HDRA, S. Nakada и соавт. [33] HDRA, S. Nakada et al. [33]	29 пациенток с диагнозом рака яичников стадий I–IV, которым была выполнена первичная циторедуктивная операция Retrospective. 29 female patients with a diagnosis of stage I–IV ovarian cancer who underwent cytoreductive surgery	29 пациенток с опухолями, резистивными к цисплатину по данным HDRA-теста 19 patients with tumors resistant to cisplatin per the HDRA-test	19 пациенток с опухолями, резистивными к цисплатину по данным HDRA-теста 19 patients with tumors resistant to cisplatin per the HDRA-test	В 1-й группе объективный ответ (полный или частичный) наблюдался у 9 пациенток. Во 2-й группе у 15 пациенток не наблюдалось объективного ответа (стабилизация + прогрессирование). Статистически значима разница в показателях 5-летней выживаемости между 1-й и 2-й группами: 50 и 11 % соответственно ($p < 0,05$) In the 1 st group objective response (complete or partial response) was observed in 9 patients. In the 2 nd group, no objective response (stabilization + progression) was observed in 15 patients. Statistically significant difference in 5-year survival between the 1 st and 2 nd groups: 50 and 11 % respectively ($p < 0,05$)
		73 пациентки с диагнозом рака яичников стадий III–IV (FIGO), которым была выполнена первичная циторедуктивная операция и проведена химиотерапия препаратами карбоплатин и паклитаксел Retrospective. 73 female patients with a diagnosis of stage III–IV (FIGO) ovarian cancer who underwent primary cytoreductive surgery and chemotherapy with carboplatin and paclitaxel	73 пациентки с опухолями, чувствительными к карбоплатину и паклитакселу 24 patients with tumors sensitive to carboplatin and paclitaxel	49 пациенток с опухолями, резистивными к карбоплатину, либо к паклитакселу 49 patients with tumor resistant to either carboplatin or paclitaxel	Статистически значимая разница в количестве рецидивов между 1-й и 2-й группами: 29,2 и 71,4 % соответственно ($p = 0,02$). Статистически значимая разница в медиане времени до прогрессирования между 1-й и 2-й группами: 34 и 16 мес соответственно ($p = 0,03$). Оценку разницы в общей выживаемости между группами провести было невозможно из-за недостаточного количества смертей на момент анализа Statistically significant difference in the number of recurrences between the 1 st and 2 nd groups: 29.2 and 71.4 % respectively ($p = 0.02$). Statistically significant difference in median time to progression between the 1 st and 2 nd groups: 34 and 16 months respectively ($p = 0.03$). Difference in overall survival could not be evaluated due to insufficient number of deaths at the time of analysis
		HDRA, P.S. Jung и соавт. [34] HDRA, P.S. Jung et al. [34]	24 пациентки с опухолями, чувствительными к карбоплатину и паклитакселу 24 patients with tumors sensitive to carboplatin and paclitaxel	49 пациенток с опухолями, резистивными к карбоплатину, либо к паклитакселу 49 patients with tumor resistant to either carboplatin or paclitaxel	

Продолжение табл. 3
Continuation of table 3

Принципы метода Method principle	Название метода, авторы исследования Method name, study authors	Характеристики исследования. Популяция пациентов. Сравнимые группы Study characteristics. Patient populations. Compared groups			Основные результаты Main results
		1-я группа 1 st group	2-я группа 2 nd group	3-я группа 3 rd group	
Тесты, оценивающие жизнеспособность клеток по их метаболической активности Tests evaluating cell viability per their metabolic activity	АТР-ТСА, I.A. Cree и соавт. [35] АТР-ТСА, I.A. Cree et al. [35]	147 пациенток с платинорезистентным рецидивом рака яичников 147 female patients with platinum-resistant ovarian cancer recurrence	147 пациенток, получившие терапию препаратами в соответствии с результатами АТР-ТСА-теста 147 patients who received therapy with drugs in accordance with the АТР-ТСА-test	73 пациентки, получившие терапию препаратами на выбор лечащего врача 73 patients who received therapy at the discretion of the attending physician	Отсутствие различий в количестве объективных ответов между 1-й и 2-й группами: 40,5 и 31,5 % соответственно ($p < 0,3$). Отсутствие различий в медиане времени до прогрессирования между 1-й и 2-й группами: 104 и 93 дня соответственно ($p < 0,14$). Отсутствие статистически значимой разницы в показателях общей выживаемости. Авторы отметили необычайно высокое количество объективных ответов во 2-й группе и объяснили это «эффектом обучения» No difference in the number of objective responses between the 1 st and 2 nd groups: 40.5 and 31.5 % respectively ($p < 0.3$). No difference in median time to progression between the 1 st and 2 nd groups: 104 and 93 days respectively ($p < 0.14$). No statistically significant difference in overall survival The authors noted an unusually high number of objective responses in the 2 nd group and interpreted it as "training effect"
		98 пациенток с диагнозом первичного или рецидивного рака яичников любой стадии 98 female patients with a diagnosis of primary or recurrent ovarian cancer at any stage	Ретроспективное наблюдательное. Retrospective observational.	—	Статистически значимая разница в количестве рецидивов между 1-й и 2-й группами: 53,3 и 76,3 % соответственно ($p = 0,02$). Статистически значимая разница в медиане общей выживаемости между 1-й и 2-й группами: >45 и 25 мес соответственно ($p = 0,003$) Statistically significant difference in the number of recurrences between the 1 st and 2 nd groups: 53.3 and 76.3 % respectively ($p = 0.02$). Statistically significant difference in median overall survival between the 1 st and 2 nd groups: >45 and 25 months respectively ($p = 0.003$)
Тесты, оценивающие степень индукции гибели опухолевых клеток Tests evaluating the level of induction of tumor cell death	МиСК, E. Salom и соавт. [24] МиСК, E. Salom et al. [24]	98 пациенток, получивших терапию препаратами, к которым была выявлена чувствительность 98 patients who received therapy with drugs for which sensitivity was observed	60 пациенток, получивших терапию препаратами, к которым была выявлена резистентность 60 patients who received therapy with drugs for which resistance was observed	38 пациенток, получивших терапию препаратами, к которым была выявлена резистентность 38 patients who received therapy with drugs for which resistance was observed	—
		—	—	—	—

Окончание табл. 3
End of table 3

Принцип метода Method principle	Название метода, авторы Method name, study authors	Характеристики исследования. Популяция пациентов. Сравнимые группы Study characteristics. Patient populations. Compared groups			Основные результаты Main results
		1-я группа 1 st group	2-я группа 2 nd group	3-я группа 3 rd group	
Тесты, оценивающие степень индукции гибели опухолевых клеток Tests evaluating the level of induction of tumor cell death	Chemo FX, T.J. Herzog и соавт. [36] Chemo FX, T.J. Herzog et al. [36]	192 пациентки с вновь выявленным раком яичников стадий III–IV (FIGO) ovarian cancer Retrospective.	133 пациентки с опухолями с промежуточной чувствительностью к карбоплатину или цисплатину 133 patients with tumors with intermediate sensitivity to carboplatin or cisplatin	39 пациенток с опухолями, резистентными к карбоплатину или цисплатину 39 patients with tumors resistant to carboplatin or cisplatin	Общая выживаемость в 1, 2 и 3-й группах составила 72,5; 48,6 и 28,2 мес соответственно. Статистически значимая разница в показателях общей выживаемости наблюдалась между 1, 2 и 3-й группами ($p = 0,0386$) Overall survival in the 1 st , 2 nd and 3 rd groups was 72.5, 48.6 and 28.2 months respectively. Statistically significant difference in overall survival was observed between the 1 st , 2 nd and 3 rd groups ($p = 0.0386$)
		262 пациентки с платиночувствительными и платинорезистентными рецидивами рака яичников, фаллопиевых труб и первичного рака брюшины Prospective non-interventional. 262 female patients with platinum-sensitive and platinum-resistant recurrences of ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancers	187 пациенток, получивших терапию препаратами, к которым была выявлена промежуточная чувствительность и резистентность 187 patients who received therapy with drugs that showed intermediate sensitivity and resistance	—	
		75 пациенток, получивших терапию препаратами, к которым была выявлена чувствительность 75 patients who received therapy with drugs for which sensitivity was observed	187 пациенток, получивших терапию препаратами, к которым была выявлена промежуточная чувствительность и резистентность 187 patients who received therapy with drugs that showed intermediate sensitivity and resistance	—	
Тесты, оценивающие степень индукции гибели опухолевых клеток Tests evaluating the level of induction of tumor cell death	Chemo FX, T. Rutherford и соавт. [37] Chemo FX, T. Rutherford et al. [37]	262 пациентки с платиночувствительными и платинорезистентными рецидивами рака яичников, фаллопиевых труб и первичного рака брюшины Prospective non-interventional. 262 female patients with platinum-sensitive and platinum-resistant recurrences of ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancers	187 пациенток, получивших терапию препаратами, к которым была выявлена промежуточная чувствительность и резистентность 187 patients who received therapy with drugs that showed intermediate sensitivity and resistance	—	Статистически значимая разница в медиане времени до прогрессирования между 1-й и 2-й группами: 8,8 и 5,9 мес соответственно (ОР 0,67; 95 % ДИ 0,50–0,91; $p = 0,009$). Статистически значимая разница в медиане общей выживаемости между 1-й и 2-й группами: 37,5 и 23,9 мес соответственно (ОР 0,61; 95 % ДИ 0,41–0,89, $p = 0,01$) Statistically significant difference in median time to progression between the 1 st and 2 nd groups: 8.8 and 5.9 months respectively (OR 0.67; 95 % CI 0.50–0.91; $p = 0.009$). Statistically significant difference in median overall survival between the 1 st and 2 nd groups: 37.5 and 23.9 months respectively (OR 0.61; 95 % CI 0.41–0.89, $p = 0.01$)
		75 пациенток, получивших терапию препаратами, к которым была выявлена чувствительность 75 patients who received therapy with drugs for which sensitivity was observed	187 пациенток, получивших терапию препаратами, к которым была выявлена промежуточная чувствительность и резистентность 187 patients who received therapy with drugs that showed intermediate sensitivity and resistance	—	

Примечание. HTCA — тест на колониеобразование; ДИ — доверительный интервал; EDRA — тест на экстремальную резистентность к химиотерапевтическому препарату; ОР — отношение рисков; HDRA — МТТ-тест в модификации с использованием гистокультур; МСК — оценка кинетики оптических характеристик микрокультуры.
Note. HTCA — Human Tumor Cloning Assay; CI — confidence interval; EDRA — Extreme Drug Resistance Assay; OR — odds ratio; HDRA — Histoculture Drug Response Assay; MCK — MicroCulture Kinetic assay.

Кроме этого, большинство исследований включало небольшое число пациенток, что не обеспечило выявление статистически значимых различий между группами. Однако эти данные свидетельствуют об активном внедрении крупными научными центрами мира CSR-тестов для прогнозирования химиорезистентности. Эксперты ASCO (American Society of Clinical Oncology) отмечают потенциальную важность развития методов оценки чувствительности опухолевых клеток *in vitro* и необходимость проведения дальнейших клинических исследований в этой области.

Заключение

В последние годы задачей химиотерапевтов стало не только продление жизни онкологического пациента, но и обеспечение ему нормального качества жизни. Это делает необходимым пересмотр стратегии химиотерапевтического лечения пациентов с РЯ, так как в настоящее время потенциальную резистентность опухолевых клеток к назначаемому препарату не анализируют. Выбор курса химиотерапии основан на оценке результатов предыдущего курса, и все

пациенты в конечном итоге получают курс токсического и неэффективного лечения платиносодержащими препаратами, а затем, возможно, и другими химиотерапевтическими препаратами. Одним из выходов из данной ситуации является развитие методов экспериментального определения химиорезистентности клеток РЯ *in vitro*. Современные методики выявления химиорезистентности опухолевых клеток проводят на основании оценки жизнеспособности опухолевых клеток в присутствии препарата. Обоснованием для совершенствования такого тестирования *in vitro* служат результаты исследований ключевых механизмов развития химиорезистентности опухолевых клеток. Перспективы развития этого метода связывают с использованием технологий консолидации информации по клиническим особенностям течения заболевания, данным инструментального обследования, молекулярно-генетического анализа и экспериментального тестирования жизнеспособности опухолевых клеток в присутствии химиотерапевтического препарата с выявлением индуцированных химиотерапевтическим препаратом молекулярных изменений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. 236 с. [State of oncological care in Russia in 2018. Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNIIOI im. P.A. Gertsena — filial FGBU "NMIRTS radiologii" Minzdrava Rossii, 2019. 236 p. (In Russ.)].
2. Тюляндин С.А., Коломиец Л.А., Морхов К.Ю. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака яичников, первичного рака брюшины и рака маточных труб. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO, 2018;8:145–55. [Tyulyandin S.A., Kolomiets L.A., Morkhov K.Yu. et al. Practical guidelines on drug treatment of ovarian cancer, primary peritoneal cancer and fallopian tube cancer. Malignant tumors: RUSSCO practical guidelines, 2018;8:145–55. (In Russ.)].
3. Markman M., Rothman R., Hakes T. et al. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. J Clin Oncol 1991;9(3):389–93. DOI: 10.1200/JCO.1991.9.3.389.
4. Van Zyl B., Tang D., Bowden N.A. Biomarkers of platinum resistance in ovarian cancer: what can we use to improve treatment. Endocr Relat Cancer 2018;25(5):303–18. DOI: 10.1530/ERC-17-0336.
5. Belitsky G.A., Kirsanov K.I., Lesovaya E.A., Yakubovskaya M.G. Prevention of therapy-related malignancies in cancer survivors. Oncotarget 2019;10(22):2114–5. DOI: 10.18632/oncotarget.26781.
6. Белицкий Г.А., Кирсанов К.И., Лесовая Е.А., Якубовская М.Г. Лекарственный канцерогенез: факторы риска и возможности предотвращения. Успехи биологической химии 2020;60:173–226. [Belitskiy G.A., Kirsanov K.I., Lesovaya E.A., Yakubovskaya M.G. Drug carcinogenesis: risk factors and prevention opportunities. Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biological Chemistry 2020;60:173–226. (In Russ.)].
7. Vasan N., Baselga J., Hyman D.M. A view on drug resistance in cancer. Nature 2019 575(7782):299–309. DOI: 10.1038/s41586-019-1730-1.
8. 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.
9. Nygren P. What is cancer chemotherapy? Acta Oncol 2001;40(2–3):166–74. DOI: 10.1080/02841860151116204.
10. Hanahan D., Coussens L.M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. Cancer Cell 2012;21(3):309–22. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.
11. Alkema N.G., Wisman G.B., van der Zee A.G. et al. Studying platinum sensitivity and resistance in high-grade serous ovarian cancer: Different models for different questions. Drug Resist Updat 2016;24:55–69. DOI: 10.1016/j.drup.2015.11.005.
12. Schwarz R.F., Ng C.K., Cooke S.L. et al. Spatial and temporal heterogeneity in high-grade serous ovarian cancer: a phylogenetic analysis. PLoS Med 2015;12(2):e1001789. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001789.
13. Cornelison R., Llana D.C., Landen C.N. Emerging therapeutics to overcome chemoresistance in epithelial ovarian cancer: a mini-review. Int J Mol Sci 2017;18(10). DOI: 10.3390/ijms18102171.
14. Scherbakov A.M., Sorokin D.V., Tatarskiy V.V. Jr et al. The phenomenon of acquired resistance to metformin in breast cancer cells: the interaction of growth pathways and estrogen receptor signaling. IUBMB Life 2016;68(4):281–92. DOI: 10.1002/iub.1481.
15. Тихомирова А.В. Критерии оценки клинической эффективности противоопухолевых лекарственных препаратов.

- Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2019;9(1):34–40. DOI: 10.30895/1991-2919-2019-9-1-34-40. [Tikhomirova A.V. Criteria for evaluation of clinical efficacy of anticancer medicines. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo premineniya* = The Bulletin of the Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products 2019;9(1):34–40. (In Russ.)].
16. Grendys E.C. Jr, Fiorica J.V., Orr J.W. Jr et al. Overview of a chemoresponse assay in ovarian cancer. *Clin Transl Oncol* 2014;16(9):761–9. DOI: 10.1007/s12094-014-1192-8.
 17. Blom K., Nygren P., Larsson R., Andersson C.R. Predictive value of *ex vivo* chemosensitivity assays for individualized cancer chemotherapy: a meta-analysis. *SLAS Technol* 2017;22(3):306–14. DOI: 10.1177/2472630316686297.
 18. Hamburger A., Salmon S.E. Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J Clin Invest* 1977;60(4):846–54. DOI: 10.1172/JCI108839.
 19. Kern D.H., Drogemuller C.R., Kennedy M.C. et al. Development of a miniaturized, improved nucleic acid precursor incorporation assay for chemosensitivity testing of human solid tumors. *Cancer Res* 1985;45(11–1): 5436–41.
 20. Wilson J.K., Sargent J.M., Elgie A.W. et al. A feasibility study of the MTT assay for chemosensitivity testing in ovarian malignancy. *Br J Cancer* 1990;62(2):189–94. DOI: 10.1038/bjc.1990.258.
 21. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1–2):55–63. DOI:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
 22. Sargent J.M. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples. *Recent Results Cancer Res* 2003;161:13–25. DOI: 10.1007/978-3-642-19022-3_2.
 23. Andreotti P.E., Cree I.A., Kurbacher C.M. et al. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55(22):5276–82.
 24. Salom E., Penalver M., Homesley H. et al. Correlation of pretreatment drug induced apoptosis in ovarian cancer cells with patient survival and clinical response. *J Transl Med* 2012;10:162. DOI: 10.1186/1479-5876-10-162.
 25. Brower S.L., Fensterer J.E., Bush J.E. The ChemoFxa assay: an *ex vivo* chemosensitivity and resistance assay for predicting patient response to cancer chemotherapy. *Methods Mol Biol* 2008;414:57–78. DOI: 10.1007/978-1-59745-339-4_6.
 26. Von Hoff D.D., Kronmal R., Salmon S.E. et al. A Southwest Oncology Group study on the use of a human tumor cloning assay for predicting response in patients with ovarian cancer. *Cancer* 1991;67(1):20–7. DOI: 10.1002/1097-0142(19910101)67:1<20::aid-cnrc2820670105>3.0.co;2-u.
 27. Federico M., Alberts D.S., Garcia D.J. et al. *In vitro* drug testing of ovarian cancer using the human tumor colony-forming assay: comparison of *in vitro* response and clinical outcome. *Gynecol Oncol* 1994;55(3–2):S156–63. DOI: 10.1006/gyno.1994.1356.
 28. Holloway R.W., Mehta R.S., Finkler N.J. et al. Association between *in vitro* platinum resistance in the EDR assay and clinical outcomes for ovarian cancer patients. *J Gynecol Oncol* 2002;87(1):8–16. DOI: 10.1006/gyno.2002.6797.
 29. Joo W.D., Lee J.Y., Kim J.H. et al. Efficacy of taxane and platinum-based chemotherapy guided by extreme drug resistance assay in patients with epithelial ovarian cancer. *J Gynecol Oncol* 2009;20(2):96–100. DOI: 10.3802/jgo.2009.20.2.96.
 30. Loizzi V., Chan J.K., Osann K. et al. Survival outcomes in patients with recurrent ovarian cancer who were treated with chemoresistance assay-guided chemotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189(5):1301–7. DOI: 10.1067/s0002-9378(03)00629-x.
 31. Tiersten A.D., Moon J., Smith H.O. et al. Chemotherapy resistance as a predictor of progression-free survival in ovarian cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy and surgical cytoreduction followed by intraperitoneal chemotherapy: a Southwest Oncology Group Study. *Oncology* 2009;77(6):395–9. DOI: 10.1159/000279386.
 32. Xu X., Dai H., Zhao Y. et al. *In vitro* chemosensitivity assay of ascites in epithelial ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2013;34(6):559–64.
 33. Nakada S., Aoki D., Ohie S. et al. Chemosensitivity testing of ovarian cancer using the histoculture drug response assay: sensitivity to cisplatin and clinical response. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15(3):445–52. DOI: 10.1111/j.1525-1438.2005.15307.x.
 34. Jung P.S., Kim D.Y., Kim M.B. et al. Progression-free survival is accurately predicted in patients treated with chemotherapy for epithelial ovarian cancer by the histoculture drug response assay in a prospective correlative clinical trial at a single institution. *Anticancer Res* 2013;33(3):1029–34.
 35. Cree I.A., Kurbacher C.M., Lamont A. et al. A prospective randomized controlled trial of tumour chemosensitivity assay directed chemotherapy versus physician's choice in patients with recurrent platinum-resistant ovarian cancer. *Anticancer Drugs* 2007;18(9):1093–101. DOI: 10.1097/CAD.0b013e3281de727e.
 36. Herzog T.J., Krivak T.C., Fader A.N., Coleman R.L. Chemosensitivity testing with ChemoFX and overall survival in primary ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203(1):68.e1–6. DOI: 10.1016/j.ajog.2010.01.059.
 37. Rutherford T., Orr J. Jr, Grendys E. Jr et al. A prospective study evaluating the clinical relevance of a chemoresponse assay for treatment of patients with persistent or recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2013;131(2):362–7. DOI: 10.1016/j.ygyno.2013.08.009.

Вклад авторов

К.А. Кузин: проведение системного анализа и обобщение данных, подготовка текста обзора;
 Т.И. Фетисов: подготовка таблицы «Результаты анализа влияния использования CSR-тестов в клинических исследованиях»;
 Р.И. Князев: подготовка раздела «Экспериментальное тестирование резистентности и чувствительности опухолевых клеток *in vitro*»;
 Л.Я. Фомина, Л.В. Мехеда: подготовка раздела «CSR-тесты в клинических исследованиях химиорезистентности рака яичников»;
 Е.А. Лесовая: подготовка раздела «Детерминанты развития резистентности опухоли к химиотерапии»;
 Г.А. Белицкий: проведение системного анализа и обобщение данных;
 М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов: определение структуры обзора, проведение системного анализа и обобщение данных.

Authors' contributions

K.A. Kuzin: systemic analysis and data consolidation, manuscript preparation;
 T.I. Fetisov: preparation of the table “The results of analysis of using CSR-assays in clinical trials”;
 R.I. Knyazev: preparation of the section “Experimental testing of tumor cells resistance and sensitivity *in vitro*”;

L.Ya. Fomina, L.V. Meheda: preparation of the section “CSR-assays in ovarian cancer chemoresistance clinical trials”;
E.A. Lesovaya: preparation of the section “Determinants of chemotherapy resistance development in cancer”;
G.A. Belitsky: systemic analysis and data consolidation;
M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov: determination of review structure, systemic analysis and data consolidation.

ORCID авторов/ORCID of authors

К.А. Кузин/K.A. Kuzin: <https://orcid.org/0000-0001-8474-8195>
Т.И. Фетисов/T.I. Fetisov: <https://orcid.org/0000-0002-5082-9883>
Р.И. Князев/R.I. Knyazev: <https://orcid.org/0000-0002-6341-0897>
Е.А. Лесовая/E.A. Lesovaya: <https://orcid.org/0000-0002-1967-9637>
М.Г. Якубовская/M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>
К.И. Кирсанов/K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Данное исследование выполняется в рамках экспериментального государственного задания Минздрава России при координации ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Минздрава России.
Financing. This research is conducted under the auspices of the experimental governmental assignment of the Ministry of Health of the Russia and coordinated by the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Ministry of Health of the Russia.

Идентификация нового сайта метилирования в промоторном районе гена *Sept9* для диагностики гепатоцеллюлярной карциномы

Н.Л. Лазаревич^{1,2}, П.М. Абрамов¹, М.Д. Федорова¹, И.Ф. Кустова¹, Д.А. Шавочкина¹, А.Н. Катаргин¹, Н.П. Киселева¹, Н.А. Дьякова¹, И.В. Ботезату¹, В.Н. Кондратова¹, Н.Е. Кудашкин¹, Ю.И. Патютко¹, А.В. Лихтенштейн¹, С.В. Винокурова¹

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

²биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Контакты: Наталия Леонидовна Лазаревич lazarevich.nl@gmail.com

Введение. Ежегодно во всем мире от гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) умирают более 600 тыс. человек. Заболевание часто выявляется на поздних стадиях и во многих случаях является некурабельным. Ранняя диагностика и мониторинг развития рецидивов ГЦК продолжают оставаться существенной проблемой клинической онкологии. Это определяет актуальность поиска высокочувствительных и специфичных биомаркеров для неинвазивной диагностики ГЦК.

Цель исследования — идентификация гиперметилированного при ГЦК локуса в промоторном районе гена септин 9 (*Sept9*) на основании анализа общедоступных данных метиломных исследований; экспериментальная валидация метилирования на пилотной панели парных клинических образцов пациентов с ГЦК, а также образцов ткани пациентов с доброкачественными опухолями печени и лимфоцитов здоровых доноров.

Материалы и методы. Для анализа метиломных данных были использованы выборки ГЦК TCGA, гепатоцеллюлярной аденомы из депозитария GEO (*Gene Expression Omnibus*), а также клеток периферической крови и тканей здоровых доноров Methbank. Экспериментальную валидацию уровней метилирования идентифицированного сайта проводили на пилотной выборке клинических образцов с использованием метода бисульфитного пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24.

Результаты. На основании анализа метиломных данных нами был выбран сайт *cg20275528*, который характеризуется высоким уровнем метилирования в тканях ГЦК и минимальными уровнями метилирования в клетках неопухоловой ткани печени, гепатоцеллюлярной аденомы и периферической крови здоровых доноров. Экспериментальная проверка на пилотной выборке клинических образцов показала, что уровень метилирования маркерного сайта в ГЦК (медиана 42 %) значительно выше, чем в неопухоловых тканях печени (медиана 3 %) и доброкачественных новообразованиях (медиана 1,5 %) и превышает пороговое значение в ГЦК по сравнению с парными образцами прилегающей неопухоловой ткани печени в 20 (66,6 %) из 30 исследованных случаев. Показана принципиальная возможность детекции метилирования *cg20275528* в циркулирующей ДНК плазмы больных ГЦК.

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить, что разработанный и апробированный в этой работе подход к поиску и экспериментальной верификации диагностически значимых маркеров может быть использован для выявления новых дифференциально метилированных сайтов и разработки новых подходов к неинвазивной диагностике ГЦК.

Ключевые слова: гепатоцеллюлярная карцинома, маркеры метилирования, септин 9, жидкостная биопсия

Для цитирования: Лазаревич Н.Л., Абрамов П.М., Федорова М.Д. и др. Идентификация нового сайта метилирования в промоторном районе гена *Sept9* для диагностики гепатоцеллюлярной карциномы. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(4):26–37.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-26-37

Identification of a new methylation site in the *Sept9* promoter region for the diagnosis of hepatocellular carcinoma

N.L. Lazarevich^{1,2}, P.M. Abramov¹, M.D. Fedorova¹, I.F. Kustova¹, D.A. Shavochkina¹, A.N. Katargin¹, N.P. Kisseljova¹, N.A. Dyakova¹, I.V. Botezat¹, V.N. Kondratova¹, N.E. Kudashkin¹, Yu.I. Patyutko¹, A.V. Lichtenstein¹, S.V. Vinokurova¹

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

²Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University; Build. 12, 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Background. Over 600,000 people die from hepatocellular carcinoma (HCC) each year worldwide. The disease is often detected at advanced stages and in many cases is not curable. Early diagnostic and monitoring of HCC recurrences remains a substantial problem in clinical oncology. That determines the need for a search for highly sensitive and specific biomarkers for the non-invasive of HCC diagnostics.

The objective of the study. Identification of the hypermethylated locus in the promoter region of the septin 9 (*Sept9*) gene based on the annotated methylomes from the public databases. Experimental validation of methylation on a pilot panel of paired clinical samples of patients with HCC, as well as tissue samples from patients with benign liver tumors and lymphocytes from healthy donors.

Materials and methods. To analyze the methyl data, samples of HCC from TCGA, hepatocellular adenoma from GEO (Gene Expression Omnibus) depository, peripheral blood cells and tissues of healthy donors from Methbank were used. Experimental validation of methylation levels of the identified site was carried out on a pilot panel of clinical samples by bisulphite pyrosequencing using PyroMark Q24.

Results. Based on the analysis of methylome data, we selected cg20275528 site, which is characterized by high level of methylation in HCC tissues and minimal levels of methylation in non-tumor liver tissue, hepatocellular adenoma and peripheral blood of healthy donors. Experimental testing on a pilot panel of clinical specimens showed that the level of marker site methylation in HCC (42 % median) is significantly higher than in non-tumor liver tissues (3 % median) and benign neoplasms (1.5 % median) and exceeds the threshold value in HCC compared to paired samples of adjacent non-tumor liver tissue in 20 out of 30 studied cases (66.6 %). The general possibility for cg20275528 methylation detection in circulating DNA of plasma in HCC patients was shown.

Conclusion. The obtained results indicate that the approach to the detection and experimental verification of diagnostically significant markers developed and tested in this study can be used to identify new differentially methylated sites and to establish new approaches for non-invasive HCC diagnosis.

Key words: hepatocellular carcinoma, methylation markers, septin 9, liquid biopsy

For citation: Lazarevich N.L., Abramov P.M., Fedorova M.D. et al. Identification of a new methylation site in the Sept9 promoter region for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2019;6(4):26–37. (In Russ.).

Введение

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) — преобладающая форма первичного рака печени, которая занимает 6-е место по распространенности и 4-е по смертности среди злокачественных новообразований в мире [1]. ГЦК характеризуется бессимптомным течением, поздними сроками диагностики и крайне неблагоприятным прогнозом [2]. Несмотря на то что наиболее высокая заболеваемость характерна для стран Азии и центральной Африки, за последние годы в развитых странах отмечена устойчивая тенденция к росту заболеваемости и смертности от ГЦК [3].

Эти обстоятельства определяют необходимость поиска диагностических маркеров и разработки методов, которые могли бы обеспечить повышение эффективности ранней диагностики ГЦК. В настоящее время основным клинически значимым белковым маркером для диагностики и мониторинга течения заболевания является альфа-фетопроtein [4], определяемый в сыворотке крови, однако чувствительность теста недостаточна для эффективной диагностики ГЦК (особенно ранних стадий). Ведется анализ эффективности использования совместно с альфа-фетопроteinом таких маркеров, как глипикан 3 (GPC3) и дес-гамма-карбоксиотромбин (DCP), однако чувствительность метода тестирования в случае ранних стадий заболевания остается недостаточной [5].

В настоящее время для диагностики онкологических заболеваний различных локализаций ведется поиск маркеров, основанных на метилировании ДНК. Эти маркеры имеют ряд преимуществ, которые делают их перспективными в качестве опухолевых маркеров для неинвазивной диагностики:

- метилированная ДНК достаточно стабильна в плазме крови и других биологических жидкостях;
- метилирование ДНК зачастую легче поддается оценке ввиду ее специфического расположения в промоторной области определенных генов;

- некоторые эпигенетические маркеры имеют важное значение для раннего выявления рака вследствие их участия в процессах канцерогенеза;

- метилирование может быть обнаружено с помощью чувствительных методик, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), в том числе с использованием малоинвазивных подходов жидкостной биопсии, позволяющих детектировать циркулирующие опухолевые маркеры в биологических жидкостях организма.

Поэтому маркеры метилирования ДНК обладают высоким потенциалом и широким спектром применения в качестве биомаркеров для ранней и неинвазивной диагностики различных форм опухолей [6, 7].

Одним из первых маркеров метилирования, для которых была доказана возможность диагностического использования в малоинвазивных методах жидкостной биопсии, стал CpG-богатый район в альтернативном промоторе V2 гена септин 9 (*Sept9*), расположенного в геномном локусе 17q25.3. Было установлено, что гиперметилирование этого участка — не только частое событие в тканях колоректальной карциномы, но и потенциальный диагностический маркер, который может быть выявлен в циркулирующей ДНК (цДНК), выделенной из плазмы крови пациентов с колоректальным раком [8]. Детальный анализ профиля метилирования CpG-сайтов в этом районе позволил картировать участок с максимальным уровнем метилирования в образцах колоректальной аденомы и карциномы — ампликон 5 (chr17:75369420-75369648 по сборке генома человека GRCh37/hg19) [9]. Эти исследования легли в основу разработки тест-системы mSept9 Epi proColon 2.0 (Epigenomics, Германия) — первого теста на основе анализа метилирования цДНК из плазмы крови, одобренного Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для клинического использования при диагностике колоректального рака [10]. Гиперметилирование *Sept9* описано также при раке молочной железы, пищевода,

желудка, предстательной железы, вне- и внутрипеченочных желчных протоков [11].

Результаты нескольких исследований, опубликованных к настоящему времени, указывают на то, что гиперметилирование промотора гена *Sept9* также характерно и для ГЦК. При анализе профилей метилирования в 221 клиническом образце ГЦК методом гибридизации с использованием Illumina HumanMethylation450 Chip гиперметилирование промотора гена *Sept9* наблюдалось в 61 % проанализированных опухолей [12]. В экспериментальной статье, опубликованной в 2018 г., продемонстрирована возможность использования теста mSept9 Epi proColon 2.0 для диагностики ГЦК среди пациентов с алкоголь- или гепатитиндуцированным циррозом печени [13].

В то же время данные J. Li и соавт. свидетельствуют о том, что гиперметилирование CpG-богатого участка в промоторной области *Sept9* (chr17:75369766-75369791) может быть использовано для дифференциальной диагностики метастазов колоректального рака в печени от тканей ГЦК, в которых этот участок не метилирован [14]. Несогласованность существующих к настоящему времени данных литературы указывает на необходимость более точной детекции конкретных участков промоторной области *Sept9*, гиперметилирование которых характерно для ГЦК и может быть использовано для диагностики ГЦК методами жидкостной биопсии.

В настоящей работе мы провели анализ уровней метилирования промоторных сайтов гена *Sept9* на основании общедоступных баз данных, идентифицировали участки, максимально метилированные в образцах ГЦК по сравнению с образцами неопухолевых тканей печени, и провели экспериментальную верификацию полученных результатов на панели клинических образцов ГЦК и доброкачественных опухолей печени.

Материалы и методы

Анализ общедоступных баз данных метилового профилирования. Анализ метиломных данных был проведен с использованием выборки ГЦК Атласа генома опухолей (The Cancer Genome Atlas, TCGA-LIHC) [15] с помощью онлайн-сервера DiseaseMeth 2.0 (<http://bio-bigdata.hrbmu.edu.cn/diseasemeth>), депозитария первичных данных метиломных исследований генома человека GEO (Gene Expression Omnibus, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>), а также клеток периферической крови и тканей здоровых доноров Methbank 3.0 (<http://bigd.big.ac.cn/methbank>). Хромосомные координаты всех исследованных локусов приведены по сборке генома человека GRCh37/hg19, при необходимости конвертацию из других версий проводили с использованием сервиса LiftOver UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver>).

Клинические образцы. В работе были использованы 30 пар образцов нормальной и опухолевой тканей печени пациентов с гистологически верифицированным диагнозом ГЦК, 10 пар образцов ткани пациентов с добро-

качественными опухолями печени (фокальная нодулярная гиперплазия или гепатоцеллюлярная аденома), полученных при резекции опухолей в отделении опухолей печени и поджелудочной железы НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, а также 23 образца клеток периферической крови здоровых доноров. Сбор образцов проводили после подписания пациентом информированного согласия на использование биологического материала. Кроме этого, в работе были использованы препараты архивных аутопсийных образцов тканей печени пациентов без опухолевых патологий печени. Сводная характеристика исследованных случаев ГЦК и доброкачественных опухолей печени представлена в табл. 1.

Выделение препаратов геномной ДНК и цДНК из плазмы крови. Выделение геномной ДНК проводили из замороженных в жидком азоте образцов неопухолевых и опухолевых тканей печени, масса которых не превышала 30 мг, с помощью набора для выделения геномной ДНК Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, США) согласно протоколу производителя. Выделение геномной ДНК из образцов периферической крови (100 мкл) выполняли с помощью набора для выделения геномной ДНК DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. Выделение цДНК проводили из 1 мл плазмы крови с использованием набора QIAamp ccfDNA/RNA kit (Qiagen, США). Концентрацию препаратов ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США).

Бисульфитная конверсия ДНК. Бисульфитную обработку геномной ДНК из тканей ГЦК, прилежащей неопухолевой ткани печени и клеток периферической крови проводили с использованием набора реактивов EZ DNA Methylation-Gold Kit TM (Zymo Research, США) согласно протоколу производителя. ДНК элюировали в 40 мкл буфера для элюции. Элюат, содержащий очищенную модифицированную ДНК, пригодную для ПЦР-анализа, хранили при температуре -20°C . Бисульфитную обработку цДНК из плазмы крови пациентов с ГЦК проводили с использованием набора EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research, США) согласно протоколу производителя. ДНК элюировали в 20 мкл буфера для элюции и хранили при температуре -20°C .

Амплификация бисульфитно-модифицированной ДНК и пиросеквенирование. Амплификацию бисульфитно-модифицированной ДНК проводили с праймерами, специфичными к участку последовательности ампликона 5 *Sept9*, содержащему целевой CpG-динуклеотид (cg20275528). Дизайн праймеров для амплификации бисульфитно-обработанной ДНК и последующего пиросеквенирования выполнен с использованием программы MethylPrimer 2.0 (<http://www.urogene.org/methylprimer2> [16]). После оптимизации условий бисульфитной конверсии образцов геномной ДНК и цДНК плазмы крови были отработаны оптимальные условия амплификации и последующего пиросеквенирования.

Таблица 1. Клинические характеристики опухолевых образцов, включенных в исследование**Table 1.** Clinical characteristics of tumor samples included in the study

Характеристика Characteristic	Число случаев, n Number of cases, n
Гепатоцеллюлярная карцинома <i>Hepatocellular carcinoma</i>	
Хронический вирусный гепатит: Chronic viral hepatitis:	
нет no	21
HBV	4
HCV	5
Пол, мужской/женский Gender, male/female	20/10
Возраст (среднее $\pm$ SD), лет Age (average $\pm$ SD), years	55,5 $\pm$ 16,8
Стадия TNM: TNM stage:	
I	4
II	11
III	11
IV	4
Размер опухоли, максимальное измерение, см: Tumor size, maximum dimension, cm	
≤ 5	10
5–10	8
>10	12
Внутрипеченочные метастазы: Intrahepatic metastasis:	
есть yes	7
нет no	23
Метастазирование в регионарные лимфатические узлы: Regional lymph node metastasis:	
есть yes	2
нет no	25
НД ND	3
Отдаленные метастазы: Distant metastasis:	
есть yes	1
нет no	29

Характеристика Characteristic	Число случаев, n Number of cases, n
Инвазия в сосуды: Vascular invasion:	
есть yes	17
нет no	13
Степень дифференцировки (по Эдмондсон–Стейнер): Differentiation degree (Edmondson–Steiner):	
G ₁	3
G ₂	16
G ₃	7
G _x	4
Уровень АФП, нг/мл: AFP level, ng/ml:	
низкий (<50) low (<50)	13
высокий (>50) high (>50)	11
НД ND	6
Очаги некроза в опухолевом узле: Necrotic areas in the tumor node:	
есть yes	21
нет no	9
Цирроз: Cirrhosis:	
есть yes	13
нет no	17
Доброкачественные образования печени <i>Benign liver tumors</i>	
Фокальная нодулярная гиперплазия/ аденомы Focal Nodular Hyperplasia/adenomas	5/5
Пол, мужской/женский Gender, male/female	5/5
Возраст (среднее $\pm$ SD), лет Age (average $\pm$ SD), years	38,0 $\pm$ 10,1
Размер опухоли, максимальное измерение, см: Tumor size, maximum dimension, cm	
≤ 5	4
5–10	4
>10	2

Окончание табл. 1
End of table 1

Характеристика Characteristic	Число случаев, n Number of cases, n
Уровень АФП, нг/мл: AFP level, ng/ml:	
низкий (<50) low (<50)	8
высокий (>50) high (>50)	0
НД ND	2
Очаги некроза в узле: Necrotic areas in the tumor node:	
есть yes	3
нет no	7

Примечание. HBV – вирус гепатита В; HCV – вирус гепатита С; НД – нет данных; G_x – уровень дифференцировки не применим; АФП – альфа-фетопrotein.
Note. HBV – hepatitis B virus; HCV – hepatitis C virus; ND – no data, G_x – level of differentiation is not applicable; AFP – alpha fetoprotein.

Использовали 2 праймера: один модифицирован биотином на 5'-конце для последующей иммобилизации на стрептавидиновой сефарозе в процессе пиросеквенирования (SEP9-CpG1 R 5'-RGAAATCR GACATAATACTAATAAACA-3'), второй – немодифицированный праймер (SEP9-CpG1 F 5'-TYGGYGGTTAGTTTTGTA-3').

Для амплификации использовали термостабильную hot-start полимеразу SmarTaq в составе готовой смеси реактивов для ПЦР-анализа – 5X MasDDTaqMIX (Дилат, Россия).

Амплификацию проводили в объеме 25 мкл. Смесь для выполнения реакции содержала: 5 мкл смеси 5X MasDDTaqMIX, специфические праймеры и 2 мкл бисульфитно обработанной ДНК. Постановку ПЦР проводили на амплификаторе T100 (Bio-Rad, США) по следующей программе: 95 °C – 3 мин; 95 °C – 15 с, 48 °C – 15 с, 72 °C – 20 с (45 циклов). Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1,8 % агарозном геле на буфере TAE. Пробы ПЦР содержали только 1 полосу, соответствующую продукту с ожидаемой длиной 138 пар оснований.

Пиросеквенирование выполняли на приборе PyroMark Q24 (Qiagen, США) с использованием специфического праймера для секвенирования (SEP9-CpG1 S 5'-GGTTAGTTTTGTATTGTAGGAG-3'). Анализируемая на пиросеквенаторе последовательность YGYGGGYGYGGYGT TTTAGTTAGYGYGTAG содержит 7 CpG-динуклеотидов, целевой сайт метилирования (cg20275528) отмечен подчеркиванием. Полученные в результате секвенирования последовательности анализировали с помощью программного обеспечения

PyroMark Q24 Advanced Software, позволяющего проводить количественный анализ уровня метилирования сайтов. Изменение уровня метилирования в опухолевой ткани ГЦК рассчитывали как разность между процентом метилирования в ДНК из опухолевой и неопухолевой тканей тех же пациентов. Изменение уровня метилирования в опухолевой ткани ГЦК выше 20 % принимали за положительный уровень метилирования, ниже 20 % – за отрицательный. Статистический анализ данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 7.0.

Результаты

Идентификация специфических для ГЦК сайтов гиперметилирования гена *Sept9* на основании данных метилового профилирования. Поиск CpG-сайтов промоторного участка гена *Sept9*, гиперметилированных в образцах ГЦК, был проведен на основании анализа общедоступных данных метиломных исследований образцов неопухолевой ткани печени и ГЦК, полученных с использованием платформы для гибридизации с ДНК-микрочипами Infinium Human Methylation 450K Bead Chip (Illumina, США), включающей более 480 тыс. специфических локусов метилирования генома человека [17]. Для анализа была использована последовательность, находящаяся между ампликонами 4 и 6 и содержащая ампликон 5 (chr17:75368900-75370620, GRCh37/hg19), по данным литературы характеризующийся наибольшей степенью дифференциального метилирования в опухолях различного происхождения [9]. Этот участок содержит 12 локусов, включенных в Infinium Human Methylation 450K Bead Chip (табл. 2).

На первом этапе отбора был проведен анализ первичных данных профилей метилирования неопухолевой ткани печени и ГЦК из выборки TCGA-LINC [15]. В выборку вошел 371 образец гистологически подтвержденных случаев ГЦК и 50 образцов неопухолевой ткани печени от пациентов с ГЦК. Данные, отражающие долю метилирования каждого из 12 исследуемых локусов, были загружены из базы данных DiseaseMeth 2.0 [18]. Анализ этих результатов продемонстрировал существенную гетерогенность метилирования внутри исследуемого участка.

На 1-м этапе из рассмотрения были исключены локусы с высоким фоновым уровнем в неопухолевой ткани печени, медианные значения уровня метилирования которых для выборки неопухолевой ткани превышали 5 % и/или доля случаев с более чем 20 % уровнем метилирования которых превышала 10 % (cg19554255, cg02884239, cg05184938, cg02320862). После этого были отобраны варианты с высоким уровнем метилирования в ткани ГЦК, для которых медианное значение метилирования по выборке было выше 40 % и/или доля образцов с более чем 40 % уровнем метилирования превышала 65 % (cg06848185, cg20275528, cg12783819). Два из выбранных локусов находятся в ампликоне 5, один непосредственно прилегает к ампликону 4.

Таблица 2. Уровни метилирования 12 геномных локусов в промоторной части гена Sept9 по результатам анализа открытых баз данных
Table 2. Methylation levels of 12 genomic loci in the promoter part of the Sept9 gene based on the results of analysis of open databases

Координаты Coordinates	chr17: 75368902	chr17: 75369051	chr17: 75369055	chr17: 75369091	chr17: 75369219	chr17: 75369224	chr17: 75369228	chr17: 75369484	chr17: 75369657	chr17: 75369939	chr17: 75370284	chr17: 75370611
Маркерный сайт Marker site	cg06848185	cg19554255	cg16779463	cg17300544	cg03804136	cg15044248	cg02884239	cg20275528	cg12783819	cg05184938	cg02320862	cg12985929
Медиана, TCGA-LIHC печень, % Median, TCGA-LIHC liver, %	1,9	5,5	1,7	4,5	4	1,4	6,4	1,6	2,45	10,1	19,5	3,2
Доля положительных случаев (≥ 20 %), TCGA-LIHC печень ($n = 50$), % Percentage of positive cases (≥ 20 %), TCGA-LIHC liver ($n = 50$), %	2	0	0	0	0	0	0	2	4	12	44	2
Медиана, TCGA-LIHC ГЦК, % Median, TCGA-LIHC HCC, %	48,3	34	33,8	63,7	46,4	47,9	30,7	49,7	54	40,8	66,3	34,9
Доля положительных случаев (≥ 20 %), TCGA-LIHC ГЦК ($n = 371$), % Percentage of positive cases (≥ 20 %), TCGA-LIHC HCC ($n = 371$), %	65,8	60,1	57,7	61,5	59,3	60,1	58,8	66,6	70,9	74,4	81,7	67,1
Разница средних значений опухолевых и нормальных образцов Difference between average values of tumor and normal samples	0,359	0,267	0,315	0,44	0,353	0,372	0,223	0,378	0,413	0,254	0,36	0,303
<i>p</i> -value (t-test)	0	0	1,625E-12	0	1,624E-12	1,624E-12	1,624E-12	1,624E-12	0	0	0	1,624E-12

Окончание табл. 2

End of table 2

Координаты Coordinates	chr17: 75368902	chr17: 75369051	chr17: 75369055	chr17: 75369091	chr17: 75369219	chr17: 75369224	chr17: 75369228	chr17: 75369484	chr17: 75369657	chr17: 75369939	chr17: 75370284	chr17: 75370611
Медиана, клетки периферической крови, % Median, peripheral blood cells, %	2,2	3,2	3,7	3,5	5,8	2,5	4,0	1,8	2,6	4,1	7,9	3,2
Медиана, аденомы, % Median, adenomas, %	3,0	7,2	3,5	2,1	5,4	2,2	8,3	1,1	3,9	8,5	15,2	3,3
Доля положительных случаев (≥20 %), аденомы (n = 50), % Percentage of positive cases (≥20 %), adenomas (n = 50), %	6	4	4	6	4	6	4	6	10	18	40	10

Примечание. Жирным шрифтом отмечены параметры, удовлетворяющие условиям, описанным в тексте. Разница средних значений опухолевых и нормальных образцов и статистическая достоверность различий в выборке TCGA-LIHC вычислена с помощью сервиса DiseaseMeth (t-тест Стьюдента). Сайт, выбранный для дальнейшего исследования, выделен красным фоном.

Note. Parameters satisfying the conditions described in the text are marked in bold font. The difference between the average values of tumor and normal samples and the statistical reliability of the differences in the sample TCGA-LIHC was calculated using the service DiseaseMeth (t-test Student). The site selected for further study is highlighted in red background.

Важный критерий для выбора опухольспецифических маркеров, используемых для жидкостной биопсии, — их минимальный фоновый уровень в тканях и клетках, вносящих вклад в общий пул ДНК, циркулирующих в биологических жидкостях организма. Поскольку важным источником цДНК плазмы и сыворотки крови являются клетки периферической крови, на следующем этапе отбора мы сравнили уровни метилирования исследуемых локусов по данным базы Methbank [19], которая включает данные о метилировании образцов крови 4577 здоровых доноров разного возраста, а также от 38 до 322 образцов 8 типов нормальных тканей человека.

Все 3 отобранных сайта демонстрировали низкий (менее 5 %) уровень метилирования в клетках периферической крови здоровых доноров. Минимальный уровень метилирования (1,8 %) был отмечен для сайта cg20275528. Важно отметить, что, по данным сервера Methbank, уровень метилирования всех 12 локусов, расположенных в исследуемом районе, в нормальных тканях молочной железы, кишечника, печени, почки, легкого, щитовидной железы, предстательной железы, кожи не превышает 1 %.

Поскольку ГЦК относится к опухолям с наиболее низкой частотой морфологической верификации результатов дооперационного обследования (66,3 %) [20], важной диагностической задачей является достоверная дифференциация ГЦК от менее агрессивных форм первичных опухолей печени, например гепатоцеллюлярной аденомы. Для решения этой задачи мы использовали данные метиломного анализа выборки, включающей 50 случаев гепатоцеллюлярной аденомы из депозитария первичных данных метиломных исследований генома человека GEO (Gene Expression Omnibus, GSE43091). Для всех 3 выбранных

сайтов медианный уровень метилирования в ткани гепатоцеллюлярной аденомы не превышал 4 %, однако доля случаев, в которых уровень метилирования превышал 20 %, для локуса cg12783819 была выше, чем для остальных, и составила 10 %.

Для дальнейшего исследования нами был выбран сайт cg20275528, для которого в клетках неопухолевой ткани печени, гепатоцеллюлярной аденомы и периферической крови здоровых доноров были выявлены минимальные уровни метилирования (см. табл. 2).

Экспериментальная верификация гиперметилирования сайта cg20275528 при ГЦК методом бисульфитного пиро-секвенирования. В настоящем исследовании мы проанализировали уровень метилирования нового маркерного CpG-динуклеотида (cg20275528) в ампликоне 5 гена *Sept9* на пилотной выборке тканей ГЦК (30 случаев), парных образцов прилежащей неопухолевой ткани печени (30 случаев) и доброкачественных опухолей печени (5 случаев гепатоцеллюлярной аденомы, 5 случаев фокальной нодулярной гиперплазии печени) с помощью метода бисульфитного пиро-секвенирования. Сводная характеристика исследованных случаев представлена в табл. 1. Пиро-секвенирование проводили на приборе PyroMark Q24 (Qiagen, США), полученные в результате секвенирования последовательности анализировали с помощью программного обеспечения PyroMark Q24 Advanced Software, позволяющего проводить количественный анализ уровня метилирования сайтов.

На рис. 1 приведен пример пирограммы для участка гена *Sept9* в неопухолевой ткани печени и опухолевой ткани пациента 18 (ГК 18). Целевой CpG-динуклеотид (cg20275528) обозначен стрелкой. Как видно из пирограммы, уровень метилирования в опухолевой ткани ГЦК составляет 82 %, тогда как в нормальной прилежащей ткани печени — 2 %.

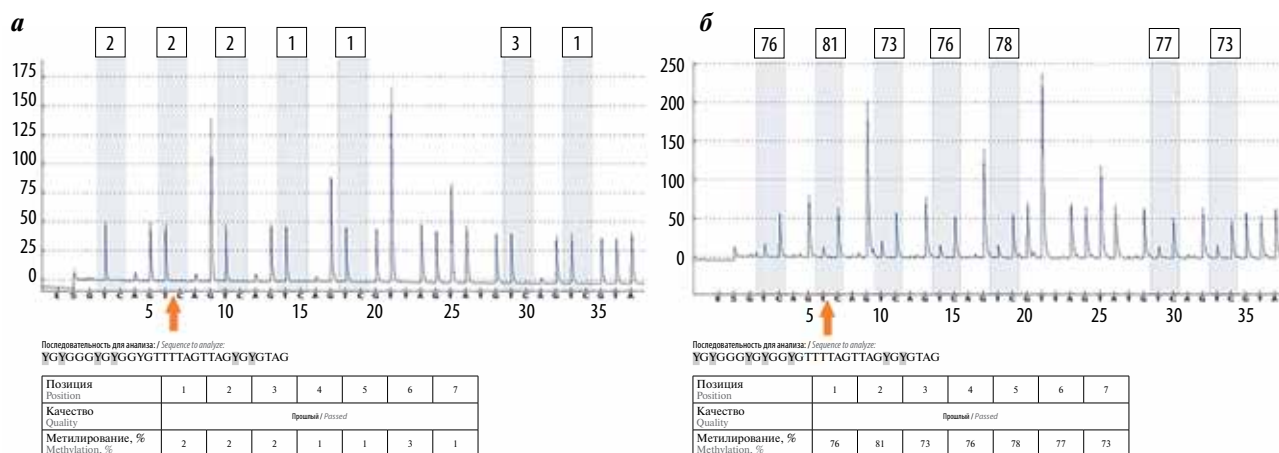


Рис. 1. Пример пирограммы промоторного участка гена *Sept9*: а — пирограммы геномной ДНК неопухолевой ткани печени; б — опухолевой ткани пациента 18 (ГК 18). По оси абсцисс указан порядок нуклеотидов; по оси ординат — уровень сигнала в относительных единицах. Голубым выделены 7 CpG-динуклеотидов, целевой CpG отмечен стрелкой. Процент метилирования указан над каждым CpG-динуклеотидом и в таблице под пирограммой

Fig. 1. Example of a pyrogram of the promoter region of the *Sept9* gene: а — pyrograms for genomic DNA from non-tumor liver tissue; б — tumor liver tissue of the patient 18 (HC 18). The abscissa axis indicates the nucleotide order; the ordinate axis represents detected light in relative units. The "light blue" regions highlight the analyzed CpG sites, arrow indicates the marker CpG site. Percentage of methylation for the respective CpG above them and in the table below

На рис. 2 представлены данные по уровню метилирования маркерного сайта в индивидуальных образцах опухолевой ткани (ГЦК), прилегающей неопухолевой ткани печени тех же пациентов (П) и образцах доброкачественных опухолей печени (ДО).

Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень метилирования маркерного сайта в ГЦК (медиана 42 %) значительно выше, чем в неопухолевых тканях печени (медиана 3 %) или доброкачественных новообразованиях (медиана 1,5 %). Значительное

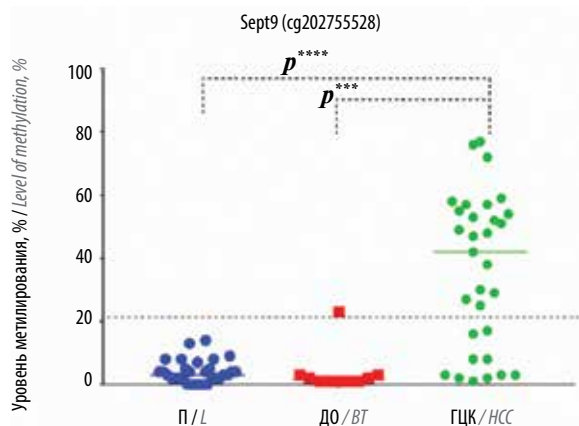


Рис. 2. Уровень метилирования маркерного сайта cg20275528 в индивидуальных клинических образцах. ГЦК — опухолевые ткани (гепатоцеллюлярная карцинома); П — прилегающие неопухолевые ткани печени тех же пациентов; ДО — образцы доброкачественных опухолей печени. Пунктирной линией указан пороговый уровень метилирования — 20 %. *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$ по непараметрическому методу Фридмана

Fig. 2. The level of methylation of the marker site cg20275528 in individual clinical samples. HCC — tumor specimens (hepatocellular carcinoma); L — adjacent non-tumor liver of the same patients; BT — benign tumors. The dotted line indicates the threshold level of methylation — 20 %. *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$ by the non-parametric Friedman

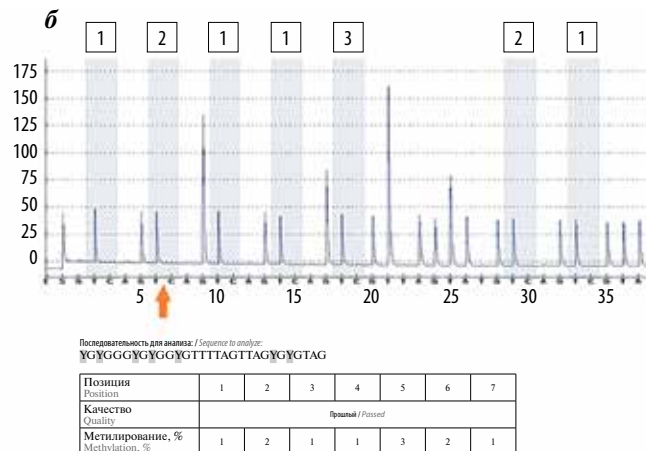
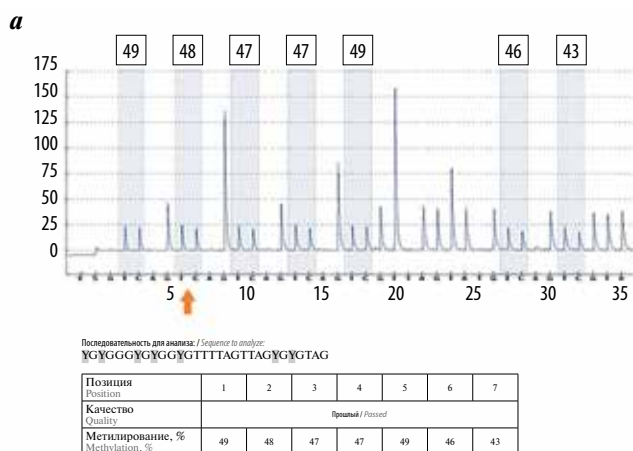


Рис. 3. Пример пирограммы промоторного участка гена Sept9: а — пирограммы циркулирующей ДНК (цДНК) пациента 17; б — цДНК пациента 18. По оси абсцисс указан порядок нуклеотидов; по оси ординат — уровень сигнала в относительных единицах. Голубым выделены 7 CpG-динуклеотидов, целевой CpG отмечен стрелкой. Процент метилирования указан над каждым CpG-динуклеотидом и в таблице под пирограммой

Fig. 3. Example of a pyrogram of the promoter region of the Sept9 gene: а — pyrograms for circulating DNA (cDNA) form patient 17; б — cDNA form patient 18. The abscissa axis indicates the nucleotide order; the ordinate axis represents detected light in relative units. The “light blue” regions highlight the analyzed CpG sites, arrow indicates the marker CpG site. Percentage of methylation for the respective CpG above them and in the table below

повышение уровня метилирования маркерного сайта в ГЦК по сравнению с парными образцами прилегающей нормальной ткани печени обнаруживается в 20 (66,6 %) из 30 исследованных случаев. Эти результаты полностью согласуются с данными, полученными при анализе данных метиломного профилирования образцов ГЦК из выборки TCGA-LIHC (см. табл. 1).

Кроме этого, в исследование были включены 5 архивных аутопсийных образцов печени без опухолевой или неопухолевой патологии печени, а также 7 аутопсийных образцов тканей печени с такими патологиями, как цирроз печени, диабет и стеатогепатит, а также лимфоциты здоровых доноров ($n = 23$). Гиперметилирование маркерного CpG-динуклеотида Sept9 не выявлено ни в одном из контрольных образцов. Средний уровень метилирования маркерного сайта не превышал 4 %.

Полученные результаты полностью подтверждают наблюдения, сделанные нами при анализе баз данных, и свидетельствуют о достаточно высокой специфичности выбранного маркерного сайта метилирования, который может быть использован для дифференциальной диагностики ГЦК от доброкачественных новообразований и неопухолевых заболеваний печени.

На следующем этапе нами была апробирована возможность выявления уровня метилирования маркерного сайта во фракции цДНК пациентов с ГЦК. Для 2 пациентов с высоким (ГК 18) и низким (ГК 17) уровнем метилирования маркерного сайта Sept9 в опухолевой ткани были проанализированы образцы цДНК, выделенной из 1 мл плазмы крови этих пациентов (рис. 3). Оба случая характеризовались большим размером опухолевого узла (> 10 см), наличием очагов некроза, отсутствием внутри- или внепеченочного метастазирования.

По данным бисульфитного секвенирования для пациента ГК 18 уровень метилирования маркерного сайта

в цДНК плазмы крови составил 42 %, тогда как для ГК 17 – 2 %, что коррелирует с уровнем метилирования этого сайта, выявленным в препаратах геномной ДНК, выделенной из опухолевой ткани пациентов (81 и 3 % для ГК 18 и 17 соответственно).

Эти результаты свидетельствуют о том, что низкий уровень фонового метилирования в нормальных тканях организма и значительная степень гиперметилирования сайта cg20275528 в тканях ГЦК позволяют уверенно детектировать опухольспецифическое метилирование этого маркера и демонстрируют принципиальную возможность его выявления в общем пуле цДНК, по крайней мере в опухолях достаточно большого размера, даже «грубым» методом бисульфитного пиросеквенирования.

Полученные нами данные позволяют рассматривать метилирование сайта cg20275528 гена *Sept9* как достаточно специфичный маркер ГЦК и указывают на целесообразность разработки высокочувствительных методов (капельная цифровая ПЦР (ddPCR), метод количественной ПЦР с последующим плавлением (DNA Melting Analysis, PCR-DMA)) [21,22] для создания диагностических тест-систем, позволяющих выявлять aberrантное метилирование этого маркера методами жидкостной биопсии в клинических образцах плазмы крови пациентов с подозрением на первичный рак печени, для скрининга групп риска или мониторинга результатов лечения.

Результаты, полученные в настоящей работе, дополняют наблюдение A. Oussalah и соавт. о том, что гиперметилирование промоторной области гена *Sept9* может быть использовано для дифференциальной диагностики ГЦК среди пациентов с алкоголь- и гепатитиндуцированным циррозом печени. Применение одобренного для клинического использования при колоректальном раке теста Epi proColon позволило уверенно детектировать с помощью малоинвазивного анализа плазмы крови около 80 % случаев ГЦК у этих групп пациентов и продемонстрировало более высокую диагностическую точность, чем анализ на онкоэмбриональный маркер альфа-фетопротеин [13]. В нашем исследовании мы не только локализовали сайт, демонстрирующий максимальный уровень гиперметилирования при минимальных фоновых значениях в неопухолевой ткани печени (независимо от наличия или отсутствия цирроза, хронической инфекции вирусами гепатита В или С, метаболических нарушений), но и продемонстрировали, что aberrантное метилирование локуса cg20275528 позволяет дифференцировать ГЦК от доброкачественных опухолей печени. Несомненно, для определения клинической ценности предложенного маркера целесообразно проведение дополнительных исследований на расширенных выборках пациентов с ГЦК разной этиологии.

Важно отметить, что, по данным анализа разных выборок образцов ГЦК смешанной этиологии ([12], TCGA-LIHC и это исследование), уровень метилирования промоторного участка гена *Sept9* в опухолевой ткани колеблется в интервале 60–70 %.

Опыт поиска диагностических маркеров ГЦК и других форм злокачественных новообразований свидетельствует о том, что наиболее перспективным подходом является использование не единичных маркеров, а их сочетаний [7]. Например, было показано, что сочетание с другими белковыми или метиломными маркерами существенно увеличивает чувствительность использования теста Epi proColon при диагностике колоректального рака [23, 24]. Это наблюдение определяет необходимость поиска и экспериментальной верификации дополнительных маркеров метилирования ГЦК.

Накопление значительного массива данных о профилях метилирования генома различных типов опухолевых и нормальных тканей, полученных методами гибридизации с микрочипами или метиломного секвенирования на представительных коллекциях клинических образцов, открывает значительные перспективы для рационального поиска чувствительных и специфичных маркеров для опухолей различной этиологии. Разработанный и апробированный в этой работе подход к поиску и экспериментальной верификации диагностически значимых маркеров может быть использован для выявления новых дифференциально метилированных сайтов и их сочетаний, которые бы обеспечили максимально чувствительное и специфичное выявление ГЦК, верификацию диагноза и мониторинг течения заболевания.

Заключение

Таким образом, в настоящей работе на основании анализа общедоступных баз данных метиломного профилирования нами выявлен локус гена *Sept9* cg20275528, характеризующийся значительной степенью гиперметилирования в тканях ГЦК и низким уровнем фонового метилирования в нормальных тканях организма и доброкачественных опухолях печени. Дифференциальное метилирование сайта cg20275528 экспериментально подтверждено на выборке клинических образцов российских пациентов с первичными опухолями печени методом бисульфитного секвенирования. На исследованной выборке пациентов с ГЦК частота гиперметилирования составляет 66,6 %, при этом в неопухолевых тканях печени и клетках периферической крови фоновый уровень метилирования крайне низок. Эти результаты открывают возможность для разработки на их основе чувствительных методов выявления опухольспецифической ДНК в плазме крови, которые могут быть использованы для дифференциальной диагностики ГЦК, мониторинга остаточной болезни и результатов лечения. Разработанный алгоритм поиска диагностически значимых сайтов метилирования может быть использован для идентификации дополнительных метиломных маркеров, которые могут быть включены в диагностические панели для высокоспецифической и чувствительной детекции ГЦК, а также других типов злокачественных новообразований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bray F, Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018. DOI: 10.3322/caac.21492.
- Llovet J.M., Zucman-Rossi J., Pikarsky E. et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16018. DOI: 10.1038/nrdp.2016.18.
- Kulik L., El-Serag H.B. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2019;156(2):477–91.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.08.065.
- Abelev G.I., Eraiser T.L. Cellular aspects of alpha-fetoprotein reexpression in tumors. *Semin Cancer Biol* 1999;9(2):95–107.
- Rich N., Singal A.G. Hepatocellular carcinoma tumour markers: current role and expectations. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014;28(5):843–53. DOI: 10.1016/j.bpg.2014.07.018.
- Gai W., Sun K. Epigenetic Biomarkers in Cell-Free DNA and Applications in Liquid Biopsy. *Genes (Basel)* 2019;10(1). DOI: 10.3390/genes10010032.
- Кустова И.Ф., Макарова А.С., Лазаревич Н.Л. Потенциал использования биомаркеров метилирования для диагностики и прогноза гепатоцеллюлярной карциномы методом жидкостной биопсии. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(4):8–19. DOI: 10.17650/2313-805X-2018. [Kustova I.F., Makarova A.S., Lazarevich N.L. Potential of the use of methylation biomarkers for diagnostics and prognosis of hepatocellular carcinoma in liquid biopsy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):8–19. (In Russ.)].
- De Vos T., Tetzner R., Model F. et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem* 2009;55(7):1337–46. DOI: 10.1373/clinchem.2008.115808.
- Wasserkort R., Kalmar A., Valcz G. et al. Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer* 2013;13:398. DOI: 10.1186/1471-2407-13-398.
- Epigenomics, 2016. Epi proColon®. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf13/P130001C.pdf. Accessed date: 1 October 2019.
- Shen N., Wang T., Li D. et al. Hypermethylation of the Sept9 gene suggests significantly poor prognosis in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Front Genet* 2019;10:887. DOI: 10.3389/fgene.2019.00887.
- Villanueva A., Portela A., Sayols S. et al. DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2015;61(6):1945–56. DOI: 10.1002/hep.27732.
- Oussalah A., Rischer S., Bensenane M. et al. Plasma mSEPT9: a novel circulating cell-free DNA-based epigenetic biomarker to diagnose hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine* 2018;30:138–47. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.03.029.
- Li J., Zhou X., Liu X. Detection of colorectal cancer in circulating cell-free DNA by methylated CpG tandem amplification and sequencing. *Clin Chem* 2019;65(7):916–26. DOI: 10.1373/clinchem.2019.301804.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell* 2017;169(7):1327–41.e23. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.046.
- Li L.C., Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002;18(11):1427–31. DOI: 10.1093/bioinformatics/18.11.1427.
- Illumina, 2011. Available at: https://support.illumina.com/array/array_kits/infinium_humanmethylation450_beadchip_kit/downloads.html. Accessed date: 1 October 2019.
- Xiong Y., Wei Y., Gu Y. et al. DiseaseMeth version 2.0: a major expansion and update of the human disease methylation database. *Nucleic Acids Res* 2017;45(D1):D888–95. DOI: 10.1093/nar/gkw1123.
- Li R., Liang F., Li M. et al. MethBank 3.0: a database of DNA methylomes across a variety of species. *Nucleic Acids Res* 2018;46(D1):D288–95. DOI: 10.1093/nar/gkx1139.
- Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 236 с. [State of oncological care in Russia in 2017. Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena — filial FGBU “NMIRTS radiologii” Minzdrava Rossii, 2018. 236 p. (In Russ.)].
- Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22(1):130–1. DOI: 10.2144/97221bi01.
- Malentacchi F., Forni G., Vinci S., Orlando C. Quantitative evaluation of DNA methylation by optimization of a differential-high resolution melt analysis protocol. *Nucleic Acids Res* 2009;37(12):e86. DOI: 10.1093/nar/gkp383.
- Bergheim J., Semaan A., Gevensleben H. et al. Potential of quantitative SEPT9 and SHOX2 methylation in plasmatic circulating cell-free DNA as auxiliary staging parameter in colorectal cancer: a prospective observational cohort study. *Br J Cancer* 2018;118(9):1217–28. DOI: 10.1038/s41416-018-0035-8.
- Song L., Yu H., Jia J., Li Y. A systematic review of the performance of the SEPT9 gene methylation assay in colorectal cancer screening, monitoring, diagnosis and prognosis. *Cancer Biomark* 2017;18(4):425–32. DOI: 10.3233/CBM-160321.

Вклад авторов

Н.Л. Лазаревич: разработка концепции исследования, руководство работами, интерпретация данных, написание текста статьи, анализ баз данных;

П.М. Абрамов, А.Н. Катаргин: бисульфитная конверсия и пиросеквенирование;

М.Д. Федорова: дизайн праймеров, оптимизация условий, проведение полимеразной цепной реакции, бисульфитная конверсия и пиросеквенирование;

И.Ф. Кустова, Н.А. Дьякова, В.Н. Кондратова: выделение нуклеиновых кислот;

Д.А. Шавочкина, Н.Е. Кудашкин, Ю.И. Патютко: получение клинических образцов, сбор клинических данных;

Н.П. Киселева, И.В. Ботезату: дизайн праймеров, оптимизация условий, проведение полимеразной цепной реакции;

А.В. Лихтенштейн: разработка концепции исследования, руководство работами, интерпретация данных;

С.В. Винокурова: разработка концепции исследования, руководство работами, интерпретация данных, написание текста статьи, дизайн праймеров, оптимизация условий, проведение полимеразной цепной реакции.

Authors' contributions

N.L. Lazarevich: study design, general management, data interpretation, manuscript preparation, database analysis;

P.M. Abramov, A.N. Katargin: bisulfite conversion and pyrosequencing;

M.D. Fedorova: primer design, optimization of conditions, polymerase chain reaction, bisulfite conversion and pyrosequencing;
I.F. Kustova, Dyakova, V.N. Kondratova: isolation of nucleic acids;
D.A. Shavochkina, N.E. Kudashkin, Yu.I. Patyutko: nucleic acid isolation;
N.P. Kisseljova, I.V. Botezatu: primer design, optimization of conditions, polymerase chain reaction;
A.V. Lichtenstein: study concept design, general management, data interpretation;
S.V. Vinokurova: study concept design, general management, data interpretation, manuscript preparation, primer design, optimization of conditions, polymerase chain reaction.

ORCID авторов/ORCID of authors

Н.Л. Лазаревич/N.L. Lazarevich: <https://orcid.org/0000-0001-9560-1383>
П.М. Абрамов/P.M. Abramov: <https://orcid.org/0000-0002-7995-3490>
М.Д. Федорова/M.D. Fedorova: <https://orcid.org/0000-0002-8813-7516>
И.Ф. Кустова/I.F. Kustova: <https://orcid.org/0000-0001-6480-0793>;
Д.А. Шавочкина/D.A. Shavochkina: <https://orcid.org/0000-0001-7254-8356>
А.Н. Катаргин/A.N. Katargin: <https://orcid.org/0000-0002-7405-0671>
Н.П. Киселева/N.P. Kisseljova: <https://orcid.org/0000-0003-0236-4548>
Н.А. Дьякова/N.A. Dyakova: <https://orcid.org/0000-0002-7431-7129>
И.В. Ботезату/I.V. Botezatu: <https://orcid.org/0000-0002-0297-4963>
В.Н. Кондратова/V.N. Kondratova: <https://orcid.org/0000-0003-0614-8789>
Н.Е. Кудашкин/N.E. Kudashkin: <https://orcid.org/0000-0003-0504-585X>
Ю.И. Патютко/Yu.I. Patyutko: <https://orcid.org/0000-0002-5995-4138>
А.В. Лихтенштейн/A.V. Lichtenstein: <https://orcid.org/0000-0002-0190-5069>
С.В. Винокурова/S.V. Vinokurova: <https://orcid.org/0000-0003-1615-3928>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Данное исследование выполняется в рамках экспериментального государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации при координации ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Минздрава России.

Financing. The study was performed as a part of an experimental state task from the Ministry of Health of the Russian Federation under supervision of the Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks, Ministry of Health of the Russian Federation.

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

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

Клинико-anamnestические и молекулярно-генетические критерии синдрома Линча

А.В. Семьянихина¹, Н.И. Поспехова¹, М.Г. Филиппова¹, Д.А. Головина¹, А.О. Расулов², Л.Н. Любченко^{1,3}

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

²НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 105425 Москва, 3-я Парковая ул., 51, стр. 1;

³ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8—2

Контакты: Александра Владимировна Семьянихина alexandra_silina@mail.ru

Синдром Линча (СЛ) — самый частый наследственный онкологический синдром, ассоциированный с высоким риском развития рака толстой кишки, злокачественных новообразований верхних отделов желудочно-кишечного тракта, мочевыделительной системы, головного мозга, женской репродуктивной системы. В составе СЛ диагностируется единственно известная форма наследственного рака тела матки. Этиологическим фактором развития СЛ являются герминальные мутации в генах системы репарации неправильно спаренных оснований ДНК (DNA mismatch repair (MMR)). Картирование данных генов, а также открытие феномена микросателлитной нестабильности (microsatellite instability, MSI) расширило наши представления о патогенезе линч-ассоциированных опухолей и стало основой для молекулярных скрининговых исследований. Превышая в диагностической точности все разработанные ранее клинические критерии и рекомендации, MSI-тестирование наряду с оценкой экспрессии MMR-белков при иммуногистохимическом исследовании уверенно занимает лидирующее место в ранней диагностике СЛ. В данной статье приведен краткий обзор литературы, отражающий основные эволюционные этапы развития клинико-anamnestических и молекулярно-генетических критериев СЛ, а также собственные данные, демонстрирующие точность амстердамских критериев, рекомендаций Бетезда и MSI-диагностики при определении показаний для MMR-генотипирования у больных с формально-генетическим диагнозом рака толстой кишки в составе СЛ.

Ключевые слова: рак толстой кишки, синдром Линча, амстердамские критерии, рекомендации Бетезда, микросателлитная нестабильность

Для цитирования: Семьянихина А.В., Поспехова Н.И., Филиппова М.Г. и др. Клинико-anamnestические и молекулярно-генетические критерии синдрома Линча. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(4):38–46.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-38-46

Clinical, anamnestic, molecular and genetic criteria for Lynch syndrome

A.V. Semyanikhina¹, N.I. Pospekhova¹, M.G. Filippova¹, D.A. Golovina¹, A.O. Rasulov², L.N. Lyubchenko^{1,3}

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

²N.A. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology — branch of National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russia; Build. 1, 51 3rd Parkovaya St., Moscow 105425, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia; 8—2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

Lynch syndrome is the most common cancer-prone syndrome associated with a high risk of colorectal cancer (CRC), neoplasms of the upper gastrointestinal system, the urinary tract, the female reproductive system, brain tumours and others. The only known form of hereditary endometrial cancer is also diagnosed as part of Lynch syndrome. One or more pathogenic germline mutations in one of the mismatch repair (MMR) genes are the cause of Lynch syndrome. Mapping of MMR genes and the discovery of microsatellite instability (MSI) have given rise to the possibility of using these clue characteristics of the pathogenic process for the elaboration of a screening test for Lynch syndrome. Being highly accurate and superior to all previously developed clinical criteria and guidelines, MSI-testing along with the assessment of the expression patterns of MMR proteins by immunohistochemistry has taken the leading role in the early diagnosis of Lynch syndrome. This article focuses on a brief review about the main evolutionary stages of clinical, anamnestic, molecular and genetic criteria for Lynch syndrome together with the results of our own research on the accuracy of the Amsterdam criteria, the Bethesda guidelines and MSI-diagnostics in the determination of the indications for MMR-genotyping in colorectal cancer patients suspected for Lynch syndrome.

Key words: colorectal cancer, Lynch syndrome, the Amsterdam criteria, the Bethesda guidelines, microsatellite instability

For citation: Semyanikhina A.V., Pospekhova N.I., Filippova M.G. et al. Clinical, anamnestic, molecular and genetic criteria for Lynch syndrome. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2019;6(4):38–46. (In Russ.).

Введение

Наследственная синдромальная патология в структуре злокачественных новообразований (ЗНО) толстой кишки регистрируется в 5–10 % случаев, при этом самым частым ее вариантом является синдром Линча (СЛ), один из наиболее изученных наследственных синдромов, на долю которого приходится до 3 %, т. е. подавляющее большинство случаев генетически обусловленных форм колоректального рака [1–3]. СЛ — самый частый наследственный синдром¹, обуславливающий высокий риск онкологических заболеваний, с частотой аллельного носительства патологических вариантов в генах системы репарации неспаренных оснований ДНК (DNA mismatch repair (MMR)) 1:400 в общей популяции. Являясь реже диагностируемым состоянием, СЛ уступает в распространенности лишь наследственному раку молочной железы и/или яичников, где герминальные BRCA-мутации определяются у 1 на 500–1000 человек [1, 4, 5]. Продолжительное время СЛ был синонимичной номенклатурной единицей с наследственным неполипозным раком толстой кишки для дифференциального отличия от истинных полипозных вариантов наследственного колоректального рака. В настоящее время СЛ определяется как самостоятельная нозологическая форма, диагностическим критериям которой не противоречит наличие у пациента олигополипозного поражения желудочно-кишечного тракта. Генетическая и фенотипическая гетерогенность СЛ, обусловленная в первую очередь молекулярной природой данного заболевания, определяет выраженный клинический перекрест с другой синдромальной опухолевой патологией толстой кишки прежде всего с рецессивно-наследуемыми полипозными состояниями, такими как *MUTYH*- и *NTHL1*-ассоциированный полипоз, синдром биаллельной инактивации MMR-генов, а также некоторыми моногенными заболеваниями (*POLE/POLD1*-ассоциированный синдром, синдром Коудена и др.).

Этиологическим фактором развития опухолей в составе СЛ является снижение эффективности работы системы репарации неправильно спаренных оснований, обусловленный в подавляющем большинстве случаев герминальными мутациями в генах *MLH1/MSH2* (70–85 %), реже в генах *MSH6*, *PMS2* и *EP300* [4–6]. Наследуемые эпимутации в гене *MLH1*, нарушения, вклад которых в развитие данной синдромальной патологии подтвержден относительно недавно, также ассоциированы с развитием СЛ, однако остаются крайне редко и/или гиподиагностируемыми молекулярными изменениями [7]. Геномная нестабильность, реализуемая через недостаточность репаративных механизмов при СЛ, проявляется микросателлитной нестабильностью (microsatellite instability, MSI) — ведущим диагностическим скрининго-

вым маркером, тестирование которого включено во все международные диагностические стандарты для всех вновь диагностированных случаев рака толстой кишки (РТК) [8–10].

Основными клиническими проявлениями СЛ являются РТК и рак тела матки у женщин, кумулятивные риски которых на протяжении жизни достигают 80 и 60 % соответственно [11]. Другие реже манифестирующие опухоли — ЗНО вышеразположенных отделов пищеварительного тракта, органов мочевыделительной системы, гепатобилиарной системы, кожи, яичников у женщин и др. [11]. Риски развития опухолей указанных локализаций зависят от генотипа пациента. Так, больные-носители патологического *MSH2*-генотипа характеризуются как большей вероятностью онкологической патологии мочеполовой системы, так и в целом более широким спектром вторых первичных опухолей [11].

Линч-ассоциированный колоректальный рак как основная форма онкологических заболеваний, наблюдаемых при СЛ, характеризуется определенными клинико-морфологическими чертами, позволяющими в ряде случаев уже на додиагностическом этапе если не предположить наследственный характер заболевания, то усомниться в отсутствии вклада нарушений MMR-системы в патогенезе этой опухоли у данного больного. Молодой возраст манифестации заболевания, правосторонняя локализация опухолевого поражения, муцинозный, перстневидноклеточный, медуллярный гистотип низкой степени дифференцировки, кроноподобная лимфоидная реакция, а также первично-множественные опухоли толстой кишки определяют MMR-дефицитный фенотип, обусловленный у молодых больных в подавляющем большинстве случаев герминальными мутациями, у пациентов старшей возрастной группы — соматическими изменениями в генах системы репарации неправильно спаренных оснований [9, 12, 13]. Возрастная граница РТК в составе СЛ является крайне относительным понятием, как и спектр ЗНО, ассоциированных с СЛ, который, как показано в недавних исследованиях, может включать практически любую нозологическую опухолевую единицу [14].

Для дифференциации больных с формально-генетическим диагнозом СЛ в 1990-е годы последовательно разработаны и внедрены в практику клинические критерии Амстердам I и Амстердам II, соответствие которым являлось прямым показанием для ДНК-диагностики генов MMR-системы [15, 16]. Консенсусные клинические критерии для диагностики СЛ были впервые представлены в 1991 г. и обозначены как амстердамские критерии [8]. Так называемые критерии «3-2-1» подразумевали наличие не менее 3 родственников с колоректальным раком,

¹На сегодняшний день описано около 200 наследственных онкологических синдромов, ответственных за 5–10 % всех случаев злокачественных опухолей различных локализаций [1].

не менее чем в 2 пораженных поколениях, не менее чем с 1 больным членом семьи в возрасте моложе 50 лет. Расширение спектра опухолей, ассоциированных с СЛ, привело к пересмотру исходного варианта, и в 1999 г. представлены дополненные амстердамские критерии (табл. 1) [9].

С открытием патогенетического «фундамента», характеризующего генотип опухолей в составе СЛ — микросателлитной нестабильности, рекомендации Бетезда, опирающиеся на анамнестические и клинкоморфологические данные больных, вводят MSI-тестирование как обязательное диагностическое исследование для последующей молекулярно-генетической диагностики [17, 18]. Картирование генов MMR-системы, а также внедрение в клиническую практику тестирования позволили оптимизировать скрининговую

программу, направленную на селективный отбор больных для последующего ДНК-генотипирования через определение MSI-статуса в образце опухолевой ткани. Показания для выполнения данного исследования и определяют рекомендации Бетезда (см. табл. 1), учитывающие помимо семейной истории клинические данные пациента и гистологические особенности опухоли (так называемый линчподобный, или MSI-High-подобный, фенотип) [10, 11].

Несмотря на высокую специфичность критериев Амстердам, особенно I пересмотра, а также крайне высокую специфичность рекомендаций Бетезда, точность данных диагностических критериев крайне низкая, что не позволяет применять их как надежный скрининговый метод отбора больных с СЛ. В ряде исследований показано, что половина больных с мо-

Таблица 1. Клинические критерии Амстердам I, Амстердам II и рекомендации Бетезда

Table 1. Amsterdam I, Amsterdam II clinical criteria and the Bethesda guidelines

Клинические критерии/ рекомендации Clinical criteria/guidelines	Описание Description
Амстердам I Amsterdam I	1. Три родственника с РТК 2. Один член семьи с РТК является родственником I степени родства по отношению к двум другим с РТК 3. Накопление случаев РТК более чем в 1 поколении 4. Не менее 1 родственника с РТК в возрасте до 50 лет 5. Семейный аденоматозный полипоз должен быть исключен 1. At least three relatives with CRC 2. One relative with CRC is a first-degree relative of the other two relatives with CRC 3. At least two successive generations with CRC 4. At least 1 relative diagnosed before the age of 50 5. Familial adenomatous polyposis should be excluded
Амстердам II Amsterdam II	1. Три родственника со ЗНО из спектра СЛ 2. Один член семьи со ЗНО из спектра СЛ является родственником I степени родства по отношению к двум другим со ЗНО из спектра СЛ 3. Накопление случаев ЗНО из спектра СЛ более чем в 1 поколении 4. Не менее 1 родственника со ЗНО из спектра СЛ в возрасте до 50 лет 5. Семейный аденоматозный полипоз должен быть исключен 1. At least three relatives with a MT from the SL spectrum 2. One relative with a MT from the SL spectrum is a first-degree relative of the other two relatives with a MT from the SL spectrum 3. At least two successive generations with a MT from the SL spectrum 4. At least 1 relative with a MT from the SL spectrum diagnosed before the age of 50 5. Familial adenomatous polyposis should be excluded
Бетезда Bethesda	1. РТК у пациента в возрасте до 50 лет 2. Синхронный или метакронный первично-множественный РТК или другие ЗНО из спектра СЛ 3. MSI-High-ассоциированные морфологические черты опухоли у пациента моложе 60 лет 4. Не менее 1 родственника I степени родства со ЗНО из спектра СЛ в возрасте до 50 лет 5. РТК у больного при наличии 2 и более родственников I или II степени родства со ЗНО из спектра СЛ 1. CRC diagnosed in a patient who is less than 50 years of age 2. Presence of synchronous or metachronous multiple primary CRC or other MT from the LS spectrum 3. MSI-High-associated morphological characteristics of the tumor in a patient under 60 years of age 4. At least 1 relative with a MT from the LS spectrum diagnosed under the age of 50 years 5. CRC in a patient with at least 2 first- or second-degree relatives with a MT from the LS spectrum

Примечание. РТК — рак толстой кишки; ЗНО — злокачественное новообразование; СЛ — синдром Линча; MSI-High — высокий уровень микросателлитной нестабильности.

Note. CRC — colorectal cancer; MT — malignant tumour; LS — Lynch syndrome; MSI-High — high level of microsatellite instability.

лекулярно-верифицированным СЛ не будет соответствовать критериям Амстердам II, а специфичность рекомендаций Бетезда обратно пропорциональна их чувствительности [5, 19–22]. Аналитические математические модели, такие как MMRpro [23], PREMM [24, 25], MMR predict [26], также не показали высокой скрининговой эффективности, будучи ориентированными на определение группы риска, нежели чем на всю популяцию больных с СЛ. В связи с этим диагностические критерии при СЛ закономерно эволюционировали от клиничко-анамнестического подхода до определения опухолеассоциированных маркеров с последующим генотипированием генов MMR-системы [27].

На сегодняшний день представлены 2 самостоятельные методики, независимо выступающие как скрининговые диагностические тесты при СЛ: определение MSI-статуса с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуногистохимическое (ИГХ) исследование для оценки экспрессии MMR-белков [27, 28].

MSI-тестирование, основанное на детекции длин как минимум 5 микросателлитных повторов в опухолевой ДНК, является регламентированным и высокоточным методом, особенно при применении панели однонуклеотидных маркеров, одобренных NIH (BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27) [17]. При наличии 2 и более нестабильных маркеров опухоль считается микросателлитно-нестабильной с высоким уровнем данного показателя и обозначается как MSI-High. Один нестабильный маркер относит образец к РТК с низким уровнем микросателлитной нестабильности — MSI-Low. Статус MSI-High влечет за собой необходимость применения ряда дополнительных диагностических тестов, таких как оценка *BRAF*-генотипа и определение гиперметилирования промоторной области гена *MLH1*, особенно у больных старшей возрастной группы [21]. При отсутствии соматических мутаций в гене *BRAF* и/или аномального метилирования в гене *MLH1* выполняется последующее молекулярно-генетическое исследование на предмет наличия герминальных мутаций в генах MMR-системы [9].

Число исследуемых MMR-белков при ИГХ-диагностике варьирует в различных исследовательских центрах. При этом оценка статуса как минимум 2 маркеров — *MLH1* и *MSH2* — является обязательной, в большинстве случаев она дополняется белками *PMS2* и *MLH6*, образующими гетеродимеры с 2 вышеуказанными белками [29]. Чувствительность ИГХ-исследования в таком случае составляет 83 %, специфичность — 89 % [30]. По аналогии с ПЦР-тестированием при изолированной утрате экспрессии гена *MLH1* рекомендуется оценка *BRAF*-генотипа и статуса метилирования промоторной области гена *MLH1*. Весомым преимуществом ИГХ-исследования перед ПЦР-методом является сужение диагностического поиска за счет определения утраты экспрессии конкретного белкового маркера,

что невозможно оценить с помощью ПЦР-методики. Внедрение технологий секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) с возможностью применения в ДНК-диагностике наследственных заболеваний таргетных панелей, изучения клинического экзема или полноэкзонного/полногеномного секвенирования, однако, нивелирует данную разницу. В целом определение статуса MSI или оценка MMR-экспрессии позволяют не пропустить более 90 % больных с СЛ, что значительно превосходит в точности и эффективности все клинические критерии.

Решением скринингового этапа при диагностике СЛ в ближайшие годы может стать комплексная синхронная оценка дефицита в MMR-системе, а также сопутствующих соматических нарушений с помощью технологий NGS. Разработанные на сегодняшний день тестовые платформы, такие как SINGH, MSI sensor, приближают чувствительность и специфичность данного скринингового метода к 96–100 % [31, 32]. Оценивая состояние множественного количества локусов кандидатов, данные платформы позволяют изучить соматический профиль генов MAPK-киназного пути, токсичности и др., широко варьируя в выборе маркеров, в зависимости от потребностей лаборатории-заказчика.

Цель нашего экспериментального исследования, дополняющего представленный аналитический обзор, — оценка точности клинических критериев Амстердам I и Амстердам II у больных РТК с формально-генетическим диагнозом СЛ при клиническом соответствии рекомендациям Бетезда.

Материалы и методы

В исследование включены 117 пациентов (57 (48,7 %) мужчин и 60 (51,3 %) женщин) с формально-генетическим диагнозом наследственного РТК в составе СЛ, которые проходили обследование и/или находились на лечении в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина с 1972 по 2018 г. Медико-генетическое консультирование проведено в Медико-генетическом центре НИИ клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова на базе научно-консультативного отделения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Все больные клинически соответствовали пересмотренным рекомендациям Бетезда, семейный аденоматозный полипоз исключен по клиничко-анамнестическим данным.

ДНК-генотипирование на предмет наличия герминальных мутаций в генах *MLH1* (экзоны 1–19; RefSeq ENST00000231790.2) и *MSH2* (экзоны 1–16, RefSeq ENST00000233146.2) в объеме оценки первичной структуры кодирующей части и сайтов-сплайсинга выполнено всем пациентам исследуемой группы. Статус MSI в образце опухолевой ткани с применением стандартной панели однонуклеотидных маркеров (BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27) оценен у 28 больных с молекулярно-верифицированным СЛ,

а также у 10 пациентов с СЛ с помощью ИГХ-метода (оценка экспрессии MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). Двум больным MSI-тестирование не выполнено в связи с отсутствием биологического материала. Все молекулярно-генетические исследования проведены на базе лаборатории клинической онкогенетики НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с применением программы математической обработки данных IBM SPSS Statistics (версия 22.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, США), а также компьютерной программы Microsoft Excel. Соответствие критериям Амстердам оценивали с помощью анализа клинико-анамнестических данных больных. Чувствительность диагностических критериев определяли как долю истинно положительных диагнозов среди больных, соответствующих критериям; специфичность — как долю истинно отрицательных диагнозов среди больных, не соответствующих критериям. Точность метода определяли по отношению числа истинно положительных и истинно отрицательных диагнозов к общему числу окончательных диагнозов.

Результаты

В представленном исследовании при анализе основных клинических характеристик группы пациентов средний возраст на момент манифестации РТК составил $41,8 \pm 1,2$ года. У 43 (36,8 %) больных колоректальный рак диагностирован в составе первично-множественных ЗНО. В среднем у каждого пациента диагностировано 3 (2–7) ЗНО. Временной интервал до манифестации последующей первичной опухоли составил $3,6 \pm 1,5$ (0–26) года. Самыми частыми вторыми ЗНО были синхронный или метакронный РТК

(51 % ($n = 43$)) и рак тела матки (12 % ($n = 10$)). Частота вторых первичных опухолей представлена на рис. 1.

Отягощенный онкологический семейный анамнез отмечен у 105 (89,7 %) пациентов. При анализе родословных:

- число родственников со ЗНО в среднем составило 3 (1–12) человека;
- число пораженных поколений — 2,5 (1–4);
- наличие родственников I степени родства с любым ЗНО независимо от возраста выявлено у 81 (77,1 %) больного, у 32 (39,5 %) из них диагностирован РТК в возрасте до 50 лет;
- наличие родственников II степени родства со ЗНО выявлено у 80 (76,2 %) больных;
- наличие родственников III степени родства со ЗНО выявлено у 32 (30,5 %) больных;
- среднее число родственников I степени родства со ЗНО в среднем составило 2 (0–6);
- среднее число родственников II степени родства со ЗНО — 2 (0–5);
- среднее число родственников III степени родства со ЗНО — 1 (0–2).

На рис. 2 представлен спектр ЗНО в семейном анамнезе больных с формально-генетическим диагнозом СЛ.

При оценке первичной структуры кодирующей части генов *MLH1* и *MSH2* патогенные клинически значимые герминальные мутации выявлены у 30 больных (25,6 %); в гене *MLH1* — у 17 (56,6 %), в гене *MSH2* — у 13 (43,4 %).

Отягощенный онкологический семейный анамнез зарегистрирован у 28 (93,3 %) больных с СЛ. Отсутствие онкологической нагруженности отмечено у 1 пациента с патологическим *MLH1*-генотипом и у 1 боль-

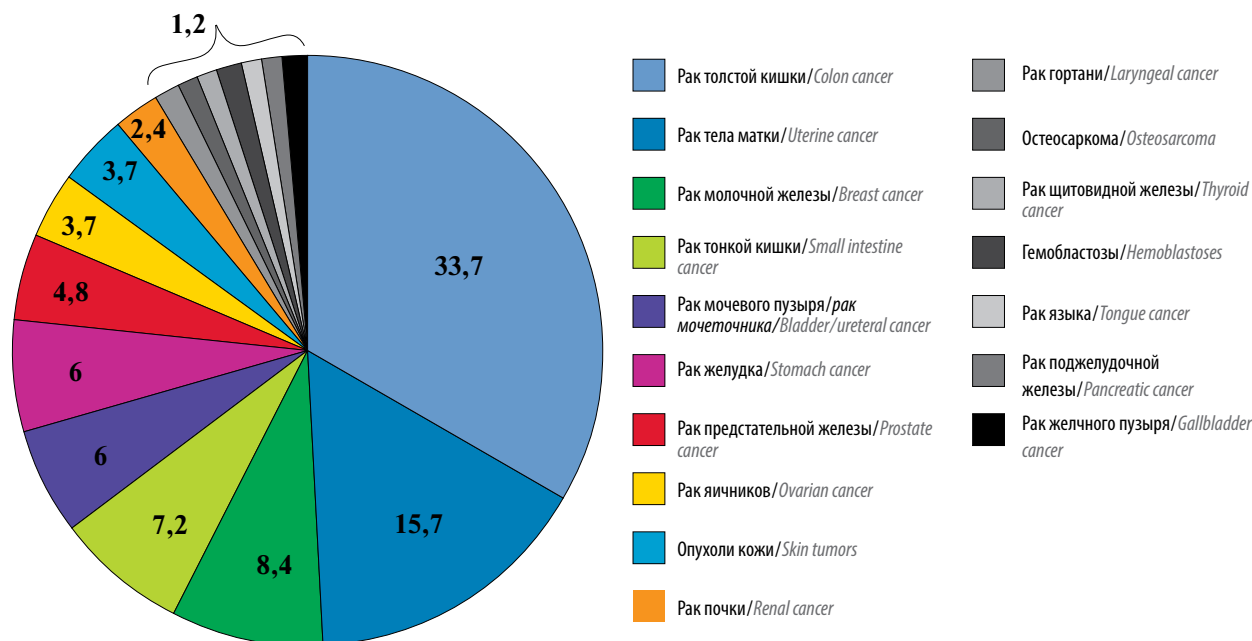


Рис. 1. Частота вторых первичных опухолей у больных с формально-генетическим диагнозом синдрома Линча, %
Fig. 1. Frequency of secondary primary tumors in patients with formal genetic diagnosis of Lynch syndrome, %

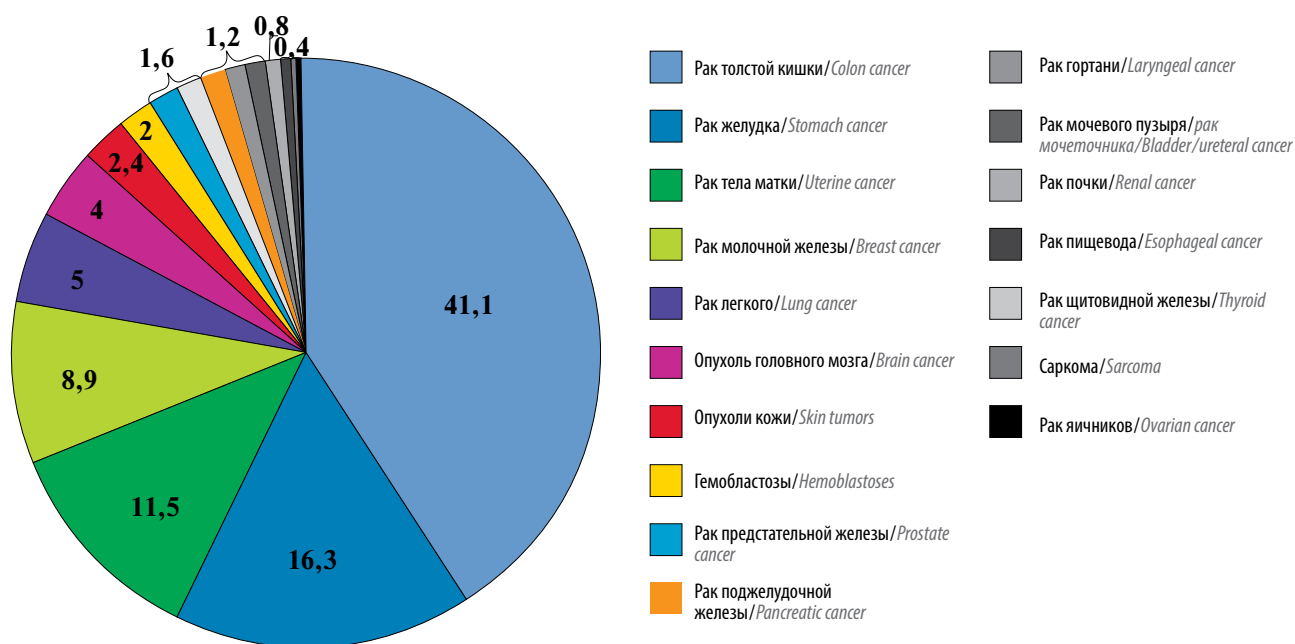


Рис. 2. Спектр злокачественных новообразований в семейном анамнезе больных с формально-генетическим диагнозом синдрома Линча, %
Fig. 2. Spectrum of malignant tumors in family history of patients with formal genetic diagnosis of Lynch syndrome, %

ного с герминальной мутацией в гене *MSH2*. При анализе родословных:

- наличие родственников I степени родства со ЗНО выявлено у 27 (96,4 %) больных, у 15 (55,5 %) из них диагностирован РТК в возрасте до 50 лет;
- наличие родственников II степени родства со ЗНО выявлено у 24 (85,7 %) больных;
- наличие родственников III степени родства со ЗНО выявлено у 9 (32,1 %) больных;
- число пораженных поколений в среднем составило 2,7 (2–4);
- среднее число родственников со ЗНО в родословной – 4,1 (0–12);
- среднее число родственников I степени родства со ЗНО в родословной – 1,6 (0–5);
- среднее число родственников II степени родства со ЗНО в родословной – 2,4 (0–5);
- среднее число родственников III степени родства со ЗНО в родословной – 1,4 (0–2).

Все пациенты, включенные в исследование, клинически соответствовали пересмотренным рекомендациям Бетезда, при этом молекулярной верификации генетического диагноза СЛ удалось достичь только у 30 (25,6 %) больных.

При оценке чувствительности и специфичности амстердамских критериев наиболее высокое значение точности (85 %) показано для критериев I пересмотра. Критерии Амстердам I, являясь крайне строгими, при специфичности 90 % не позволили отобрать для ДНК-диагностики 41 % больных с СЛ, критерии Амстердам II – 31 %. В табл. 2 представлена точность критериев Амстердам I и Амстердам II для пациентов, включенных в исследование.

При оценке статуса микросателлитной нестабильности наличие более одного нестабильного маркера (MSI-High) в образцах колоректального рака у больных с СЛ выявлено во всех исследованных случаях при наличии опухолевого материала у пациента. У 6 больных

Таблица 2. Точность критериев Амстердам I (KAI) и Амстердам II (KAII) для пациентов с формально-генетическим диагнозом синдрома Линча, включенных в исследование

Table 2. Accuracy of Amsterdam I (AI) and Amsterdam II (AII) criteria for patients with formal genetic diagnosis of Lynch syndrome included in the study

Критерии Criteria	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %	Точность, % Accuracy, %
Амстердам I Amsterdam I	KAI+/СЛ+ AI+/LS+ 59	KAI–/СЛ– AI–/LS– 90	85
Амстердам II Amsterdam II	KAII+/СЛ+ AII+/LS+ 69	KAII–/СЛ– AII–/LS– 75	75

нестабильный MMR-фенотип определен в образцах опухолей других линч-ассоциированных локализаций (рак яичников, рак тела матки, рак мочевого пузыря, рак тонкой кишки).

Обсуждение

Основной целью настоящего исследования была оценка точности первых разработанных клинических рекомендаций, позволяющих идентифицировать больных с формально-генетическим диагнозом СЛ с последующим изучением вклада рекомендаций Бетезда и MSI-тестирования в скрининговый этап диагностики данного синдрома. Для достижения цели все больные, включенные в исследование, исходно соответствовали по клинко-анамнестическим данным пересмотренным рекомендациям Бетезда, что явилось основным критерием для ДНК-генотипирования на предмет наличия герминальных мутаций в генах *MLH1* и *MSH2*. Для всех молекулярно-верифицированных случаев СЛ выполнена MSI-диагностика на доступных для исследования образцах биологического материала.

Рекомендации Бетезда, разработанные для селективного отбора пациентов для последующей оценки статуса микросателлитной нестабильности в образце опухоли и при наличии высокого показателя — поиска герминальных мутаций в генах системы MMR, являются, безусловно, более чувствительными относительно амстердамских критериев отбора (65 % vs 50 % [16, 22]), однако значительно уступают последним по специфичности. Низкие значения точности для всех клинических критериев показаны и в нашем исследовании. Обладая достаточно высоким показателем специфичности (90 %), критерии Амстердам I показали ложноотрицательный результат у 41 % пациентов с СЛ, критерии Амстердам II — у 31 %.

На современном этапе, безусловно, применение только клинко-анамнестических данных больных РТК при определении показаний для ДНК-генотипирования в качестве инициального теста является оправданным только в случае отсутствия биологического опухолевого материала для проведения MSI-тестирования. Другой возможной причиной для отказа от скринингового исследования является высокий риск ложноотрицательного результата в связи с недостаточными качественно количественными характеристиками опухолевой ткани. С открытием молекулярной природы СЛ, микросателлитной нестабильности, как главного следствия, отражающего нарушения в системе репарации неправильно спаренных оснований, клинические критерии в качестве скринингового этапа при СЛ были практически полностью вытеснены исследованиями, основанными на изучении опухолеассоциированных маркеров. Являясь экономически оправданным, менее трудоемким, стандартизованным, доступным и, самое

главное, высокоточным диагностическим показателем, MSI-тестирование согласно большинству международных рекомендаций (NCCN, ASCO, ASMG и др.) выполняется всем пациентам с РТК в целях исключения СЛ [8–10]. Отсутствие назначения данного исследования может быть оправдано лишь для больных колоректальным раком возрастной категории старше 70 лет при наличии несоответствия пересмотренным рекомендациям Бетезда [8].

В нашей работе высокий уровень микросателлитной нестабильности (MSI-High) выявлен во всех исследованных образцах опухолевой ткани больных с СЛ с доступными для MSI-тестирования образцами биологического материала, в том числе у пациентов с «негативным» семейным анамнезом и при манифестации СЛ в возрасте старше 50 лет. Показана полная конкордантность между MSI-тестированием и определением экспрессионного профиля белков MMR-системы с помощью ИГХ-метода. Аналогичный высокий показатель совпадения результатов 2 указанных методов доказан и в других международных исследованиях (97,5 % и 98,3 % по данным исследований A.L. Schwark и соавт. и L. Moreira и соавт. [14, 33]).

В представленном исследовании в диагностическую панель для определения статуса микросателлитной нестабильности включены 5 высокоинформативных, специфичных и патогномоничных однонуклеотидных маркеров для диагностики нарушений в системе репарации неправильно спаренных оснований: BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27. Изучение менее точных маркеров, в том числе динуклеотидных повторов, бесспорно, повышает вероятность диагностики микросателлитной нестабильности, однако снижает диагностическую точность в отношении СЛ. В связи с тем, что геномная нестабильность может быть ассоциирована с нарушениями в функционировании и в других репаративных системах, необходимо точно различать диагностические цели при назначении MSI-тестирования: исключение СЛ, определение стратегии адъювантного лечения у больных локализованным РТК или определение показаний для иммунотерапии у пациентов с диссеминированным РТК, для которых расширение диагностической панели маркеров является диагностически оправданным. У 6 больных с СЛ в нашем исследовании нестабильный MMR-фенотип определен в образцах опухолей других линч-ассоциированных локализаций (рак яичников, рак тела матки, рак мочевого пузыря, рак тонкой кишки), что подтверждает общность патогенетических путей развития ЗНО эпителиальной природы в составе СЛ. При этом маркеры, обладающие высокой специфичностью и успешно детектирующие MSI-High в опухолях толстой кишки, демонстрируют диагностическую эффективность и в опухолях других линч-ассоциированных локализаций.

Заключение

Амстердамские критерии наряду с рекомендациями Бетезда эволюционно уступили свое место современным скрининговым подходам, основанным на определении биологических маркеров в опухоли, и закономерно могут рассматриваться как исторический этап в диагностике СЛ. Расширение знаний о данной синдромальной патологии, в том числе о спектре опухолевой патологии, возрастных и интервальных границах реализации патологического генотипа у больных с герминальными мутациями в генах MMR-системы, не позволяет ни одному клиническому критерию выступать независимым предиктивным маркером при СЛ. Внедрение технологий

NGS, с высокой специфичностью выявляющих нестабильность микросателлитных локусов, позволит повысить эффективность диагностики данных нарушений у больных с различными нозологическими формами онкологических заболеваний, так как маркерный ряд нестабильных повторов варьирует в достаточно широких диапазонах между различными опухолями. В связи с высокой стоимостью (на сегодняшний день) эти технологии в нашей стране не внедрены в клиническую практику, оставаясь нишей для клинических исследований и оставляя за ПЦР-тестированием MSI с применением стандартных панелей и ИГХ-диагностическим методом ведущее место в скрининге СЛ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Nagy R., Sweet K., Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene* 2004;23(38):6445–70. DOI: 10.1038/sj.onc.1207714.
2. Giardiello F.M., Allen J.I., Axilbund J.E. et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2014;147(2):502–26. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.04.001.
3. Lynch H.T., de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348(10):919–32. DOI: 10.1056/NEJMra012242.
4. Hampel H., Frankel W.L., Martin E. et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005;352(18):1851–60. DOI: 10.1200/JCO.2008.17.5950.
5. Barnettson R.A., Tenesa A., Farrington S.M. et al. Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer. *N Engl J Med* 2006;354(26):2751–63. DOI: 10.1056/NEJMoa053493.
6. Engel C., Loeffler M., Steinke V. et al. Risks of less common cancers in proven mutation carriers with lynch syndrome. *J Clin Oncol* 2012;30(35):4409–15. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.2278.
7. Hitchins M.P., Ward R.L. Constitutional (germline) MLH1 epimutation as an aetiological mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 2009;46(12):793–802. DOI: 10.1136/jmg.2009.068122.
8. American Society of clinical oncology. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes Endorsement of the Familial Risk—Colorectal Cancer ESMO Guideline Available at: www.asco.org/endorsements/HereditaryCRC.
9. National Comprehensive Cancer Network. Available at: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_colon.pdf.
10. American College of Medical Genetics and Genomics. Available at: <https://www.acmg.net/>.
11. Kohlmann W., Gruber S.B. Lynch syndrome. *Gene Reviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource*. University of Washington, Seattle 1993–2014. Available at: <http://www.genetests.org>.
12. Jaspersen K.W., Tuohy T.M., Neklason D.W. et al. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 2010;138(6):2044–58. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.01.054.
13. Kastrinos F., Stoffel E.M. History, Genetics, and strategies for cancer prevention in Lynch syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12(5):715–27. DOI: 10.1016/j.cgh.2013.06.031.
14. Schwark A.L., Srinivasan P., Kemel Y. et al. Pan-cancer microsatellite instability to predict for presence of Lynch syndrome. *J Clin Oncol* 36(18 suppl):LBA1509.
15. Vasen H.F., Mecklin J.P., Watson P. et al. Surveillance in hereditary non-polyposis colorectal cancer: an international cooperative study of 165 families. The International Collaborative Group on HNPCC. *Dis Colon Rectum* 1993;36:1–4. DOI: 10.1007/BF02050292.
16. Vasen H.F., Watson P., Mecklin J.P., Lynch H.T. New clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116:1453–6. DOI: 10.1016/S0016-5085(99)70510-X.
17. Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R. et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248–57.
18. Umar A., Boland C.R., Terdiman J.P. et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:261–8. DOI: 10.1093/jnci/djh281.
19. Hampel H., Frankel W.L., Martin E. et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(35):5783–8. DOI: 10.1200/JCO.2008.17.5950.
20. Vasen H.F. Clinical diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes. *J Clin Oncol* 2000;18(21 Suppl):81S–92S.
21. Raedle J., Trojan A., Brieger J. et al. Bethesda guidelines: relation to microsatellite instability and MLH1 promoter methylation in patients with colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2001;135(8 Pt 1):566–76. DOI: 10.7326/0003-4819-135-8_part_1-200110160-00007.
22. Piñol V., Castells A., Andreu M. et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *JAMA* 2005;293(16):1986–94. DOI: 10.1001/jama.293.16.1986.
23. Chen S., Wang W., Lee S. et al. Prediction of germline mutations and cancer risk in the Lynch syndrome. *JAMA* 2006;296:1479–87. DOI: 10.1001/jama.296.12.1479.
24. Kastrinos F., Steyerberg E.W., Balmana J. et al. Comparison of the clinical prediction model PREMM1,2,6 and molecular testing for the systematic identification of Lynch syndrome in colorectal cancer. *Gut* 2013;62:272–9. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301265.

25. Kastrinos F., Steyerberg E.W., Mercado R. et al. The PREMM1,2,6 model predicts risk of MLH1, MSH2, and MSH6 germline mutations based on cancer history. *Gastroenterology* 2011;140:73–81. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.08.021.
26. Green R.C., Parfrey P.S., Woods M.O., Younghusband H.B. Prediction of Lynch syndrome in consecutive patients with colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:331–40. DOI: 10.1093/jnci/djn499.
27. Cohen S.A., Pritchard C.C., Jarvik G.P. Lynch syndrome: from screening to diagnosis to treatment in the era of modern molecular oncology. *Annu Rev Genom Hum Genet* 2019;20:293–307. DOI: 10.1146/annurev-genom-083118-015406.
28. Tiwari A.K., Roy H.K., Lynch H.T. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. *QJM* 2016;109(3):151–8. DOI: 10.1093/qjmed/hcv137.
29. Pearlman R., Markow M., Knight D. et al. Two-stain immunohistochemical screening for Lynch syndrome in colorectal cancer may fail to detect mismatch repair deficiency. *Mod Pathol* 2018;31:1891–900. DOI: 10.1038/s41379-018-0058-y.
30. Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med* 2009;11:35–41. DOI: 10.1097/GIM.0b013e31818fa2ff.
31. National Comprehensive Cancer Network. Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls.
32. Salipante S.J., Scroggins S.M., Hampel H.L. et al. Microsatellite instability detection by next generation sequencing. *Clin Chem* 2014;60(9):1192–9.
33. Moreira L., Balaguer F., Lindor N. et al. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA* 2012;308(15):1555–65.

Вклад авторов

А.В. Семьянихина: получение данных для анализа, анализ полученных данных (включая статистический), обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

Н.И. Поспехова, Д.А. Головина: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

М.Г. Филиппова: получение данных для анализа;

А.О. Расулов, Л.Н. Любченко: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных.

Authors' contributions

A.V. Semyanikhina: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data (including statistical), reviewing of publications of the article's theme, article writing;

N.I. Pospekhova, D.A. Golovina: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

M.G. Filippova: obtaining data for analysis;

A.O. Rasulov, L.N. Lyubchenko: developing the research design, analysis of the obtained data.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.В. Семьянихина/A.V. Semyanikhina: <https://orcid.org/0000-0001-8783-8874>

Н.И. Поспехова/N.I. Pospekhova: <https://orcid.org/0000-0001-5255-5065>

М.Г. Филиппова/M.G. Filippova: <https://orcid.org/0000-0001-9654-822X>

А.О. Расулов/A.O. Rasulov: <https://orcid.org/0000-0002-5565-615X>

Л.Н. Любченко/L.N. Lyubchenko: <https://orcid.org/0000-0003-4775-3299>

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: 23.10.2019. **Принята к публикации:** 28.10.2019.

Article submitted: 23.10.2019. **Accepted for publication:** 28.10.2019.

Резистентные к вемурафенибу клетки меланомы приобретают свойства мезенхимальных стволовых клеток

А. А. Вартамян¹, О. С. Бурова¹, Х. С. Вишнякова², И. В. Самойленко¹,
В. А. Мисюрин¹, Е. Е. Егоров², О. О. Рябая¹, М. А. Барышникова¹

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

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН»; Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

Контакты: Амалия Арташевна Вартамян zhivotov57@mail.ru

Введение. Мутация в онкогене *BRAF* приводит к конститутивной активации *BRAF*-киназы и обеспечивает независимость пролиферации клеток меланомы от присутствия лиганда. Ингибиторы *BRAF*-киназы заметно увеличивают общую выживаемость больных метастатической меланомой, однако у половины больных через 6–8 мес приема препарата наступает резистентность. **Цель исследования** — получение культуры клеток меланомы из опухолей больных, которые перестали отвечать на терапию вемурафенибом, а также изучение механизмов, вовлеченных в возникновение этой резистентности.

Материалы и методы. Были использованы двухмерное культивирование опухолевых клеток, включая получение культуры клеток из опухолевого материала больных, иммуноцитохимический анализ, иммунофлуоресцентный анализ, полимеразная цепная реакция в реальном времени, модели дифференцировки клеток.

Результаты. Из опухолевого материала больных меланомой кожи с мутацией *BRAF*^{V600E}, резистентной к вемурафенибу, были получены 2 клеточные линии меланомы — Mel Ki и Mel F1702. Клетки имели типичную для меланом веретеноподобную форму. Значения *IC*₅₀ для Mel Ki и Mel F1702 составляли 4,7 и 6,3 мкМ вемурафениба соответственно. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов практически отсутствовала в обеих линиях клеток. Иммунофенотипический профиль клеток выявил высокую экспрессию маркеров мезенхимальных стволовых клеток, таких как CD90, CD105 и CD44. Обе клеточные линии меланомы обладали способностью дифференцироваться *in vitro* в остеобластоподобные и адипоцитоподобные клетки.

Заключение. Полученные результаты указывают на фенотипическую транзицию резистентных к вемурафенибу клеток меланомы в мезенхимальноподобные стволовые клетки.

Ключевые слова: меланома, *BRAF*^{V600E}, вемурафениб, резистентность, мезенхимальная стволовая клетка

Для цитирования: Вартамян А. А., Бурова О. С., Вишнякова Х. С. и др. Резистентные к вемурафенибу клетки меланомы приобретают свойства мезенхимальных стволовых клеток. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(4):47–57.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-47-57

Vemurafenib resistant melanoma cells acquire mesenchymal stem cell-like properties

A. A. Vartanian¹, O. S. Burova¹, Kh. S. Vishnyakova², I. V. Samoylenko¹,
V. A. Misyurin¹, E. E. Egorov², O. O. Ryabaya¹, M. A. Baryshnikova¹

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

²V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 32 Vavilova St., Moscow 119991, Russia

Background. Activating mutations in the *BRAF* gene leads to a constitutive activation of the MAPK signaling. The highly selective *BRAF*^{V600E} inhibitor, vemurafenib, improves the overall survival of *BRAF*-mutant melanoma patients. However, despite the excellent results of response rate, the average duration of the response was short and acquired resistance develops in most *BRAF* mutated melanoma patients within a few months.

Objective: to derive melanoma cell lines from surgical species of patients with *BRAF* mutant melanomas resistant to vemurafenib and to elucidate the mechanisms involved in acquired drug resistance.

Materials and methods. Mel Ki and Mel F1702 melanoma cells were obtained from metastases of disseminated melanoma patients with *BRAF*^{V600E} mutation. 2D tumor cell culture, MTT test, immunocytochemistry, flow cytometry, real-time polymerase chain reaction and osteogenic and adipocytic differentiation were used in the study.

Results. We have derived two melanoma cell lines Mel Ki and Mel F1702 from tumor samples of patients with *BRAF*^{V600E} mutation resistant to vemurafenib. These cells were homogenous and had fibroblastic morphology. The *IC*₅₀ values for Mel Ki and Mel F1702 were 4.7 and 6.3 μM, respectively. The expression of cancer-testis antigens was not detected in both types of cells suggesting the stemness of Mel Ki and Mel F1702 melanoma cells. The immunophenotypic profile of the vemurafenib resistant melanoma cells showed the expression of typical mesenchymal stem cells markers such as CD90, CD105 and CD44. In addition, we found that the melanoma cell lines derived from tumor resistant to vemurafenib differentiated into osteoblast- and adipocyte-like cells.

Conclusion. In this study we are offering an experimental evidence of the phenotypic transition of the vemurafenib-resistant melanoma cells into mesenchymal stem-like cells.

Key words: melanoma, BRAF^{V600E}, vemurafenib, resistance, mesenchymal stem cell

For citation: Vartanian A. A., Burova O. S., Vishnyakova Kh. S. et al. Vemurafenib resistant melanoma cells acquire mesenchymal stem cell-like properties. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(4):47–57. (In Russ.).

Введение

Меланома, симптомы которой проявляются у пациентов в любом возрасте, — чрезвычайно злокачественное новообразование. Это уникальная опухоль, поскольку ее можно легко обнаружить на поверхности кожи (визуально), при этом весьма коварная. Поддающаяся лечению в горизонтальной фазе роста, меланома становится резистентной к противоопухолевой терапии в вертикальной фазе роста [1]. Так, 5-летняя выживаемость отмечается в 97,9% случаев, если размер опухоли <0,76 см, и снижается до 57,5% при размере опухоли >3 см [2]. Эффективность лечения метастазирующей меланомы даже в ведущих клиниках мира крайне низка. Классические подходы, такие как химиотерапия и радиотерапия, в случае меланомы дают менее выраженные эффекты, чем при других опухолях. Агрессивное распространение заболевания на ранних стадиях и резистентность меланомы к обычным методам лечения объясняют высокие показатели летальности при меланоме.

За последние 50 лет эффективность лечения диссеминированной меланомы практически не изменилась. Ситуация несколько улучшилась после обнаружения у части больных мутаций в киназе BRAF. Было показано, что некоторые из этих мутаций выполняют онкогенную функцию и приводят к конститутивной активации сигнального пути митогенактивируемой протеинкиназы (MAPK) [3]. У больных меланомами, которые несут мутацию BRAF^{V600E}, прогноз менее благоприятный по сравнению с больными с BRAF дикого типа [4]. Несмотря на то что селективные ингибиторы мутантной киназы увеличивают безрецидивную и общую выживаемость больных меланомой с BRAF-мутацией, у половины больных через 6–8 мес лечения развивается резистентность [5].

Для прохождения всех этапов метастазирования опухолевая клетка должна приобрести ряд свойств, обеспечивающих высокий инвазивный потенциал. В качестве одного из возможных механизмов его приобретения в последние годы активно изучается эпителиально — мезенхимальный переход (ЭМП). Под этим термином подразумевают обратимый процесс приобретения эпителиальными клетками ряда морфологических признаков и функциональных свойств мезенхимальных клеток [6]. ЭМП необходим опухолевым клеткам для успешного отделения от первичного узла, инвазии в окружающие ткани или переноса в другие органы. ЭМП считается одним из ранних процессов, ведущих к диссеминации

опухоли [7]. Помимо облегчения процессов метастазирования программа ЭМП играет важную роль и в возникновении лекарственной резистентности и рецидивов заболевания [8].

Цель исследования — получение культуры клеток меланомы из опухолевого материала больных меланомой, резистентной к вемурафенибу, и изучение механизмов приобретенной резистентности.

Материалы и методы

Реактивы. Первичные анти-CD20, анти-CD24, анти-CD44, анти-CD54, анти-CD90, анти-CD105, анти-CD114, моноклональные антитела анти-CD117 и анти-CD133 были получены от Miltenyi Biotec (Тетероу, Германия). Антитела анти-CD63 и анти-CD271 были приобретены у Serotec AbD (Палег, США), анти-HLA-DR, анти-HLA-ABC, анти-CD31, анти-CD34, анти-CD45 антитела получены от Chemicon International, Inc (Темекула, США). Моноклональные антитела анти-Melan-A приобретены у Cell Margue (США), коллагеназа — у Sigma Aldrich (Ирвин, Великобритания). Dispase и Alexa Fluor 488-конъюгированные вторичные антитела получены от GIBCO/Invitrogen Life Technologies (Карлсбад, США), моноклональные антитела против Е-кадгерина (clone NCH-38), N-кадгерина (clone 6G11) и виментина (clone V9) — от DAKO A/S (Глоструп, Дания).

Дексаметазон, 3-изобутил-1-метил-ксантин и Sudan 4 приобретены у Sigma-Aldrich (Ирвин, Великобритания), β-глицерофосфат — у Calbiochem-Merck (Германия) и L-аскорбиновая кислота 2-фосфат — у Wako Chemicals GmbH (Германия).

Исходный материал. Из опухолевого материала больных метастатической меланомой с мутацией BRAF^{V600E}, резистентной к вемурафенибу, выведены 2 клеточные линии меланомы — Mel Ki и Mel F1702.

У больной 1, 55 лет, с метастатической злокачественной меланомой кожи живота с синхронными метастазами в лимфатические узлы левого пахового отдела выявлена мутация BRAF^{V600E}. Терапию ингибитором BRAF-киназы начали с дозы 960 мг вемурафениба и 2 мг траметиниба. Данные компьютерной томографии подтвердили частичный ответ на лечение через 8 нед. Из-за очень плохой переносимости доза вемурафениба была снижена до 720 мг, затем — до 480 мг. Этот режим был продолжен в течение 4 мес, прежде чем был остановлен из-за прогрессирования заболевания. Клетки меланомы были получены из метастазов кожи.

У больной 2, 71 года, с метастатической злокачественной меланомой правой стопы с множественными внутрикожными (транзиторными) метастазами выявлена мутация BRAF^{V600E}. Терапия вемурафенибом начата с дозы 960 мг, траметинибом — 2 мг. В течение 4 нед после начала приема вемурафениба наблюдалось значительное уменьшение кожных поражений. Полная доза вемурафениба плохо переносилась, вызывая токсичность, поэтому была снижена до 720 мг. Токсичность продолжалась, и прием вемурафениба был остановлен на 2 нед. Через 2 нед больная продолжила лечение вемурафенибом в дозе 480 мг в течение 4 мес. Лечение прекратили из-за кожной токсичности и снижения массы тела. Данные компьютерной томографии не выявили ответа.

Полученные образцы меланомы промывали и измельчали в фосфатно-солевом буфере (PBS) до размера 2–4 мм. Диссоциацию опухолевых клеток проводили ферментативной обработкой 0,1% коллагеназой и диспазой 50 Ед/мл. Далее клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 5 мМ глутамин и гентамицина. Клетки высевали в культуральные флаконы 25 см² и растили при температуре 37 °С в присутствии 5% CO₂.

Иммуноцитохимия. Клетки выращивали на стекле до 70–80% монослоя. Далее клетки промывали PBS и фиксировали в ледяном ацетоне 10 мин. Неспецифическая абсорбция антител была минимизирована путем блокирования 1% BSA в PBS в течение 10 мин. Затем клетки инкубировали с первичными антителами в течение 45 мин и промывали PBS 3 раза по 5 мин. Для визуализации реакции антиген — антитело использовали соответствующие Alexa Fluor 488-конъюгированные вторичные антитела. Ядра клеток окрашивали гематоксилином. Флуоресценцию определяли на флуоресцентном микроскопе IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США).

Анализ экспрессии антигенов клеточной поверхности методом проточной цитофлуориметрии. Фенотипирование антигенов клеточной поверхности проводили в реакции прямой иммунофлуоресценции. Трехжды промывали 1×10^5 клеток PBS (pH 7,5) и ресуспендировали в PBS. В каждую пробирку добавляли моноклональные антитела, меченные FITC или PE, и инкубировали 30 мин при температуре 4 °С. Клетки дважды отмывали от не связавшихся антител и ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащем 1% формалин. Экспрессию антигенов CD20, CD24, CD31, CD34, CD44, CD45, CD54, CD63, CD90, CD105 и CD117 на клеточной поверхности оценивали на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (Becton Dickinson, США). В каждой пробе анализировали до 10 тыс. событий. Анализируемый гейт устанавливали на основании комбинации прямого и бокового рассеивания.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени. Тотальную РНК выделяли из клеток Mel Ki и Mel F1702 с использованием набора RNeasy (Qiagen) в соответствии с инструкцией производителя. Обратную транскрипцию осуществляли с использованием набора для полимеразной цепной реакции GeneAmp RNA (Applied Biosystems, США). Количественную оценку матричных РНК раковотестикулярных антигенов (РТА) проводили с помощью системы детектирования последовательностей ABI PRISM 310 (Perkin Elmer, США) комплементарной ДНК. Ген-специфические олигонуклеотидные праймеры и зонды для РТА человека, а также эндогенная контрольная РНК ABL были получены от Eurogene (Москва, Россия). Детали праймеров приведены в табл. 1. Реакционная смесь содержала 25 мкл TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, США) и 2,5 мкл специфического праймера в конечном объеме 50 мкл. Условия реакции: 60 мин при 45 °С, 10 мин при 70 °С, 5 мин при 4 °С, 10 мин при 95 °С, 40 циклов в течение 15 с при 95 °С, 1 мин при 60 °С и инкубация 5 мин при 25 °С.

Таблица 1. Праймеры, использованные для определения раковотестикулярных антигенов

Table 1. Primers used for identification of cancer/testis antigens

Ген Gene	Праймеры и зонды (прямой праймер, обратный праймер, зонд) Primers and probes (forward primer; reverse primer; probe)
<i>GAGE</i>	5'-AGCTGCTCAGGAGGGAGAGGAT-3' 5'-GGTGACCCTGTTCTGGCTA-3' 5'-(R6G)-CATCTGCAGGTCAAGGGCCGAAGCCTGAA-(BHQ1)-3'
<i>HAGE</i>	5'-GCCACAAGTGCCATGTCAAA-3' 5'-CCTTCAAGTCATCCACGTT-3' 5'-(R6G)-AGCAGATAGTTGGAGGAAAGAAATTTTAA-(BHQ1)-3'
<i>MAGEA1</i>	5'-GAAGGAACCTGACCCAGGCT-3' 5'-AATCCTGTCCTCTGGGTTGG-3' 5'-(R6G)-TGTGAGGAGGCAAGGTTTTTCAGGGGAC-(BHQ1)-3'
<i>NY-ESO-1</i>	5'-TCTGAAGGAGTTCACTGTGT-3' 5'-AGACAGGAGCTGATGGAGAG-3' 5'-(R6G)-AACATACTGACTATCCGACTGACTGCTGCA-(BHQ1)-3'

Окончание табл. 1

End of table 1

Ген Gene	Праймеры и зонды (прямой праймер, обратный праймер, зонд) Primers and probes (forward primer; reverse primer; probe)
<i>PASD1</i>	5'-GTGGGAAATGTTTGCATTCT-3' 5'-AGCTTCATCACTGACTGCCT-3' 5'-(R6G)-TCAGCTCCTGCAGCAACTTTACACTTC-(BHQ1)-3'
<i>SCP1</i>	5'-AAAAGGAACAGAACAAGAAC-3' 5'-TGTGGTAATGGCAGTTAACT-3' 5'-(R6G)-CCAAGCCAGAGAGAAAGAAGTACATGATTT-(BHQ1)-3'
<i>SEMG1</i>	5'-TCCTCATCTTGGAGAAGCAA-3' 5'-TGGGAAAATTCACCTTGGTAA-3' 5'-(R6G)-ATGGGACAAAAAGGTGGATCAAAAGGCC-(BHQ1)-3'
<i>SLLP1</i>	5'-ACTTCGGGCTGGACGGATAC-3' 5'-GCGTTGAAACCGCTTGTGAA-3' 5'-(R6G)-ATACAGCCTGGCTGACTGGGTCTGCCTTGCTTA-(BHQ1)-3'
<i>SPANX1</i>	5'-GAGGAGCGTCCCCTGTGATT-3' 5'-AGCAGGTTGCGGGTCTGAGT-3' 5'-(R6G)-AGGCCAACGAGATGATGCCGGAGACCCCAA-(BHQ1)-3'
<i>SSX1</i>	5'-GTATATGAAGAGAACTATAAGG-3' 5'-TATTACACATGAAAGGTGGG-3' 5'-(R6G)-ATGACTAACTAGGTTTCAAAGTCACC-(BHQ1)-3'
<i>PRAME</i>	5'-TCTTCCTACATTTCCCCGGA-3' 5'-GCACTGCAGACTGAGGAACTGA-3' 5'-(FAM)-AAGGAAGAGCAGTATATCGCCCAGTTCACC-(TAMRA)-3'

В качестве положительных контролей использовали клетки Mel P и Mel II, выведенные в клеточную линию из меланом с мутацией BRAF, не леченных вемурафенибом [9]. Происхождение и источники этих клеточных линий были описаны ранее [10].

Остеогенная дифференцировка клеток. Клетки высеивали при плотности 10 000/см² в среде для индукции остеодифференцировки, содержащей DMEM с 10% FBS, 10 мМ β-глицерофосфата, 50 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты 2-фосфата и 10 нМ дексаметазона. Среду меняли каждые 3 дня. Отложение кальция на 28-й день дифференцировки было идентифицировано окрашиванием ализариновым красным (AR-S). Остеобласты фиксировали 70% ледяным этанолом в течение 1 ч при температуре –20 °С перед добавлением AR-S, растворенного в дистиллированной воде (pH 4,2). Клетки окрашивали в течение 10 мин при комнатной температуре. Морфологию клеток оценивали с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Diaphot (Nikon, Япония).

Адипогенная дифференцировка. Адипогенную дифференцировку проводили на клетках, высеванных с плотностью 10 000/см². Когда клетки достигали 75–80% конfluence, среду заменяли средой для индукции дифференцировки, которую меняли каждые 3 дня. Культуральная среда для адипогенной дифференцировки содержала: 10 мкг/мл инсулина,

1 мкМ дексаметазона и 100 мкг/мл 3-изобутил-1-метил-ксантина в DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Через 21 день клетки фиксировали 4% формальдегидом и окрашивали насыщенным раствором красителя Sudan 4. Морфологию клеток оценивали с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Diaphot (Nikon, Япония).

Заявление об этике. Исследования проводили после утверждения этическим комитетом НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (CA184-089) с письменного согласия пациентов. Протоколы по получению клеток меланомы Mel Ki и Mel F1702 были одобрены этическим комитетом.

Статистический анализ. Все эксперименты выполняли 3 раза независимо друг от друга. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Все статистические анализы проведены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, США).

Результаты

Получение клеточных линий меланомы Mel Ki и Mel F1702. Первичные клеточные культуры, полученные из мутантных меланом, устойчивых к вемурафенибу и растущих в среде, были гомогенными и имели веретеноподобную форму. Клетки росли медленно, со

значительной задержкой во времени удвоения популяции, и оставались стабильными до 8–9 дней без смены среды.

Статус меланомы был подтвержден экспрессией меланоцит-ассоциированных антигенов, — CD63 и Melan-A/MART-1. На обеих клеточных линиях, Mel Ki и Mel F1702, наблюдалась низкая экспрессия CD63 (18 ± 2 и $16 \pm 2\%$ соответственно) (рис. 1, см. табл. 3). Иммуноцитохимический анализ выявил незначительную экспрессию также меланоцит-ассоциированного антигена — Melan-A/MART-1 (см. рис. 1). При этом экспрессия Melan-A не претерпевала значительных изменений с 5-го по 18-й пассажи (данные не представлены). Обе клеточные линии меланомы были отрицательными по тирозиназе (данные не представлены). Низкая экспрессия обоих антигенов хорошо согласуется с данными литературы: по мере прогрессии в фазу более агрессивного роста клетки меланомы сбрасывают тканеспецифические антигены [1].

Цитотоксичность действия вемурафениба в клеточных линиях меланомы, устойчивых к этому препарату, была рассчитана на основе кривых доза — эффект в МТТ-тестах (IC_{50} через 48 ч). Значения IC_{50} для Mel Ki и Mel F1702 составили 4,7 и 6,3 мкМ соответственно. Согласно данным литературы значение IC_{50} чувствительных к вемурафенибу клеток меланомы с мутацией BRAF^{V600E} варьирует от 20 нМ до 1 мкМ [11]. Таким образом, обе клеточные линии были резистентны к вемурафенибу, что подтверждало клинические данные.

Экспрессия Е- и N-кадгерина в резистентных к вемурафенибу клетках меланомы. Несмотря на то что клетки меланомы происходят не из эпителиальных клеток, а из меланоцитов, в литературе накапливаются сообщения о переключении фенотипа клеток меланомы, сходной с программой ЭМП (EMT-like) [12, 13]. Одними из ключевых событий, способствующих переходу меланомы в метастатическую фазу роста, являются потеря клетками Е-кадгерина, участвующей в формировании плотных контактов между клетками, и уси-

ление экспрессии N-кадгерина, запускающей реорганизацию актина и увеличивающей подвижность клетки [7]. Мы предположили, что изменения в экспрессии кадгеринов могли бы внести свой вклад в возникновение резистентности к вемурафенибу. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток Mel Ki на экспрессию Е- и N-кадгеринов выявило, что экспрессия Е-кадгерина в этих клетках сильно подавлена, в то время как экспрессия N-кадгерина значительно повышена (рис. 2а, б), что указывало на мезенхимальный фенотип резистентных клеток. Высокая экспрессия виментина — маркера мезодермальной ткани — подтверждала мезенхимальный характер клеток Mel Ki (рис. 2в).

Контрольные клетки Mel II с мутацией BRAF, полученные из опухолевого материала больной диссеминированной меланомой, не получавшей вемурафениб, также экспрессировали Е- и N-кадгерины. Однако экспрессия Е-кадгерина была в 2 раза выше, а экспрессия N-кадгерина и виментина существенно не менялась по сравнению с экспрессией этих белков клетками Mel Ki (рис. 2г). Полученные результаты позволяют предположить, что лечение вемурафенибом облегчает разрушение плотных межклеточных контактов, но на дальнейшую реорганизацию актина и повышение подвижности клетки существенно не влияет, следовательно, незначительным будет и вклад в приобретение клеткой способности к метастазированию и ассоциированной с метастазированием лекарственной резистентностью.

Экспрессия РТА в вемурафениб-резистентных клетках меланомы. РТА в норме экспрессируются в семенниках, участвуя в блокировании дифференцировки и способствуя созреванию половых клеток. В последние годы появляется все больше работ, указывающих на то, что РТА экспрессируются и в опухолевых клетках [14, 15] и их появление в опухоли коррелирует с резистентностью к терапии и короткой безрецидивной выживаемостью больных [16]. Мы предположили, что следующей мишенью, способной инициировать резистентность клеток Mel Ki к вемурафенибу,

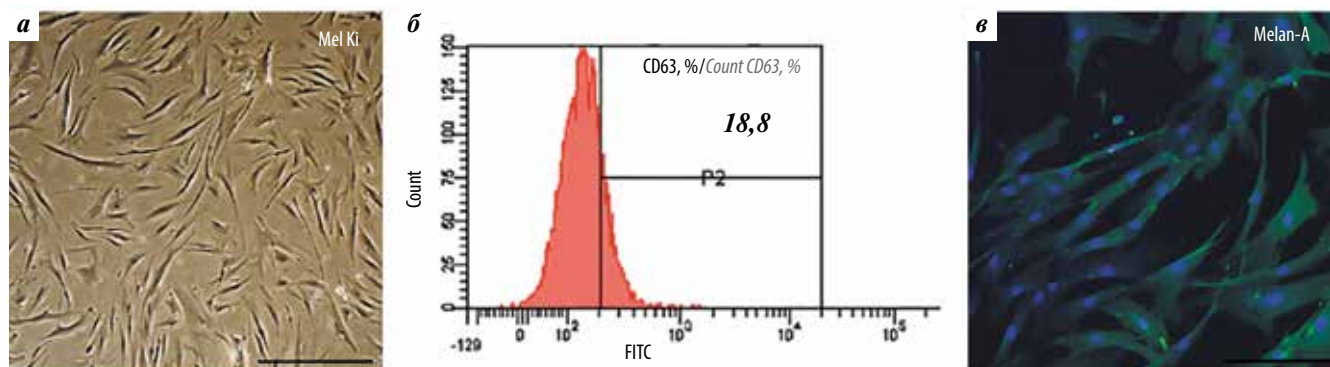


Рис. 1. Подтверждение статуса меланомы: а — клетки Mel Ki, фазово-контрастное изображение; б — экспрессия CD63, определенная проточной цитофлуориметрией; в — флуоресцентное окрашивание клеток Mel Ki на антиген Melan-A (масштаб 200 мкм)

Fig. 1. Confirmation of melanoma status: а — Mel Ki cells, phase-contrast imaging; б — CD63 expression determined by flow cytometry; в — fluorescent staining of Mel Ki cells for Melan-A antigen (scale 200 μm)

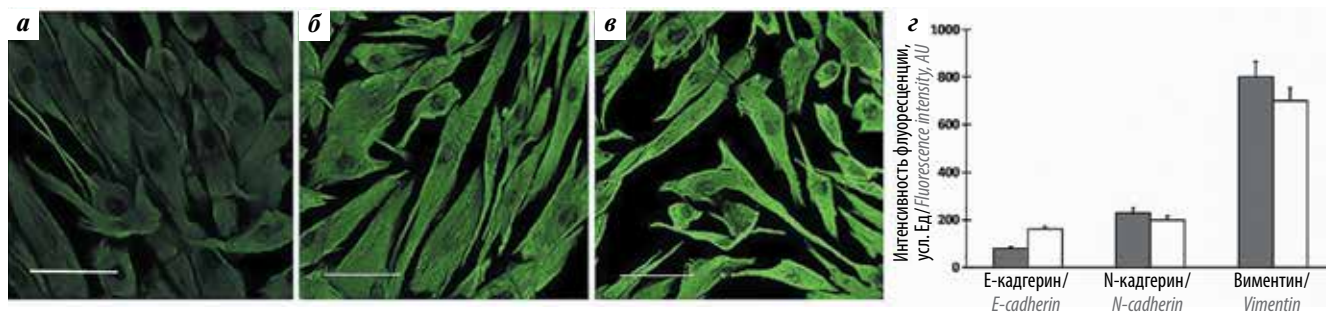


Рис. 2. Экспрессия маркеров эпителиально-мезенхимального перехода. Иммунофлуоресцентное окрашивание на E-, N-кадгерине (а, б) и виментине (в) в клетках Mel Ki (масштаб 200 мкм). Изменение интенсивности флуоресценции маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (з) в контрольных клетках Mel II (белые столбцы) и Mel Ki (черные столбцы)

Fig. 2. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers. Immunofluorescent staining of E-, N-cadherin (a, б) and vimentin (в) in Mel Ki cells (scale 200 μm). Changes in fluorescence intensity of epithelial-mesenchymal transition markers (z) in control Mel II (white columns) and Mel Ki (black columns) cells

могла бы стать экспрессия РТА. Мы выбрали панель из 11 РТА (табл. 2), экспрессирующихся при меланоме [16]. В качестве положительных контролей использовали 2 клеточные линии меланомы: Mel P с мутацией BRAF^{V600E} и Mel II с мутацией BRAF^{V600K}. В табл. 2 обобщены результаты полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией экспрессии РТА в клетках меланомы.

В обоих контролях, полученных из опухолей больной, не леченной вемурафенибом, наблюдалась высокая экспрессия PRAME (4850,20 и 114,87%), одного из основных представителей РТА. Клетки Mel P с мутацией BRAF^{V600E} также были положительными в отношении GAGE, HAGE и SLLP. Наблюдалась высокая экспрессия SLLP, SCP, SPAN и SSX в клетках Mel II с мутацией BRAF^{V600K} и практически нулевая экспрессия всех 11 РТА в клетках Mel Ki. Аналогичная закономерность отмечена и во 2-й клеточной линии, резистентной к вемурафенибу, — Mel F1702.

Иммунофенотипический профиль клеток меланомы Mel Ki и Mel F1702. Чрезвычайно интересным нам представлялось проследить изменения в экспрессии маркеров стволовой клетки меланомы в резистентных

к вемурафенибу клетках меланомы. До недавнего времени предполагалось, что все клетки опухоли обладают одинаковой способностью инициировать опухоль и формировать метастазы. Сегодня достоверно показано, что такими свойствами обладает небольшая популяция особых, самообновляющихся клеток опухоли, называемых стволовыми. Именно эта клеточная популяция опухоли наиболее агрессивна и устойчива практически ко всем видам противоопухолевой терапии. На сегодняшний день обнаружено и охарактеризовано несколько поверхностных маркеров стволовой клетки меланомы: CD20, CD133, CD271 и ABCB5 [17]. Ни клетки Mel Ki, ни клетки Mel F1702 не экспрессировали эти антигены (табл. 3).

Поскольку экспрессия поверхностных антигенов в клетках меланомы с мутацией в BRAF, устойчивых к вемурафенибу, слабо изучена, мы решили проследить и за экспрессией других антигенов. Всего лишь 3,5% клеток Mel Ki экспрессировали CD54, или ICAM-1, участвующем в интегрин-опосредованных коммуникациях клеток [18]. Отсутствие CD24 и низкая экспрессия рецепторов CD117 (см. табл. 3) указывали на высокозлокачественный фенотип клеток Mel Ki

Таблица 2. Профиль экспрессии раковотестикулярных антигенов в клетках меланомы — Mel H1702 и Mel Ki. Уровень экспрессии генов дается как процент по отношению к экспрессии контрольного гена Abl ($p < 0,05$)

Table 2. Expression profile of cancer—testis antigens in Mel H1702 and Mel Ki melanoma cell lines. The expression levels are given in percentage relative to the expression level of the control gene Abl ($p < 0.05$)

Клеточная линия Cell line	GAGE	HAGE	NY-ESO1	MAGE1	PASD	SCP	SEMG	SLLP	SPANX	SSX	PRAME
Mel F1702	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,12
Mel Ki	0,03	0,13	0	0	0	0	0,01	0	0	0,04	0,07
Mel P	2,72	2,92	0	0	0,03	0	0	4,74	0	0,01	4850,29
Mel IL	75,79	0	0	0	0	35,36	0	35,36	4,12	2,06	114,87

Таблица 3. Анализ экспрессии поверхностных антигенов клеток Mel Ki и Mel F1702 методом проточной цитометрии

Table 3. Flow cytometric analysis of Mel Ki and Mel F1702 melanoma cell surface antigens expression

Антиген Antigen	Антиген-позитивные клетки, % Antigen-positive cells, %	
	Mel Ki	Mel F1702
HLA-ABC	90 ± 2	72 ± 2
HLA-DR	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1
CD63	18 ± 2	16 ± 2
CD54	3,5 ± 0,1	1 ± 0,1
CD24	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1
CD44	99 ± 1,0	98 ± 1,0
CD31	0,80 ± 0,05	0,4 ± 0,1
CD34	0,50 ± 0,05	0,60 ± 0,1
CD45	0,30 ± 0,05	0,30 ± 0,05
CD90	99,2 ± 2	97 ± 3
CD105	98 ± 5	60 ± 3
CD20	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,05
CD117	7,5 ± 0,5	11 ± 1,0
CD133	0,20 ± 0,05	0,20 ± 0,05
CD271	0,10 ± 0,05	0,10 ± 0,05
CD114	4,50 ± 0,05	1,00 ± 0,05

и Mel F1702. Совершенно неожиданно FACS-анализ выявил, что более 99% клеток меланомы Mel Ki экспрессируют типичные маркеры мезенхимальной стволовой клетки (МСК): CD90, CD105 и CD44 (рис. 3, см. табл. 1) [19]. Подобно МСК клетки Mel Ki не экспрессировали ни HLA-DR, ни CD45, ни CD31 или CD34 (см. табл. 3). Иммунофенотипический профиль экспрессии поверхностных антигенов на клетках Mel F1702 оказался тот же: маркеры стволовой клетки меланомы не экспрессируются, наблюдается высокая экспрессия маркеров МСК. В целом наши данные демонстрируют уникальный состав антигенов клеточной поверхности, сходный с МСК, на клетках меланомы, полученных из мутантных меланом, устойчивых к вемурафенибу.

Адиогенная и остеогенная дифференцировка клеток Mel Ki. Основываясь на высокой экспрессии молекулярных маркеров МСК на резистентных к вемурафенибу клетках меланомы, мы предположили, что эти клетки, как и МСК, должны дифференцироваться в клетки мезодермальной линии. Гистологическое окрашивание липидов Sudan 4

в культурах адиогенной дифференцировки выявило, что клетки меланомы к 21-му дню накапливают внутриклеточные липидные пузырьки — характеристики адипоцитов (рис. 4).

Остеогенная дифференцировка клеток меланом, резистентных к вемурафенибу, также прошла успешно. Окрашивание AR-S подтвердило наличие соединений кальция (см. рис. 4). Клетки обеих линий формировали типичные костные узелки. По сравнению с дифференцировкой человеческих МСК, адиопо- и остеогенная дифференцировка культур меланом занимала больше времени, и доля дифференцированных клеток была меньше, хотя и несущественно.

Обсуждение

В основе летальности от меланомы лежит высокая изменчивость клеток опухоли. Многообразие генетических и эпигенетических поломок наследственного аппарата клетки, тем не менее, позволило сформулировать несколько подтипов этого заболевания на основе гиперактивации того или иного сигнального пути [1]. После открытия мутаций в кодоне 600 гена *BRAF* начались активные поиски веществ, воздействующих на мутантный белок. Вемурафениб был фактически первым таргетным препаратом, который стали использовать для лечения метастатической, неоперабельной меланомы [20]. Ингибиторы *BRAF*-киназы заметно снижали показатели смертности больных метастатической меланомой, однако у половины пациентов через 6–8 мес приема препарата наступала резистентность. Целью нашей работы было получить культуры клеток меланом из опухолей больных, которые перестали отвечать на терапию вемурафенибом, и исследовать механизмы, вовлеченные в возникновение этой резистентности.

Эпителиально-мезенхимальный переход необходим опухолевым клеткам для успешного отделения от первичного узла, инвазии в окружающие ткани или перехода в другие органы. Помимо облегчения процессов метастазирования программа ЭМП играет важную роль и в возникновении лекарственной резистентности. Несмотря на то что клетки меланомы происходят не из эпителиальных клеток, а из меланоцитов, в литературе накапливаются сообщения, связывающие изменения в экспрессии кадгеринов с метастатическим фенотипом клетки [6, 8]. Результаты иммуноцитохимического окрашивания клеток Mel Ki на экспрессию E- и N-кадгеринов показали крайне низкую экспрессию E-кадгерина и высокую экспрессию N-кадгерина и виментина (см. рис. 2a – в), что ассоциируется с переходом резистентных к вемурафенибу клеток в мезенхимальный фенотип. Клетки меланомы, выжившие после таргетной терапии, должны адаптироваться к ингибированию *BRAF*-киназы, и эта адаптация, по-видимому,

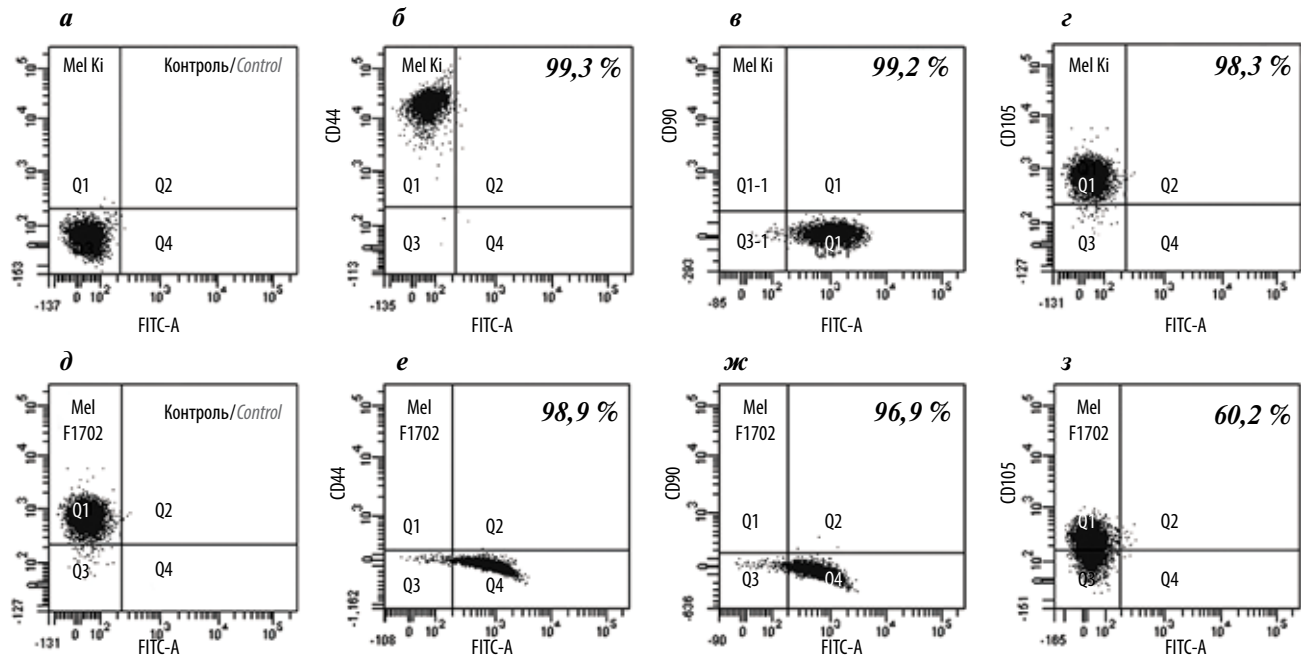


Рис. 3. Иммунофенотипирование клеток меланомы Mel Ki и Mel F1702 проточной цитофлуориметрией: а, д — контрольные клетки Mel Ki и Mel F1702; б—г — окрашивание клеток Mel Ki на CD44, CD90 и CD105; е—з — окрашивание клеток Mel F1702 на CD44, CD90 и CD105

Fig. 3. Immunophenotyping of Mel Ki and Mel F1702 melanoma cells by using flow cytometry: а, д — control, an unstained sample; б—г, е—з — the staining for CD44, CD90 and CD10

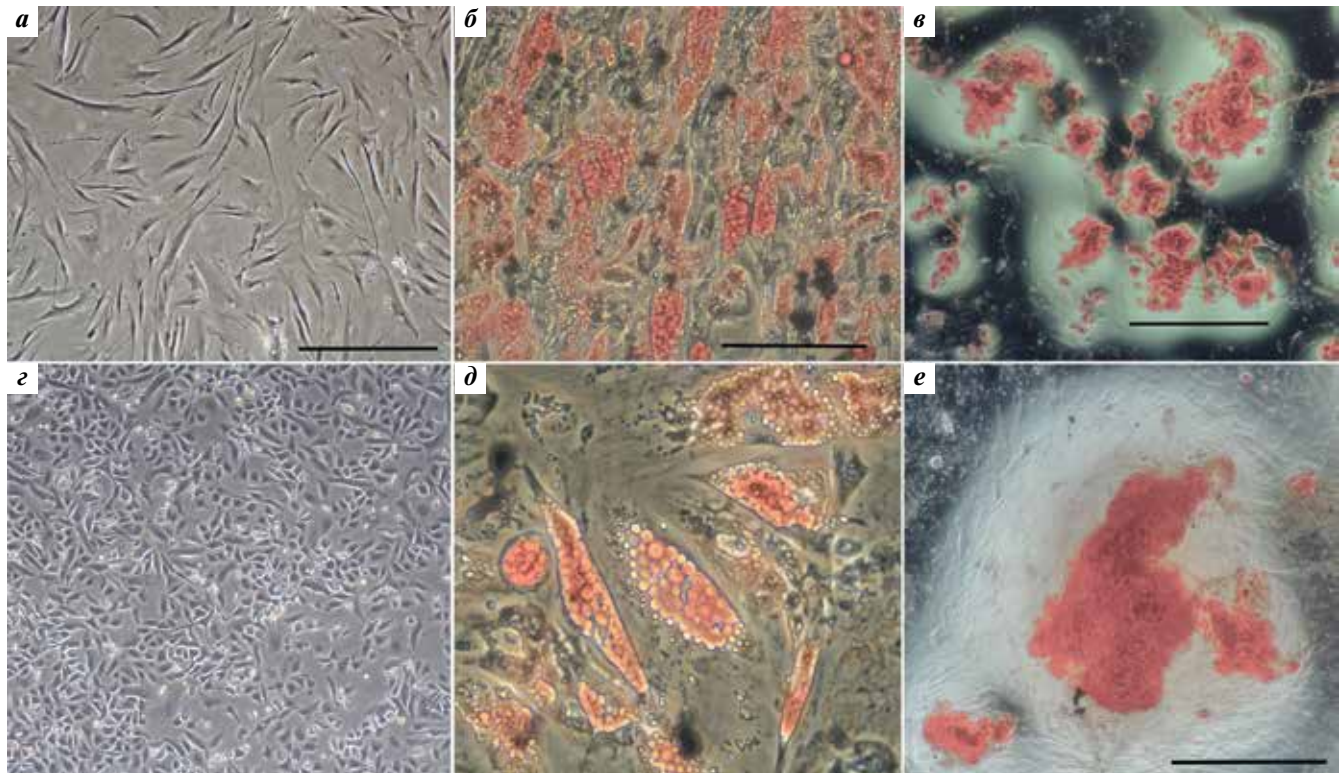


Рис. 4. Дифференцировка вемурафениб-резистентных клеток: а—в — клетки Mel Ki; г—е — клетки Mel F1702; а, г — контрольные клетки (фазово-контрастное изображение); б, д — адипогенная дифференцировка (фазово-контрастное изображение); в, е — остеогенная дифференцировка (темнопольная микроскопия с цифровым контрастированием). Масштаб а, в, г, е — 500 мкм; б, д — 100 мкм

Fig. 4. Differentiation of vemurafenib-resistant cells: а—в — Mel Ki cells; г—е — Mel F1702 cells; а, г — control cells (phase-contrast imaging); б, д — adipogenic differentiation (phase-contrast imaging); в, е — osteogenic differentiation (dark field microscopy with digital contrast). Scale in а, в, г, е — 500 μ m; б, д — 100 μ m

становится возможной благодаря приобретению клетками меланомы некоторых характеристик МСК. Недавно было показано, что передача сигналов RAS/RAF/MEK/ERK способствует экспрессии мезенхимальных белков [21].

Следующей мишенью, способной инициировать резистентность клеток Mel Ki к вемурафенибу, была экспрессия РТА. Недавно было показано, что экспрессия РТА коррелирует с короткой безрецидивной выживаемостью больных метастатической меланомой [16]. В обеих контрольных линиях клеток, полученных из опухолей пациентов, не леченных вемурафенибом, наблюдались высокая экспрессия PRAME и некоторых других РТА и практически нулевая экспрессия всех 11 РТА в клетках Mel Ki (см. табл. 2). Результаты недавних наблюдений продемонстрировали, что снижение экспрессии PRAME подавляло дифференцировку соматических/половых клеток в первичных половых клетках, опухолевых клетках яичка и семиномах [22]. Поэтому мы предположили, что чрезвычайно низкий уровень РТА может поддерживать полипотентность клеток меланомы Mel Ki. Тогда единственно разумным объяснением полученных результатов является допущение, что вемурафениб индуцирует дедифференцировку клеток меланомы до стволовой клетки и резистентность к вемурафенибу появляется, по всей видимости как результат обогащения клеток меланомы стволовыми клетками опухоли. Однако анализ экспрессии маркеров стволовой клетки меланомы выявил, что клетки Mel Ki не экспрессируют ни один из этих маркеров (см. табл. 3). Иммунофенотипический анализ поверхностных антигенов клеток Mel Ki неожиданно обнаружил, что более 99% клеток экспрессировали типичные маркеры МСК: CD90, CD44 и CD105 (см. рис. 3). С началом кровоснабжения опухоль секретирует специфические факторы, способствующие миграции МСК из костного мозга в опухоль [23], где они дифференцируются в клетки соединительной и жировой тканей, а также в перicytes, способствуя формированию стромы опухоли. Для того чтобы подтвердить, что МСК-подобная дедифференцировка резистентных к вемурафенибу клеток меланомы — не уникальное свойство одной клеточной линии, нами была получена 2-я клеточная линия — Mel F1702 — из опухоли другой больной также с мутантной меланомой BRAF^{V600E}, устойчивой к вемурафенибу. FACS-анализ подтвердил ту же тенденцию: нет экспрессии маркеров стволовой клетки меланомы, и более 90% клеток меланомы экспрессируют типичные маркеры МСК (см. табл. 3). В этих клетках также не наблюдалась экспрессия РТА (см. табл. 2). Полученные нами результаты предполагают, что резистентность к вемурафенибу сопровождается приобретением клетками меланомы некоторых характеристик МСК. Эти свойства МСК могут иметь первостепенное значение

для поддержания злокачественной прогрессии меланомы. Недавно маркер МСК CD90 был идентифицирован как маркер прогноза течения болезни для первичных меланом, а экспрессия антигена CD44 была выше в меланомах с идентифицированными метастазами, чем у больных, у которых отсутствовали метастазы [24, 25]. Экспрессию эндоглина (CD105) в меланоме, метастазировавшей в мозг, также связывают с плохим прогнозом [26].

Полипотентность клеток Mel Ki и Mel F1702, полученных из меланом, устойчивых к вемурафенибу, была подтверждена их дифференцировкой в адипоцит- и остеобластоподобные клетки. Дифференцировка в адипоцитоподобные клетки клеток рака молочной железы, полученной из опухоли, резистентной к терапии, была показана С. Garulli и соавт. [27]. Позднее L.F. Pavan и соавт. подтвердили этот феномен на глиобластоме [28]. По-видимому, мы стоим у самых истоков ранее не описанного в онкологии процесса — фенотипической трансформации резистентных к терапии опухолевых клеток в мезенхимальноподобные стволовые клетки.

К сожалению, ожидания от применения таргетных препаратов на основе ингибиторов мутантной BRAF-киназы оправдались не в полной мере в связи с обнаружением резистентности [29]. В большинстве случаев эта резистентность связана с реактивацией сигнального пути MAPK [30, 31]. Около 20% устойчивых к ингибиторам BRAF-киназы меланом демонстрируют усиление ERK-независимого механизма устойчивости [32]. Кроме этого, известно, что меланомы имеют сложные мутационные профили и скрытые параллельные изменения во многих генах [33, 34]. Как эти гены модулируют ответ на ингибиторы BRAF, пока неясно. Полученные нами результаты обосновывают еще один механизм резистентности к вемурафенибу — приобретение резистентными к терапии опухолевыми клетками некоторых характеристик МСК. Существование такого количества потенциальных механизмов резистентности потребует специфических для каждого больного подходов к лечению меланомы.

Заключение

Мы показали, что клетки меланомы, полученные из опухолей больных, прогрессирующих на фоне лечения вемурафенибом, экспрессируют ряд поверхностных маркеров, характерных для МСК, и дифференцируются в адипоцит- или остеобластоподобные клетки. Очевидно, что полученные нами данные потребуют внесения поправок в курсы терапии больных меланомой, имеющих мутацию в гене BRAF, однако для этого необходимо проведение дополнительных исследований.

Открытым остается вопрос, для чего опухолевой клетке с высокзлокачественным фенотипом свойства стволовой клетки.

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

1. Trotter M.J. Melanoma margin assessment. *Clin Lab Med* 2011;31(2): 289–300. DOI: 10.1016/j.cll.2011.03.006.
2. Millet A., Martin A.R., Ronco C. et al. metastatic melanoma: insights into the evolution of the treatments and future challenges. *Med Res Rev* 2017;37(1):98–148. DOI: 10.1002/med.21404.
3. Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949–54. DOI: 10.1038/nature00766.
4. Long G.V., Menzies A.M., Nagrial A.M. et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic braf in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2011;29(10):1239–46. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.4327.
5. Flaherty K.T., Puzanov I., Kim K.B. et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(9):809–19. DOI: 10.1056/NEJMoa1002011.
6. Zhang Y., Weinberg R.A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Front Med* 2018;12(4):361–73. DOI: 10.1007/s11684-018-0656-6.
7. Škovierová H., Okajčeková T., Strnádel J. et al. Molecular regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in tumorigenesis. *Int J Mol Med* 2017;41(3):1187–200. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3320.
8. Yan S., Holderness B.M., Li Z. et al. Epithelial-mesenchymal expression phenotype of primary melanoma and matched metastases and relationship with overall survival. *Anticancer Res* 2016;36(12):6449–56. DOI: 10.21873/anticancer.11243.
9. Ryabaya O.O., Tsyganova I.V., Sidorova T.A. et al. Effect of B-RAFV600 activating gene mutations on the ability of melanoma cells to autophagy. *Soft Tissue Sarcoma and Skin Cancer (Russ)* 2013;3:68–72.
10. Mikhailova I.N., Lukashina M.I., Baryshnikov A.Yu. et al. Melanoma cell lines as the basis for antitumor vaccine preparation. *Vest Ross Akad Med Nauk* 2005;7:37–40.
11. Garbe C., Eigentler T.K. Vemurafenib. *Recent Results Cancer Res* 2018;211:77–89. DOI: 10.1007/978-3-319-91442-8_6.
12. Nakamura M., Tokura Y. Epithelial-mesenchymal transition in the skin. *J Dermatol Sci* 2011;61(1):7–13. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2010.11.015.
13. Li F.Z., Dhillon A.S., Anderson R.L. et al. Phenotype switching in melanoma: implications for progression and therapy. *Front Oncol* 2015;5:31. DOI: 10.3389/fonc.2015.00031.
14. Whitehurst A.W. Cause and consequence of cancer/testis antigen activation in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2014;54:251–72. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140326.
15. Hermes N., Kewitz S., Staeger M.S. Preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) and the PRAME family of leucine-rich repeat proteins. *Curr Cancer Drug Targets* 2016;16(5):400–14. DOI: 10.2174/1568009616666151222151818.
16. Svobodová S., Browning J., MacGregor D. et al. Cancer-testis antigen expression in primary cutaneous melanoma has independent prognostic value comparable to that of Breslow thickness, ulceration and mitotic rate. *Eur J Cancer* 2001;47(3):460–9. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.09.042.
17. Girouard S.D., Murphy G.F. Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Lab Invest* 2011;91(5):647–64. DOI: 10.1038/labinvest.2011.50.
18. Weishaupt C., Munoz K.N., Buzney E. et al. T-cell distribution and adhesion receptor expression in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(9):2549–56. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2450.
19. Lv F.J., Tuan R.S., Cheung K.M. et al. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2014;32(6):1408–19. DOI: 10.1002/stem.1681.
20. Bollag G., Tsai J., Zhang J. et al. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Dis* 2012;11(11):873–86. DOI: 10.1038/nrd3847.
21. Caramel J., Papadogeorgakis E., Hill L. et al. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell* 2013;24(4):466–80. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.08.018.
22. Nettersheim D., Arndt I., Sharma R. et al. The cancer/testis-antigen PRAME supports the pluripotency network and represses somatic and germ cell differentiation programs in seminomas. *Br J Cancer* 2016;115(4):454–64. DOI: 10.1038/bjc.2016.187.
23. Reagan M.R., Kaplan D.L. Concise review: Mesenchymal stem cell tumor-homing: detection methods in disease model systems. *Stem Cell* 2011;29(6):920–7. DOI: 10.1002/stem.645.
24. Sviatoha V., Tani E., Kleina R. et al. Immunohistochemical analysis of the S100A1, S100B, CD44 and Bcl-2 antigens and the rate of cell proliferation assessed by Ki-67 antibody in benign and malignant melanocytic tumours. *Melanoma Res* 2010;20(2):118–25. DOI: 10.1097/CMR.0b013e3283350554.
25. Herrera-Molina R., Valdivia A., Kong M. et al. Thy-1-interacting molecules and cellular signaling in cis and trans. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013;306:163–216. DOI: 10.1016/B978-0-12-407695-2.00004-4.
26. Salgado K.B., Toscani N.V., Silva L.L. et al. Immunoexpression of endoglin in brain metastasis secondary to malignant melanoma: evaluation of angiogenesis and comparison with brain metastasis secondary to breast and lung carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 2007;24(6):403–10. DOI: 10.1007/s10585-007-9077-7.
27. Garulli C., Kalogris C., Pietrella L. et al. Dorsomorphin reverses the mesenchymal phenotype of breast cancer initiating cells by inhibition of bone morphogenetic protein signaling. *Cell Signal* 2014;26(2):352–62. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.11.022.
28. Pavon L.F., Sibov T.T., de Oliveira R.C. et al. Mesenchymal stem cell-like properties of CD133 glioblastoma initiating cells. *Oncotarget* 2016;7(26):40546–57. DOI: 10.18632/oncotarget.9658.
29. Dhillon S. dabrafenib plus trametinib: a review in advanced melanoma with a BRAF (V600) mutation. *Target Oncol* 2016;11(3):417–28. DOI: 10.1007/s11523-016-0443-8.
30. Nazarian R., Shi H., Wang Q. et al. Melanomas acquire resistance to BRAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 2010;4:973–7.
31. Jiang C.C., Lai F., Thorne R.F. et al. MEK-Independent Survival of BRAFV600E Melanoma Cells Selected for Resistance to Apoptosis Induced by the RAF Inhibitor PLX4720. *Clin Cancer Res* 2010;17(4):721–30.
32. Corcoran R.B., Dias-Santagata D., Bergethon K. et al. BRAF gene amplification can promote acquired resistance to MEK inhibitors in cancer cells harboring the BRAF V600E mutation. *Sci Signal* 2010;3(149):ra84. DOI: 10.1126/scisignal.2001148.
33. Nathanson K.L., Martin A.M., Wubbenhorst B. et al. Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436). *Clin Cancer Res* 2013;19(17):4868–78. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0827.
34. Wagle N., Emery C., Berger M.F. et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol* 2011;29(22):3085–96. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.2312.

Вклад авторов

А. А. Вартанян: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи;
О. С. Бурова: получение культуры клеток из опухолевого материала, изучение экспрессии маркеров методом проточной цитометрии;
Х. С. Вишнякова, Е. Е. Егоров: адипогенная и остеогенная *in vitro* дифференцировка;
И. В. Самойленко: получение операционного материала для исследований, верификация диагноза;
В. А. Мисюрин: изучение экспрессии раковотестикулярных антигенов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени;
О. О. Рябая: иммунофлуоресцентная окраска клеток;
М. А. Барышникова: обсуждение результатов, редактирование текста рукописи.

Authors' contributions

A. A. Vartanian: study design, article writing;
O. S. Burova: growth of cell culture from tumor material, flow cytometry study of marker expression;
Kh. S. Vishnyakova, E. E. Egorov: adipogenic and osteogenic *in vitro* differentiation;
I. V. Samoylenko: extraction of surgical material for the study, diagnosis verification;
V. A. Misyurin: real-time polymerase chain reaction study of cancer/testis antigen expression;
O. O. Ryabaya: immunofluorescent cell staining;
M. A. Baryshnikova: results discussion, manuscript editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

А. А. Вартанян/A. A. Vartanian: <https://orcid.org/0000-0001-9342-5523>
О. С. Бурова/O. S. Burova: <https://orcid.org/0000-0001-8897-0172>
В. А. Мисюрин/V. A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0003-1349-2879>
О. О. Рябая/O. O. Ryabaya: <https://orcid.org/0000-0001-6295-3497>
М. А. Барышникова/M. A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-35-00107) и Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (тема № 01201363823).

Financing. The study was supported by the Russian Scientific Foundation (grant No. 14-35-00107) and the Program for Basic Research at State Academies of Sciences in 2013–2020 (topic No. 01201363823).

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: 17.11.2019. **Принята к публикации:** 25.11.2019.

Article submitted: 17.11.2019. **Accepted for publication:** 25.11.2019.

Противоопухолевая активность кураксина CBL0137 на моделях острых лейкозов *in vitro*

Т.И. Фетисов¹, К.И. Кирсанов^{1,2}, А.А. Борунова¹, М.Н. Зацепина³, Е.А. Лесовая^{1,4}, Т.Н. Заботина¹, Г.А. Белицкий¹, М.Г. Якубовская¹

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

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

³ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

⁴ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»; Россия, 390026 Рязань, ул. Высоковольная, 9

Контакты: Тимур Игоревич Фетисов timkatryam@yandex.ru

Введение. Кураксин CBL0137 — новое негенотоксичное соединение, обладающее противоопухолевой активностью, в основе которой лежит способность препарата нековалентно взаимодействовать с ДНК, вызывая транслокацию гистоновой шапероны FACT в хроматиновую фракцию. Ранее противоопухолевая активность этого агента была продемонстрирована относительно широкого спектра солидных опухолей *in vitro* и *in vivo*.

Цель исследования — изучение противоопухолевой активности CBL0137 в отношении клеток острого миелобластного лейкоза (THP-1) и острого лимфобластного лейкоза (CCRF-CEM) *in vitro*.

Материалы и методы. Для определения цитотоксичности CBL0137 использовали МТТ-тест, влияние на клеточный цикл и индукцию апоптоза оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии, активность функционирования сигнальных путей при действии на клетки CBL0137 определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Обработка клеток CBL0137 приводит к аресту клеточного цикла и активации апоптоза. При исследовании влияния CBL0137 на кластеры таргетных генов 10 сигнальных путей, вовлеченных в онкогенез острых лейкозов, его ингибирующее действие было выявлено для сигнальных путей WNT и Hedgehog в обеих клеточных линиях. В клеточной линии THP-1 также наблюдалось ингибирование эфферентных генов PPAR γ и генов, активирующихся при гипоксии. В клетках CCRF-CEM при действии CBL0137, кроме того, наблюдалось усиление экспрессии всех исследованных таргетных генов сигнального пути Notch.

Заключение. На культурах клеток острых лейкозов продемонстрирована противоопухолевая активность CBL0137, препарат обладает цитотоксичностью, вызывает арест клеточного цикла и активацию апоптоза. При действии CBL0137 наблюдаются значительные изменения в экспрессии кластеров эфферентных генов сразу нескольких сигнальных путей.

Ключевые слова: кураксин CBL0137, противоопухолевая активность, острый миелобластный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, сигнальный путь

Для цитирования: Фетисов Т.И., Кирсанов К.И., Борунова А.А. и др. Противоопухолевая активность кураксина CBL0137 на моделях острых лейкозов *in vitro*. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(4):58–68.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-58-68

Anti-cancer activity of curaxin CBL0137 on the models of acute leukemia *in vitro*

T.I. Fetisov¹, K.I. Kirsanov^{1,2}, A.A. Borunova¹, M.N. Zatsepina³, E.A. Lesovaya^{1,4}, T.N. Zabolina¹, G.A. Belitsky¹, M.G. Yakubovskaya¹

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

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

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia; Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

⁴I.P. Pavlov Ryazan State Medical University; 9 Vysokovol'naya St., Ryazan 390026, Russia

Background. Curaxin CBL0137 is a novel non-genotoxic compound with anti-cancer activity based on CBL0137 ability of non-covalent interaction with DNA causing histone chaperone FACT relocation. Anti-cancer activity of this drug was demonstrated previously on the wide panel of solid cancer models *in vitro* and *in vivo*.

Objectives. Estimation of anticancer effects of CBL0137 on the acute myeloblastic leukemia cells (THP-1) and acute lymphoblastic leukemia (CCRF-CEM).

Materials and methods. CBL0137 cytotoxicity was analyzed using the MTT test, the effects on the cell cycle and the induction of apoptosis was assessed by flow cytometry, the activity of signaling pathways in cells treated with CBL0137 was determined by real-time polymerase chain reaction.

Results. Cell treatment with CBL0137 led to cell cycle arrest and apoptosis induction. In the study of CBL0137 effect on target gene clusters of 10 signal transduction pathways involved in the pathogenesis of acute leukemia we have showed that CBL0137 inhibited the expression of down-stream genes of WNT and Hedgehog signaling in both cell lines. In THP-1 cells we also observed the inhibition of the expression of PPAR γ target and hypoxia-activated genes. In CCRF-CEM cells CBL0137 also induced the expression of Notch signaling target genes.

Conclusion. The antitumor activity of CBL0137 was demonstrated on acute leukemia cell cultures, the drug possesses cytotoxicity, causes cell cycle arrest and activation of apoptosis. Significant changes in the expression of efferent gene clusters of several signaling pathways were observed in the cells treated with CBL0137.

Key words: curaxin CBL0137, anti-cancer activity, acute myeloblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, signal transduction pathway

For citation: Fetisov T.I., Kirsanov K.I., Borunova A.A. et al. Anti-cancer activity of curaxin CBL0137 on the models of acute leukemia in vitro. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2019;6(4):58–68. (In Russ.).

Введение

Острые лейкозы (ОЛ) — наиболее злокачественная группа опухолей кроветворной системы. В данную группу входят острые лимфобластные лейкозы (ОЛЛ), происходящие из клеток лимфоидного ростка кроветворения, и острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) — из клеток миелоидного ряда. За последние десятилетия были достигнуты значительные успехи в лечении подростковых ОЛЛ, при этом 5-летняя безрецидивная выживаемость возросла до 70% [1]. Тем не менее ОЛЛ остается одной из основных причин смерти детей и лиц юношеского возраста. В отличие от ОЛЛ ОМЛ чаще встречается у пациентов старших возрастных категорий, пик заболеваемости приходится на возраст 65 лет, а 5-летняя выживаемость варьирует от 10 до 90% в зависимости от молекулярно-генетического подтипа [2]. При этом 7–18% летальных исходов связаны с токсическими последствиями терапии.

В настоящее время в терапии ОЛ применяют цитостатические химиотерапевтические препараты (цитарабин, ифосфамид, идарубицин, винкристин, доксорубицин и др.). Эти препараты не обладают избирательностью по отношению к опухолевым клеткам и оказывают токсическое действие на все активно пролиферирующие нормальные клетки организма. Это определяет развитие таких угрожающих жизни побочных эффектов, как нарушение гемопоэза, развитие гастроинтестинальной токсичности и др. Кроме этого, применение цитостатиков приводит к возникновению вторых первичных опухолей. В современной комбинированной химиотерапии лейкозов активно используются гормональные препараты — глюкокортикостероиды (дексаметазон, преднизолон). Однако и эта группа препаратов не лишена недостатков, среди которых наиболее опасными являются инфекционные осложнения на фоне стойкой иммуносупрессии, развитие диабета, асептический остеонекроз, нарушения водно-солевого баланса. Значительный вклад в повышение эффективности терапии опухолей кроветворной системы внесли таргетные препараты, такие как ингибиторы тирозиновых киназ, особенно ингибиторы химерного белка BCR-ABL (иматиниб, базатиниб и др.). Существенными ограничениями таргетной терапии являются узкая направленность пре-

парата на клетки, имеющие специфические генетические нарушения, и быстрая клональная эволюция опухоли, приводящая к появлению резистентного клона опухолевых клеток. Кроме этого, множественность генетических изменений, обуславливающих малигнизацию клетки, делает необходимой разработку большого количества новых таргетных препаратов, что является исключительно трудозатратным и дорогостоящим процессом. Таким образом, все группы используемых препаратов имеют определенные недостатки, снижающие их эффективность и/или ограничивающие их применение, что делает актуальным поиск новых подходов к терапии ОЛ.

В качестве одного из таких подходов можно рассматривать применение негенотоксичных ДНК-тропных малых молекул, которые, не взаимодействуя с ДНК ковалентно, способны формировать комплексы с макромолекулой за счет водородных связей, а также Ван-дер-Ваальсовых и электростатических взаимодействий. Эти агенты влияют на структуру хроматина и работу ряда ферментов метаболизма ДНК. Это обуславливает широкий спектр их биологических эффектов, в том числе их эпигенетическую активность, способность ингибировать активность PARP1, влияние на сигнальный путь WNT [3–4]. Помимо этого в экспериментах *in vivo* и *in vitro* была выявлена их противоопухолевая активность относительно ряда солидных опухолей (рак толстой кишки, саркома матки и т.д.).

Одно из таких соединений — производное карбазола кураксин CBL0137. Это соединение нековалентно взаимодействует с ДНК, интеркалируя между парами оснований и связываясь с узкой бороздкой макромолекулы. Ранее противоопухолевая активность этого препарата была продемонстрирована относительно широкого спектра солидных опухолей *in vitro* и *in vivo* [5–8]. В основе противоопухолевого эффекта CBL0137 лежит его способность взаимодействовать с гистоновым комплексом FACT, выполняющим роль гистонного шаперона, что, в свою очередь, вызывает исключение комплекса FACT с транскрибируемых областей хроматина. Интегральным эффектом такого воздействия является активация p53- и IFN-зависимых сигнальных путей [9, 10]. Также, на разных

моделях было показано влияние на сигнальные пути NF-κB, WNT, Notch [8, 9, 11].

Цель исследования — изучение цитотоксической активности кураксина CBL0137 относительно клеток ОМЛ и ОЛЛ, его влияния на клеточный цикл, активацию апоптоза и уровень экспрессии таргетных генов 10 основных сигнальных путей, вовлеченных в опухолевую трансформацию и прогрессию.

Материалы и методы

Клеточные линии. В работе использовали клеточные линии ОМЛ ТНР-1 (Институт цитологии РАН) и острого Т-клеточного лейкоза CCRF-CEM (ATCC). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят (Biosera, FB-1001/500), 147 мг L-глутамина и антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) (ПанЭко, Россия) при температуре 37 °C, 5% CO₂. Кураксин CBL0137 был предоставлен LLC Incuron (США).

Для определения цитотоксической активности CBL0137 клетки лейкозов рассаживали в 96-луночные планшеты на 24, 48 и 72 ч по 20×10^3 , 15×10^3 и 10×10^3 клеток на лунку соответственно. Конечная концентрация составляла 0,1–10 мкМ. Затем вносили раствор МТТ-реагента (ПанЭко, Россия) до конечной концентрации 250 мг/мл и инкубировали 3 ч при температуре +37 °C, образовавшийся формазан растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида (ПанЭко, Россия). После полного растворения определяли оптическую плотность содержимого лунок с помощью спектрофотометра MultiScan MCC 340 (Labsystems, США).

Способность CBL0137 активировать апоптоз в клетках опухолей кроветворной системы оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (Sigma-Aldrich, США), влияние на клеточный цикл исследовали с применением красителя PI (Invitrogen, США) на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (BD, США).

РНК из опухолевых клеток была выделена с помощью TRI reagent (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с инструкцией производителя, обратная транскрипция полученных образцов РНК была проведена с использованием набора ОТ-1 (Синтол, Россия). Анализ интегрального эффекта CBL0137 на основные сигнальные пути клеток, вовлеченные в патогенез ОЛ, был проведен с помощью системы Human Signal Transduction Pathway Finder RT2Profiler PCR Array (Qiagen, США). Данная система представляет собой панель из 84 пар праймеров к таргетным генам для сигнальных путей, а также 5 генов домашнего хозяйства (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1* и *RPLP0*). При анализе учитывали гены, экспрессия которых увеличивалась/уменьшалась более чем в 2 раза относительно уровня экспрессии генов необработанного контроля (в 2 и более биологических повторах). Обработку данных проводили с помощью программного

обеспечения, представленного на сайте производителя (<https://dataanalysis.qiagen.com/pcr>).

Результаты

Цитотоксическая активность кураксина CBL0137 относительно клеток лейкозов. Для того чтобы оценить цитотоксический эффект, а также отобрать эффективные концентрации для дальнейших исследований, был проведен МТТ-тест. Клетки инкубировали 24, 48 и 72 ч с различными концентрациями CBL0137. Было показано, что препарат оказывает время- и дозозависимый цитотоксический эффект относительно клеток обеих линий, при этом клетки линии ТНР-1 оказались более чувствительны к препарату. Значения IC₅₀ препарата составили для ТНР-1 и CCRF-CEM соответственно при 24 ч инкубации — 2 и 3,5 мкМ, при 48 ч — 1,7 и 1,9 мкМ, при 72 ч — 0,57 и 0,9 мкМ (рис. 1).

Влияние CBL0137 на клеточный цикл и активацию апоптоза в клетках лейкозов. На 1-м этапе исследования механизма клеточной гибели, вызываемой кураксином CBL0137, мы изучили влияние данного препарата на распределение клеток ОЛ по фазам клеточного цикла. Для этого через 24 ч после обработки CBL0137 в концентрациях 1,5; 1,25 и 1 мкМ клетки окрашивали йодидом пропидия. Концентрации препарата и продолжительность обработки клеток были выбраны на основании наших предыдущих исследований эффектов CBL0137 на культивируемые опухолевые клетки ряда линий, в которых было продемонстрировано, что эффект на локализацию гистона H1 и гистонового шаперона FACT развивается в течение 1 ч [12], а влияние на эпигенетическую регуляцию экспрессии проявляется через 6 ч после начала обработки клеток препаратом и достигает максимального эффекта к 24 ч [10]. С помощью проточной цитофлуориметрии было продемонстрировано, что обработка клеток CBL0137 приводила к значительному увеличению доли клеток в фазе G₂/M (рис. 2). Кроме этого, выбранные концентрации вызывали увеличение интервала subG₁, что характерно для клеточной гибели.

Ранее была показана способность CBL0137 индуцировать апоптоз в клеточных линиях солидных опухолей. При оценке апоптогенной активности CBL0137 в клетках лейкозов проводили анализ транслокации фосфатидилсерина и нарушения целостности клеточной мембраны, используя окраску аннексином V-FITC и йодидом пропидия. Обработка клеток CBL0137 приводила к индукции апоптоза, что отражалось в значительном сдвиге в составе клеточной популяции: наблюдали время- и дозозависимое увеличение доли клеток с ранними апоптотическими изменениями, а также увеличивалась доля клеток, подверженных поздней стадии апоптоза, сопровождающейся вторичным некрозом клеток (рис. 3). При увеличении концентрации CBL0137 доля клеток с выявленными апоптотическими событиями возрастала с 13 до 41% в клеточной линии CCRF-CEM и с 16

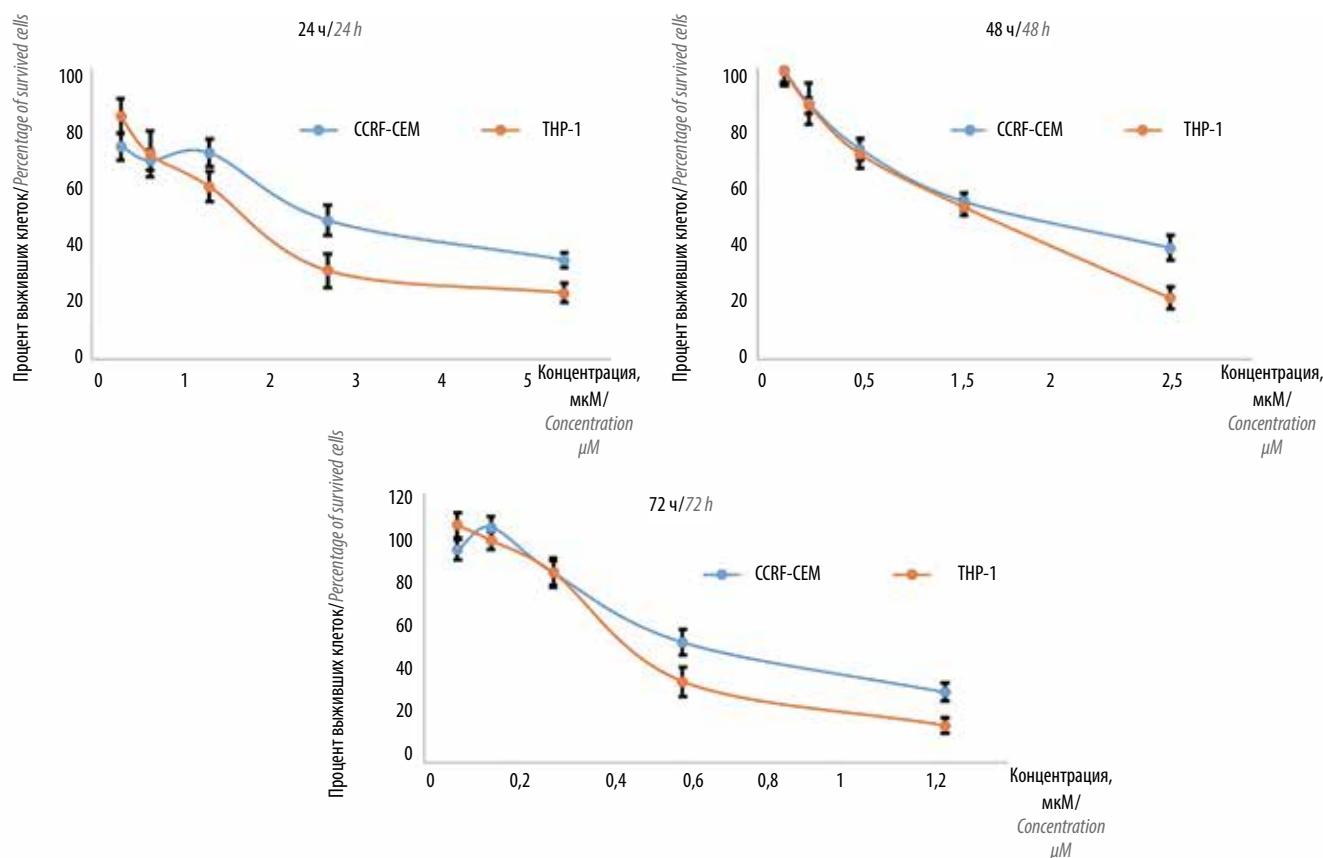


Рис. 1. Цитотоксический эффект кураксина CBL0137 на клетки острых лейкозов

Fig. 1. Cytotoxic effect of curaxin CBL0137 on acute leukemia cells

до 52% — в THP-1. Обработку клеток проводили в широком диапазоне концентраций, что позволяло сравнить эффекты не только эквимоларных доз, но также проанализировать уровень активации апоптоза в зависимости от дозы и интенсивности цитотоксического действия.

При эквимоларных концентрациях препарата соотношение количества клеток, находящихся в ранней и поздней стадиях апоптоза, в линиях было различным. При концентрации CBL0137 3 мкМ в клеточной линии CCRF-CEM на долю клеток, подверженных раннему апоптозу, приходилось 29%, а позднему — 12%, тогда как в клеточной линии THP-1 — 7 и 45% соответственно. Это согласуется с данными анализа цитотоксической активности CBL0137 на этих клеточных линиях и свидетельствует о большей чувствительности клеток THP-1 к препарату.

Влияние кураксина CBL0137 на экспрессию генов различных сигнальных путей в клетках лейкозов. Исследование влияния CBL0137 на экспрессию генов проводили с использованием набора Human Signal Transduction Pathway Finder RT2Profiler PCR Array (Qiagen, США), содержащего панель из 84 пар праймеров для таргетных генов следующих сигнальных путей: (1) WNT/ β -катенин; (2) NF- κ B; (3) Notch; (4) Hedgehog; (5) PPAR γ ; (6) TGF β ; (7) STAT/JAK; (8)

p53; а также генов, активация которых связана с (9) гипоксией и (10) оксидативным стрессом. Выбор продолжительности обработки клеток CBL0137 был основан на предыдущих данных о динамике его действия. Изменение уровней экспрессии после обработки CBL0137 (1,5 мМ, 24 ч) было зарегистрировано для 37 генов в линии THP-1 и для 36 генов в линии CCRF-CEM (рис. 4). В линии THP-1 наибольшему влиянию были подвержены кластеры генов, относящихся к сигнальным путям WNT (7 из 9 генов панели), Hedgehog (5/9), PPAR γ (5/8), а также к путям, запускаемым в ответ на гипоксию (7/9). Для всех сигнальных путей было продемонстрировано снижение экспрессии эфферентных генов. Для других сигнальных путей обработка CBL0137 приводила к значимому изменению экспрессии не более чем 3 эфферентных генов, влияние препарата на экспрессию каждого из которых может изучаться отдельно. При действии препарата на клетки CCRF-CEM было показано изменение экспрессии генов сигнальных путей WNT (7/9), Notch (8/9) и Hedgehog (6/9). При этом экспрессия практически всех таргетных генов сигнальных путей WNT и Hedgehog снизилась, тогда как экспрессия всех эфферентных генов сигнального пути возросла в 2–8 раз.

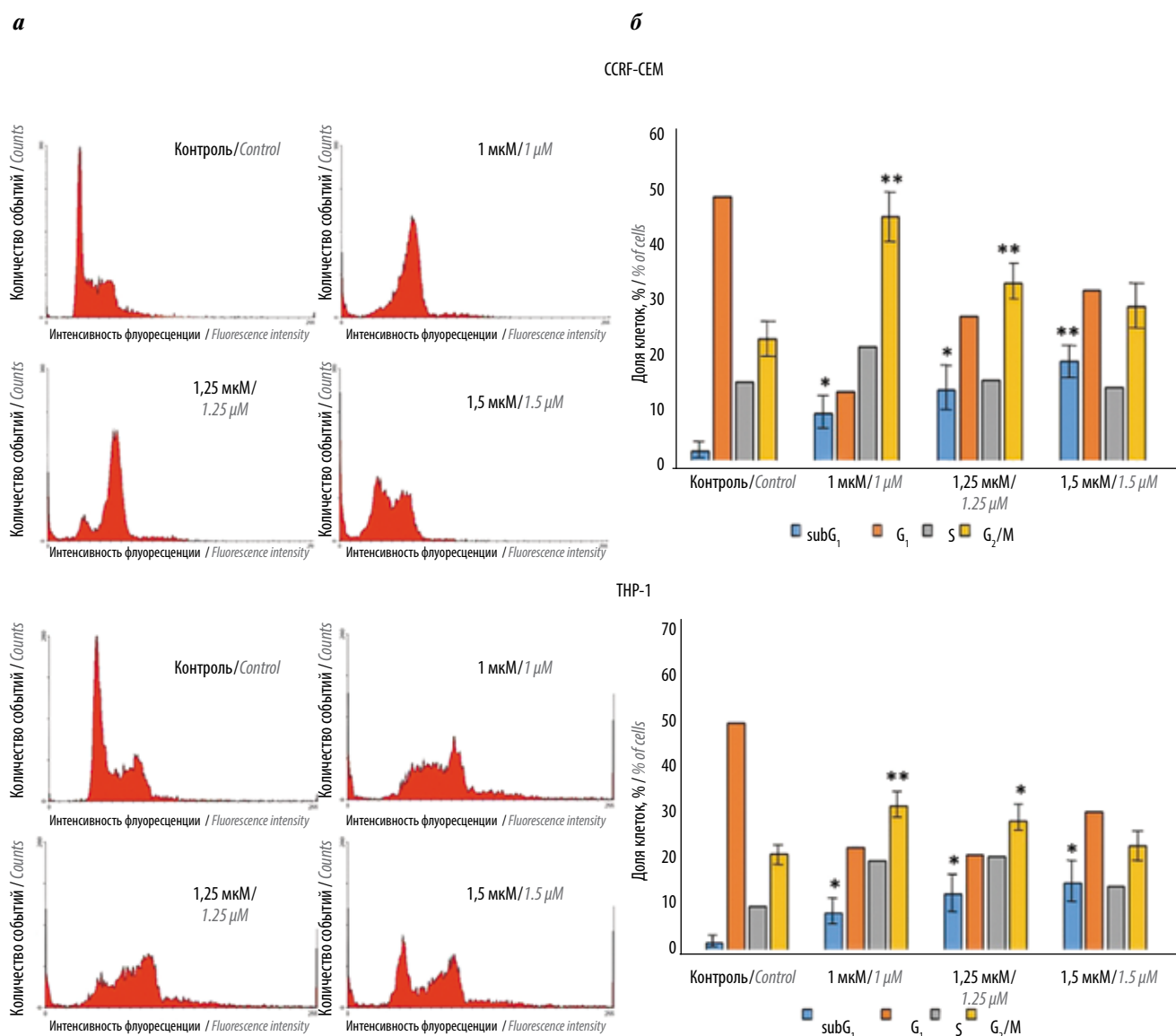


Рис. 2. Влияние кураксина CBL0137 на клеточный цикл: а — типичные гистограммы, показывающие влияние CBL0137 на клеточный цикл в линиях острых лейкозов при разных концентрациях; б — диаграмма распределения субпопуляций клеточных линий в ответ на обработку CBL0137. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ по сравнению с необработанными клетками

Fig. 2. Effect of curaxin CBL0137 on the cell cycle: а — typical histograms showing the effect of CBL0137 on the cell cycle in the acute leukemia cell lines at different concentrations; б — diagram of cell line subpopulation distribution in response to CBL0137 treatment. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ compared to untreated cells

Обсуждение

Кураксин CBL0137 является перспективным противоопухолевым препаратом. Механизм противоопухолевого действия этого агента основан на его способности нековалентно взаимодействовать с ДНК, изменять структуру хроматина и модулировать работу ферментов метаболизма ДНК и репарации, что опосредует широкий спектр эффектов этого агента [10, 12]. Противоопухолевая активность CBL0137 *in vivo* была продемонстрирована относительно ряда солидных опухолей, включая рак молочной железы [5], рак поджелудочной железы [6], глиобластому [7], рак легкого [8], рак толстой кишки [13]. Более того, было

показано, что этот препарат оказывает значительное антиканцерогенное действие при индукции рака толстой кишки химическим канцерогеном у мышей [11]. В то же время противоопухолевые свойства данного соединения относительно опухолей кроветворной системы остаются малоизученными и рассмотрены лишь в нескольких работах. В одной из них R. Lock и соавт. продемонстрировали цитотоксическую активность CBL0137 относительно ряда линий ОЛЛ и показали противоопухолевую активность данного препарата на моделях *in vivo* [14]. В другой работе K. Somers и соавт. продемонстрировали противоопухолевую активность CBL0137 на переживающих культурах ОЛ

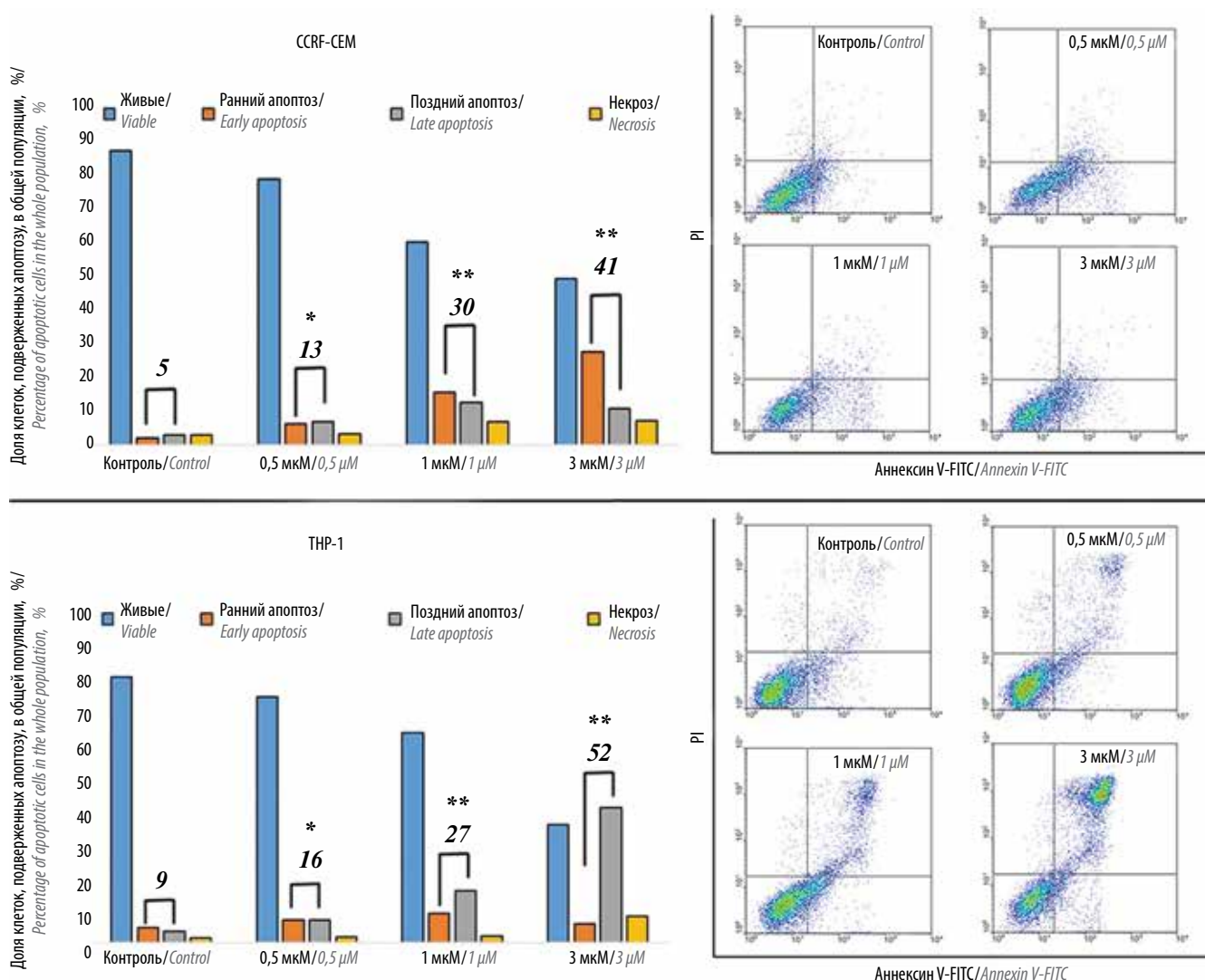


Рис. 3. CBL0137 индуцирует ранний и поздний апоптоз в клетках острых лейкозов. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$

Fig. 3. CBL0137 induces early and late apoptosis in acute leukemia cells. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$

с перестройкой гена *MLL* (Kmt²A) [15]. В нашей работе рассмотрены эффекты CBL0137 на опухолевые клетки ОМЛ линии THP-1 в сравнении с таковыми на клетки ОЛЛ линии CCRF-CEM. Эффективность лечения ОМЛ продолжает оставаться весьма низкой, и поиск новых химиотерапевтических препаратов для лечения этой формы онкологического заболевания актуален.

На 1-м этапе исследования мы продемонстрировали цитотоксичность CBL0137 относительно клеток THP-1 и CCRF-CEM. Полученные значения IC_{50} (THP-1—0,57 мкМ, CCRF-CEM—0,9 мкМ при 72-часовой обработке) выше значений, которые показаны в работе R. Lock и соавт. (0,15—0,3 мкМ), что связано с различием во времени инкубации с соединением. В последнем случае время обработки CBL0137 составляло 96 ч. В нашем исследовании мы продемонстрировали цитотоксический эффект, включающий индукцию апоптоза и арест клеточного цикла у клеток ОЛ,

уже через 24 ч после начала обработки препаратом. Выбор более короткого интервала воздействия препарата был основан на данных о быстром проникновении CBL0137 в ядра клеток [12]. Попадание этого соединения в ядро, нековалентное связывание с ДНК, изменение структуры хроматина и транслокация шаперона гистонов FACT регистрируются уже через несколько минут после обработки клеток этим агентом. С учетом того, что механизм избирательного противоопухолевого действия CBL0137 связывают с его способностью индуцировать транслокацию FACT в хроматиновую фракцию ядра, что приводит к изменению активности целого ряда сигнальных путей, мы сконцентрировали свое внимание на более ранних ответах клетки. Кроме этого, в исследовании К. Леоновой и соавт. установлено, что реактивирующее влияние CBL0137 на экспрессию эпигенетически подавленных генов начинает проявляться уже через 6 ч культивирования клеток в присутствии препарата и достигает

CCRF-CEM

Сигнальный путь Notch/*Notch signaling pathway*

<i>HES5</i>	<i>HEY1</i>	<i>HEY2</i>	<i>HEYL</i>	<i>ID1</i>	<i>JAG1</i>	<i>LFNG</i>	<i>NOTCH1</i>
4	6,7	3,9	4,9	6	7,8	3,3	4,4

Сигнальный путь WNT/*WNT signaling pathway*

<i>AXIN2</i>	<i>CCND1</i>	<i>CCND2</i>	<i>FOSL1</i>	<i>MMP7</i>	<i>MYC</i>	<i>WISP</i>
-10,5	-3,4	-5	5,1	-2,3	-5,8	2,9

Сигнальный путь Hedgehog/*Hedgehog signaling pathway*

<i>BCL2</i>	<i>PTCH1</i>	<i>WNT1</i>	<i>WNT2B</i>	<i>WNT3A</i>	<i>WNT6</i>
-2,9	4,3	-5,8	-4,5	-4,8	-5,7

Сигнальный путь NF-κB/*NF-κB signaling pathway*

<i>BCL2A1</i>	<i>BIRC3</i>	<i>CCL5</i>	<i>IFNG</i>	<i>TNF</i>
-2,9	-3,3	2,9	5,9	3,2

Сигнальный путь STAT/*JAK/STAT/JAK signaling pathway*

<i>IRF1</i>	<i>CCND1</i>	<i>SOCS3</i>
-7,6	-3,4	3,2

Сигнальный путь TGFβ/*TGFβ signaling pathway*

<i>IFRD1</i>	<i>MYC</i>	<i>TNFSF10</i>
-2	-5,8	6,4

Сигнальный путь p53/*p53 signaling pathway*

<i>BAX</i>	<i>EGFR</i>
-5	-3,9

Гипоксия/*Hypoxia*

<i>CA9</i>	<i>VEGFA</i>
-2,3	-5,3

Сигнальный путь PPARγ/*PPARγ signaling pathway*

<i>OLR1</i>	<i>SOCS3</i>
3,8	3,2

Окислительный стресс/*Oxidative stress*

<i>NQO1</i>
2,5

THP-1

Гипоксия/*Hypoxia*

<i>ADM</i>	<i>CA9</i>	<i>EPO</i>	<i>HMOX1</i>	<i>SERPINE1</i>	<i>SLC2A1</i>	<i>VEGFA</i>
-2,9	-13,3	-18,5	-2,5	-6,5	-3,2	-2,9

Сигнальный путь WNT/*WNT signaling pathway*

<i>AXIN2</i>	<i>CCND2</i>	<i>DAB2</i>	<i>MMP7</i>	<i>MYC</i>	<i>PPARD</i>	<i>WISP1</i>
-3,5	-4	-3,2	-5,9	-4,3	-2,9	-9,8

Сигнальный путь Hedgehog/*Hedgehog signaling pathway*

<i>BMP4</i>	<i>WNT1</i>	<i>WNT2B</i>	<i>WNT5A</i>	<i>WNT6</i>
-4,5	-5	-3,1	-13,9	-4,8

Сигнальный путь PPARγ/*PPARγ signaling pathway*

<i>CPT2</i>	<i>FABP1</i>	<i>OLR1</i>	<i>SLC27A4</i>	<i>SOCS3</i>
-3,2	-6,6	-7,1	-4,6	-2,1

Сигнальный путь TGFβ/*TGFβ signaling pathway*

<i>ATF4</i>	<i>EMP1</i>	<i>MYC</i>
-3,5	-4,1	-4,3

Сигнальный путь p53/*p53 signaling pathway*

<i>BBC3</i>	<i>EGFR</i>	<i>FAS</i>
-3,1	-23	2,4

Сигнальный путь Notch/*Notch signaling pathway*

<i>HEY1</i>	<i>HEY2</i>	<i>ID1</i>
-5,7	-8,1	-6,6

Сигнальный путь NF-κB/*NF-κB signaling pathway*

<i>CSF1</i>	<i>IFNG</i>
-2,9	-4,4

Сигнальный путь STAT/*JAK/STAT/JAK signaling pathway*

<i>SOCS3</i>	<i>FCER2</i>
-2,1	-16,6

Окислительный стресс/*Oxidative stress*

<i>GSR</i>	<i>HMOX1</i>
-3,3	-2,5

Рис. 4. Влияние CBL0137 на экспрессию таргетных генов сигнальных путей, вовлеченных в патогенез острых лейкозов

Fig. 4. Effect of CBL0137 on expression of the target genes of the signal pathways involved in pathogenesis of acute leukemias

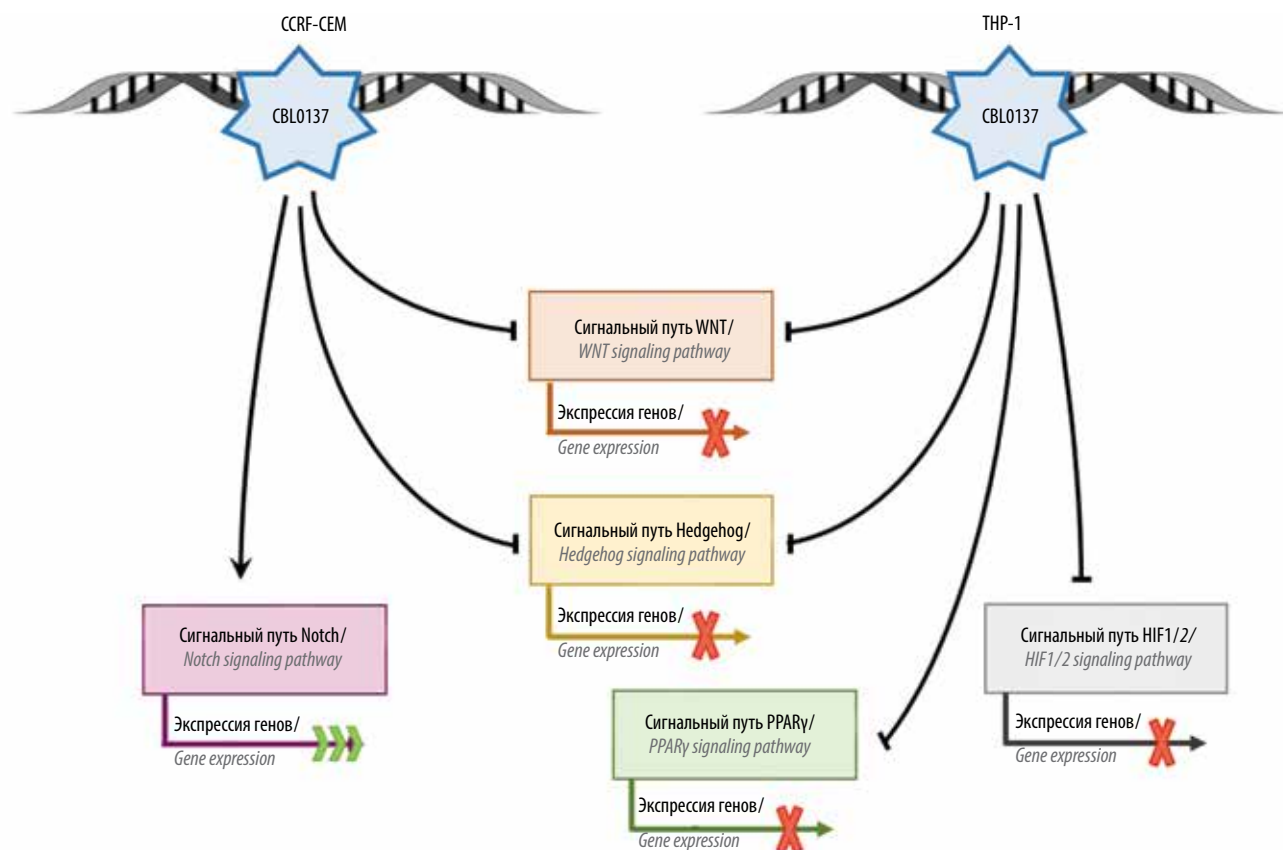


Рис. 5. Влияние CBL0137 на активность сигнальных путей в клетках CCRF-CEM и THP-1

Fig. 5. Effect of CBL0137 on signaling pathway activity in the CCRF-CEM and THP-1 cells

своего максимума к 24 ч [10], что также согласуется с необходимостью анализа более ранних эффектов CBL0137.

Несмотря на тот факт, что CBL0137 проявил несколько более низкую цитотоксичность в отношении клеток THP-1 по сравнению с CCRF-CEM, он оказал весьма близкие по величине эффекты на активацию апоптоза. Таким образом, мы продемонстрировали, что CBL0137 проявляет противоопухолевую активность в отношении клеток как ОЛЛ, так и ОМЛ.

При изучении влияния кураксина CBL0137 на экспрессию кластеров эфферентных генов сигнальных путей было установлено, что обработка клеток ОЛ CBL0137 приводит к снижению экспрессии таргетных генов сигнальных путей WNT и Hedgehog в обеих клеточных линиях (рис. 5). Данные сигнальные пути участвуют в патогенезе ОЛ и рассматриваются как потенциальные мишени в их терапии. Так, сигнальный путь WNT участвует в регуляции множества клеточных процессов, включая дифференцировку, пролиферацию, миграцию, апоптоз и поддержание фенотипа стволовых клеток [16, 17]. Нарушение регуляции этого сигнального пути – важный элемент патогенеза ОЛ. Основными механизмами его нарушения, выявляе-

нными в настоящее время в ОЛ, являются повышение чувствительности к WNT-лиганду, эпигенетическая репрессия WNT-антагонистов, гиперэкспрессия WNT-лигандов, нарушения деградации β -катенина в цитоплазме и изменение активности TCF/Lef [18]. Сигнальный путь Hedgehog является одним из регуляторов эмбрионального развития [19], у взрослых же функциональная активность белков этого пути заключается в поддержке гемопоэза, в частности в дифференцировке Т-клеток [20]. В патогенезе ОЛ Hedgehog выполняет роль положительного регулятора пролиферации и выживания, а также участвует в поддержании субпопуляции опухолевых клеток, имеющих стволовый фенотип, и потенцирует развитие множественной лекарственной устойчивости [21].

В клетках линии ОМЛ CBL0137 приводил к снижению экспрессии таргетных генов сигнальных путей PPAR γ и гипоксии. Ингибирование экспрессии генов, запускаемых гипоксией, способствует преодолению множественной лекарственной устойчивости в клетках ОМЛ [22], а ингибирование сигнального пути PPAR γ должно приводить к ослаблению активации апоптоза и увеличению скорости пролиферации. Ранее было показано, что гиперактивация этого

сигнального пути приводит к редукции опухоли [23]. На клетках солидных опухолей неоднократно продемонстрировано, что CBL0137 приводит к активации эфферентных генов *P53*. В наших экспериментах при обработке клеток CBL0137 не выявлено одностороннего изменения кластеров таргетных генов *P53*, что отчасти может объясняться мутацией в гене *P53*, которая содержится в клетках обеих линий [24].

В линии Т-клеточного лейкоза кураксин CBL0137 повышал экспрессию таргетных генов сигнального пути Notch, который является регулятором клеточной пролиферации, выживания, апоптоза. Этот сигнальный путь гиперэкспрессирован более чем в 50% случаев ОЛЛ из-за активирующей мутации *NOTCH1* [25]. Клетки CCRF-CEM несут мутацию в гене *NOTCH1* [26], что отражается в более высоком базовом уровне экспрессии почти всех эфферентных генов этого сигнального пути по сравнению с соответствующими уровнями экспрессии в клетках THP-1 (данные не представлены), однако это не объясняет столь значительное увеличение экспрессии таргетных генов сигнального пути Notch при действии CBL0137. Ранее на клеточных линиях рака легкого было показано, что CBL0137 способен активировать экспрессию *NOTCH1* и его таргетных генов (*HEY1*, *HEY2*, *HES*) по следующему механизму: при взаимодействии с хроматином CBL0137 вытесняет негативный регулятор SP3 из промотора гена *NOTCH1*, что приводит к усилению экспрессии последнего [8]. В зависимости от типа клеток *NOTCH1* репрессирует или активирует пролиферацию недифференцированных стволовых клеток [27]. Считается, что при немелкоклеточном раке легкого [27], Т-клеточном лейкозе [25], глиобластоме [28] онкогенным фак-

тором является гиперактивация сигнального пути Notch, тогда как в ряде нейроэндокринных опухолей, в том числе в мелкоклеточном раке легкого, при котором этот сигнальный путь супрессирован, онкогенным фактором выступает именно его инактивация [29, 30]. В работе E. Kolundzic и соавт. показано, что FACT является модулятором активности сигнального пути Notch [31]. Возможное FACT-опосредованное активирующее влияние CBL0137 на сигнальный путь Notch обсуждается в работе M.Z. Jin и соавт. [32]. Можно предположить, что наблюдаемый нами эффект CBL0137 на клетки CCRF-CEM с высоким мутационно обусловленным конститутивным уровнем активности *NOTCH1* является FACT-опосредованным, однако для подтверждения данной гипотезы требуется проведение дополнительных исследований.

Заключение

В представленном исследовании продемонстрирована потенциальная противоопухолевая активность кураксина CBL0137 в отношении ОЛ. Исследуемый препарат вызывал арест клеточного цикла и активацию апоптоза. В плане влияния этого соединения на активность сигнальных путей установлено, что CBL0137 приводит к значительным изменениям в экспрессии кластеров эфферентных генов сразу нескольких сигнальных путей, при этом эффект препарата зависит от типа клеток. Таким образом, одним из направлений исследования механизмов противоопухолевой активности кураксина CBL0137 в отношении лейкозов может стать поиск взаимосвязей между генетическими характеристиками клеток и эффектами, вызываемыми этим соединением.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Паровичникова Е.Н., Троицкая В.В., Соколов А.Н. и др. Промежуточные результаты по лечению острых Ph-негативных лимфобластных лейкозов у взрослых больных (итоги Российской исследовательской группы по лечению острых лимфобластных лейкозов (RALL)). Онкогематология 2014;9(3): 6–15. [Parovichnikova E.N., Troitskaya V.V., Sokolov A.N. et al. Interim results of the Ph-negative acute lymphoblastic leukemia treatment in adult patients (results of Russian research group of ALL treatment (RALL)). Onkogematologiya = Oncohematology 2014;9(3):6–15. (In Russ.).]
2. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых. Под ред. В.Г. Савченко, Е.Н. Паровичниковой, Б.В. Афанасьева и др. М., 2018. [Clinical recommendations for the diagnosis and treatment of acute myeloid leukemia in adults. Eds.: V.G. Savchenko, E.N. Parovichnikova, B.V. Afanasyeva et al. Moscow, 2018. (In Russ.).]
3. Grant M.A., Baron R.M., Macias A.A. et al. Netropsin improves survival from endotoxaemia by disrupting HMGA1 binding to the NOS2 promoter. Biochem J 2009;418(1):103–12. DOI: 10.1042/BJ20081427.
4. Kirsanov K.I., Kotova E., Makhov P. et al. Minor groove binding ligands disrupt PARP-1 activation pathways. Oncotarget 2014;5(2):428–37. DOI: 10.18632/oncotarget.1742.
5. Fleishman D., Prendergast L., Safina A. et al. Level of FACT defines the transcriptional landscape and aggressive phenotype of breast cancer cells. Oncotarget 2017;8(13):20525–42. DOI: 10.18632/oncotarget.15656.
6. Burkhardt C., Fleishman D., Kohn R. et al. Curaxin CBL0137 eradicates drug resistant cancer stem cells and potentiates efficacy of gemcitabine in preclinical models of pancreatic cancer. Oncotarget 2014;5(22):11038–53. DOI: 10.18632/oncotarget.2701.
7. Barone T.A., Burkhardt C.A., Safina A. et al. Anticancer drug candidate CBL0137, which inhibits histone chaperone FACT, is efficacious in preclinical orthotopic models of temozolomide-responsive and -resistant glioblastoma. Neuro Oncol 2017;19(2):186–96. DOI: 10.1093/neuonc/now141.
8. De S., Lindner D.J., Coleman C.J. et al. The FACT inhibitor CBL0137 synergizes with cisplatin in small-cell lung cancer by increasing NOTCH1 expression and targeting tumor-initiating cells. Cancer

- Res 2018;78(9):2396–406. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1920.
9. Gasparian A.V., Burkhart C.A., Purmal A.A. et al. Curaxins: anticancer compounds that simultaneously suppress NF- κ B and activate p53 by targeting FACT. *Sci Transl Med* 2011;3(95):95ra74.
 10. Leonova K., Safina A., Nesher E. et al. TRAIN (Transcription of Repeats Activates Interferon) in response to chromatin destabilization induced by small molecules in mammalian cells. *Elife* 2018;7. DOI: 10.7554/eLife.30842.
 11. Kirsanov K.I., Fetisov T., Lesovaya E.A. et al. Prevention of colorectal carcinogenesis by DNA binding small molecule curaxin CBL0137 involves suppression of Wnt signaling. *Cancer Prev Res (Phila)* 2019. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-19-0198.
 12. Safina A., Cheney P., Pal M. et al. FACT is a sensor of DNA torsional stress in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res* 2017;45(4):1925–45. DOI: 10.1093/nar/gkw1366.
 13. Фетисов Т.И., Тилова Л.Р., Лесовая Е.А. и др. Противоопухолевое действие кураксина CBL0137 на моделях аденокарциномы толстой кишки. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(3):67–72. [Fetisov T.I., Tilova L.R., Lesovaya E.A. et al. Antitumor effect of the curaxin CBL0137 on the models of colon cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;3(3):67–72. (In Russ.)].
 14. Lock R., Carol H., Maris J.M. et al. Initial testing (stage 1) of the curaxin CBL0137 by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* 2017. DOI: 10.1002/pbc.26263.
 15. Somers K., Kosciolk A., Bongers A. et al. Potent antileukemic activity of curaxin CBL0137 against MLL-rearranged leukemia. *Int J Cancer* 2019. DOI: 10.1002/ijc.32582.
 16. Reya T., Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434:843–50.
 17. Rulifson I.C., Karnik S.K., Heiser P.W. et al. Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(15):6247–52. DOI: 10.1073/pnas.0701509104.
 18. Fetisov T.I., Lesovaya E.A., Yakubovskaya M.G. et al. Alterations in WNT signaling in leukemias. *Biochemistry (Moscow)* 2018;83(12):1448–58. DOI: 10.1134/S0006297918120039.
 19. Jia Y., Wang Y., Xie J. The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation. *Arch Toxicol* 2015;89(2):179–91. DOI: 10.1007/s00204-014-1433-1.
 20. Rowbotham N.J., Hager-Theodorides A.L., Cebecauer M. et al. Activation of the Hedgehog signaling pathway in T-lineage cells inhibits TCR repertoire selection in the thymus and peripheral T-cell activation. *Blood* 2007;109(9):3757–66. DOI: 10.1182/blood-2006-07-037655.
 21. Campbell V., Copland M. Hedgehog signaling in cancer stem cells: a focus on hematological cancers. *Stem Cells Cloning* 2015;8:27–38. DOI: 10.2147/SCCAA.S58613.
 22. Griessinger E., Anjos-Afonso F., Pizzitola I. et al. A niche-like culture system allowing the maintenance of primary human acute myeloid leukemia-initiating cells: a new tool to decipher their chemoresistance and self-renewal mechanisms. *J Cell Physiol* 2012;227(6):2750–8.
 23. Chapuis N., Poulain L., Birsan R. et al. Rationale for targeting deregulated metabolic pathways as a therapeutic strategy in acute myeloid leukemia. *Front Oncol* 2019;9:405. DOI: 10.3389/fonc.2019.00405.
 24. Sak K., Everaus H. Established Human Cell Lines as Models to Study Anti-leukemic Effects of Flavonoids. *Curr Genomics* 2017;18(1):3–26. DOI: 10.2174/1389202917666160803165447.
 25. Weng A.P., Ferrando A.A., Lee W. et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004;306(5694):269–71. DOI: 10.1126/science.1102160.
 26. Sharma A., Gadkari R.A., Ramakanth S.V. et al. A novel monoclonal antibody against Notch1 targets leukemia-associated mutant Notch1 and depletes therapy resistant cancer stem cells in solid tumors. *Sci Rep* 2015;5:11012. DOI: 10.1038/srep11012.
 27. Wang J., Sullenger B.A., Rich J.N. Notch signaling in cancer stem cells. *Adv Exp Med Biol* 2012;727:174–85. DOI: 10.1007/978-1-4614-0899-4_13.
 28. Purow B.W., Haque R.M., Noel M.W. et al. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res* 2005;65(6):2353–63. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1890.
 29. Platta C.S., Greenblatt D.Y., Kunimaimaiyaan M., Chen H. Valproic acid induces Notch1 signaling in small cell lung cancer cells. *J Surg Res* 2008;148(1):31–7. DOI: 10.1016/j.jss.2008.03.008.
 30. George J., Lim J.S., Jang S.J. et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. 2015; 524(7563):47–53. DOI: 10.1038/nature14664.
 31. Kolundzic E., Ofenbauer A., Bulut S.I. et al. FACT sets a barrier for cell fate reprogramming in *caenorhabditis elegans* and human cells. *Dev Cell* 2018;46(5):611–26.e12. DOI: 10.1016/j.devcel.2018.07.006.
 32. Jin M.Z., Xia B.R., Xu Y., Jin W.L. Curaxin CBL0137 exerts anticancer activity via diverse mechanisms. *Front Oncol* 2018;8:598. DOI: 10.3389/fonc.2018.00598.

Вклад авторов

Т.И. Фетисов: получение данных, обработка результатов, подготовка рукописи;
 К.И. Кирсанов: подготовка дизайна исследования, обсуждение результатов, подготовка текста рукописи;
 А.А. Борунова: работа с клетками на проточном цитофлуориметре;
 М.Н. Зацепина: подготовка растворов, приборов, проведение экспериментов;
 Е.А. Лесовая: постановка МТТ, работа с рукописью;
 Т.Н. Заботина: планирование экспериментов с использованием проточного цитофлуориметра, обсуждение результатов, работа с рукописью;
 Г.А. Белицкий: обсуждение дизайна исследования и результатов, подготовка раздела рукописи «Обсуждение»;
 М.Г. Якубовская: обсуждение дизайна исследования, деталей его выполнения, результатов, обсуждение и подготовка текста рукописи.

Authors' contributions

T.I. Fetisov: planning and performance of the experiments, data analysis, manuscript preparation;
 K.I. Kirsanov: preparing of the experiment design, data analysis, preparing of the manuscript text;
 A.A. Borunova: performance of the experiments flow cytometer;
 M.N. Zatssepina: preparation of the solutions, equipment, experiments;
 E.A. Lesovaya: MTT-test performance, manuscript text preparation;
 T.N. Zabolina: planning of the experiments using flow cytometer;
 G.A. Belitsky: discussion on the experiment design, data analysis, text preparation of the part "Discussion";
 M.G. Yakubovskaya: discussion of the experiment design, data analysis, discussion and preparing of the manuscript text.

ORCID авторов/ORCID of authors

Т.И. Фетисов/T.I. Fetisov: <https://orcid.org/0000-0002-5082-9883>

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

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

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-315-90098).

Financing. The study was performed with support from the Russian Foundation for Basic Research (project No. 19-315-90098).

Новые подходы в 3D-моделировании роста *in vitro* первичных культур злокачественных глиом

Ю.А. Хоченкова¹, И.Г. Дырда², Ю.С. Мачкова¹, Э.Ш. Соломко¹,
Т.А. Сидорова¹, Д.А. Хоченков^{1,3}, Е.А. Авилова⁴

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

²ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы»;
Россия, 115284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 5;

³ФГБОУ ВО «Тольяттинский государственный университет»; Россия, 445020 Тольятти, Белорусская ул., 14;

⁴ООО «ДжиИ Хэлсеа»; Россия, 123112 Москва, Пресненская набережная, 10

Контакты: Юлия Александровна Хоченкова julia_vet@bk.ru

Введение. Заболеваемость глиомами головного мозга прочно занимает лидирующую позицию среди всех опухолей центральной нервной системы — 40–50 % выявленных случаев, более половины из них представлены глиобластомой. Существующие клеточные линии и методы культивирования не отражают всех особенностей трехмерной (3D) организации нативной глиобластомы. Применение темозоломида приводит к развитию лекарственной устойчивости и острого рецидива с последующим плохим клиническим исходом. Развитие резистентности в значительной степени связано с наличием в популяции опухолевых стволовых клеток и внутриопухолевой гетерогенностью. Получение 3D-культур из первичного материала позволит сохранить пул стволовых клеток и специфические для конкретной опухоли особенности.

Цель исследования — получить 3D-модель на основе первичных клеточных культур, позволяющую сохранить гетерогенную популяцию и исходный фенотип опухолевых клеток.

Материалы и методы. Использованы клетки линии человеческой глиомы U-87MG и первичная клеточная культура GBM002, полученная из операционного материала, с подтвержденным диагнозом глиобластомы. Из клеточных линий были получены нейросферы, рост которых контролировали с помощью автоматической системы для клеточного анализа InCell Analyzer 6000. Для определения содержания клеток CD133+ использовали метод проточной цитометрии. Оценку экспрессии в нейросферах рецепторных тирозинкиназ VEGFR1, VEGFR2 (рецепторы эндотелиального фактора роста 1-го и 2-го типов), FGFR2 (рецептор фактора роста фибробластов 2-го типа) и маркера гипоксии HIF-1α (фактор, индуцируемый гипоксией, 1α) проводили с помощью конфокальной микроскопии.

Результаты. Клетки глиобластомы GBM002, выделенные из операционного материала, образовывали нейросферы, при этом повышалось количество клеток CD133+ с 1–2 до 16–19 % по сравнению с двухмерными культурами. При длительном культивировании клеток с нецитотоксическими дозами темозоломида установлено, что такие клетки образуют нейросферы меньшего размера по сравнению с контрольными клетками. Показано, что экспрессия рецепторных тирозинкиназ при культивировании клеток глиобластомы GBM002 в нейросферах отличается от таковой в двухмерных культурах. Установлено, что в нейросферах в значительной степени увеличивается экспрессия FGFR2 и VEGFR1.

Заключение. 3D-культивирование первичных культур позволяет получать более гетерогенную популяцию опухолевых клеток, отражающую пространственную неоднородность клеток, повышать пул стволовых клеток и воссоздавать условия гипоксии внутри микроопухолей головного мозга.

Ключевые слова: глиобластома, 3D-культура, рецепторные тирозинкиназы, темозоломид

Для цитирования: Хоченкова Ю.А., Дырда И.Г., Мачкова Ю.С. и др. Новые подходы в 3D-моделировании роста *in vitro* первичных культур злокачественных глиом. *Успехи молекулярной онкологии* 2019;6(4):69–74.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-69-74

New approaches in 3D modeling of *in vitro* growth of primary cultures of malignant gliomas

Yu.A. Khochenkova¹, I.G. Dyrda², Yu.S. Machkova¹, E.Sh. Solomko¹, T.A. Sidorova¹,
D.A. Khochenkov^{1,3}, E.A. Avilova⁴

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

²S.P. Botkin City Clinical Hospital; 5th Botkinskiy Proezd, Moscow 115284, Russia;

³Togliatti State University; 14 Belorusskaya St., Togliatti 445020, Russia;

⁴GE Healthcare; 10 Presnenskaya naberezhnaya, Moscow 123112, Russia

Background. The incidence of brain gliomas firmly occupies a leading position among all central nervous system tumors — 40–50 % of the cases detected, more than half of them are glioblastoma. Existing cell lines and cultivation methods do not reflect all the features of

the three-dimensional (3D) organization of native glioblastoma. The use of temozolomide leads to the development of drug resistance and acute relapse, followed by a poor clinical outcome. The development of resistance is largely associated with the presence of tumor stem cells in the population and intratumoral heterogeneity. Obtaining 3D cultures from the primary material will allow us to save the stem cell pool and tumor-specific features.

The study objective. Get a 3D model based on primary cell cultures, which allows you to save a heterogeneous population and the original phenotype of tumor cells.

Materials and methods. We used U-87MG human glioma cells and GBM002 primary cell culture obtained from surgical material with a confirmed diagnosis of glioblastoma. Neurospheres were obtained from cell lines, the growth of which was monitored using the InCell Analyzer 6000 automatic cell analysis system. Flow cytometry was used to determine the CD133+ cell content. The expression of the receptor tyrosine kinases VEGFR1, VEGFR2 (endothelial growth factor type 1 and 2 receptors), FGFR2 (fibroblast growth factor receptor type 2) and the hypoxia marker HIF-1 α (hypoxia inducible factor, 1 α) in the neurospheres was evaluated using confocal microscopy.

Results. GBM002 glioblastoma cells isolated from the surgical material formed neurospheres, while the number of CD133+ cells increased from 1–2 to 16–19 % compared with two-dimensional cultures. During long-term cultivation of cells with non-cytotoxic doses of temozolomide, it was found that such cells form smaller neurospheres compared to control cells. It was shown that the expression of receptor tyrosine kinases during cultivation of GBM002 glioblastoma cells in neurospheres differs from that in two-dimensional cultures. We found that in neurospheres, the expression of FGFR2 and VEGFR1, is significantly increased.

Conclusion. 3D cultivation of primary cultures allows one to obtain a more heterogeneous population of tumor cells that reflects the spatial heterogeneity of cells, increase the pool of stem cells and recreate hypoxia conditions inside the brain micro-tumors.

Key words: glioblastoma, 3D culture, receptor tyrosine kinases, temozolomide

For citation: Khochenkova Yu.A., Dyrda I.G., Machkova Yu.S. et al. New approaches in 3D modeling of *in vitro* growth of primary cultures of malignant gliomas. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2019;6(4):69–74. (In Russ.).

ВВЕДЕНИЕ

Глиобластома является высокоагрессивной и резистентной опухолью центральной нервной системы [1]. Несмотря на улучшения в хирургической технике и значительный прогресс в разработке различных схем химио- и лучевой терапии, медиана общей выживаемости после лечения все еще составляет около 15 мес, половину этого времени пациенты живут с прогрессирующим заболеванием [2]. Данная опухоль неоднородна по своей природе и представляет собой гетерогенную клеточную популяцию с различными биологическими свойствами и типами генетических изменений [3], что усложняет задачу по созданию доклинической модели, достоверно повторяющей соответствующие аспекты биологии глиобластомы в условиях *in vitro*.

До настоящего времени стандартные протоколы доклинических испытаний противоопухолевых лекарств в значительной степени основывались на двухмерных (2D) клеточных моделях *in vitro* или исследованиях на животных *in vivo*. Тем не менее в большинстве случаев данные, полученные на 2D-культурах, не отражают в полной мере гетерогенности опухолевого микроокружения и фенотипа родительской опухоли, из которой была получена клеточная культура. В то же время исследования на животных в силу межвидовых различий не в состоянии полностью воспроизвести возможную реакцию на лекарства у людей.

На сегодняшний день представляется актуальным применение новых методик трехмерного (3D) культивирования для поддержания первичной родительской культуры глиобластомы *in vitro*, так как эта техника обеспечивает благоприятную среду и микроокружение для роста и длительного сохранения исходного фенотипа опухоли. Было показано, что опухолевые

сфероиды более точно воспроизводят пространственную организацию, градиенты питательных веществ и способны образовывать межклеточные взаимодействия. Использование 3D-модели позволяет нам поддерживать смешанные гетерогенные популяции клеток, включая пул стволовых опухолевых клеток, что в значительной мере сопоставимо с картиной, происходящей в организме [4]. Биологические 3D-сфероиды из опухолевых клеток могут служить промежуточными системами между традиционными 2D-культурами клеток и моделями опухолей *in vivo*.

Цель исследования — изучение фенотипических характеристик первичных клеток глиобластомы человека, полученных из операционного материала, проявляющихся при культивировании в 3D-многоклеточных сфероидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. В работе использовалась клеточная линия человеческой глиомы U-87MG (ATCC® HTB-14™, США), культивировалась согласно рекомендациям на полной питательной среде EMEM (Gibco, Великобритания), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Клеточная культура GBM002 с гистологически подтвержденным диагнозом глиобластомы была получена из операционного материала (ГКБ им. С.П. Боткина ДЗМ). Клетки культивировали на полной питательной среде DMEM/F12 (Gibco, Великобритания), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), с добавлением 2 мМ/мл глутамина, 50 мг/мл пенициллин-стрептомицина (Gibco, Великобритания) при температуре 37 °C в атмосфере 5 % CO₂.

Для роста в 3D-культуре клетки культивировали в бессывороточной среде с добавлением 10 мл добавки

B-27 (Invitrogen, Великобритания) в присутствии 20 нг/мл основного фактора роста фибробластов (bFGF) и 20 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF) (Becton Dickinson, США).

Формирование нейросфер из клеток глиобластомы.

Клетки глиобластомы диссоциировали в суспензию отдельных клеток с использованием TripleSelect (Gibco, Великобритания), отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS) и ресуспендировали в питательной среде. Для формирования сфероидов клетки (1×10^3 клеток на лунку) высаживали на 96-луночные сфероидальные микропланшеты (Corning, США) и инкубировали при температуре 37 °C в атмосфере 5 % CO₂ в течение 9 сут. Замену среды проводили через каждые 3 сут, рост сфероидов контролировали с помощью автоматической системы для клеточного анализа InCell Analyzer 6000 с системой поддержки роста живых клеток InCell Analyzer Live Cell Package C (GE Healthcare).

Изучение пролиферативной активности клеток глиобластомы. Клетки (8×10^3 клеток на лунку) вносили в 96-луночный планшет в полной среде. Через 24 ч добавляли к клеткам темозоломид (Sigma-Aldrich, Германия) в диапазоне концентраций от 5 до 1500 мкМ в трехкратных повторях. Инкубацию проводили в течение 48 ч, затем добавляли в каждую лунку по 20 мкл раствора МТТ (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5 дифенил тетразолия бромид (Sigma-Aldrich, Германия)) в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Клетки инкубировали еще 4 ч, затем среду отбирали и добавляли к ним по 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). Оптическую плотность раствора формазана определяли на спектрофотометрическом анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific, США) при 570 нм, используя ДМСО как нулевой контроль. Для препарата строили график зависимости «доза—эффект» и определяли IC₅₀.

Определение количества клеток CD133+. Для проведения анализа клетки первичной линии GBM002 и U-87MG (2×10^5 клеток на лунку) высевали на 6-луночные планшеты в среде для роста стволового потенциала с добавлением EGF и FGF и культивировали 14 сут для формирования нейросфер. После инкубации клетки были дезинтегрированы до моноклеточной суспензии с помощью трипсина (Sigma-Aldrich, Германия) и подготовлены для проведения исследования экспрессии поверхностного маркера CD133. В качестве клеток сравнения брали клетки линии GBM002 и U-87MG, растущие в 2D-культуре. Клетки окрашивали на клеточный маркер CD133 с помощью антител, меченых VioBright FITC (Myltenyi, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Для исключения из анализа поврежденных клеток в образцы добавляли 2 мкг/мл йодида пропидия. К контрольным клеткам добавляли изотипический контроль, меченый AlexaFluor 488 (Invitrogen, США). Анализ проводили на проточном цитометре Novocyt 2000R (ACEA Biosciences), собирая 3×10^4 событий в анализируемый

гейт. Изучение экспрессии CD133 на поверхности клеток проводили путем установки маркера по отношению к изотипическому контролю, меченному AlexaFluor 488 (Invitrogen, США).

Изучение формирования сфероидов под действием темозоломида. Для анализа клетки первичной линии GBM002 и U-87MG (2×10^5 клеток на лунку) высевали на 6-луночные планшеты в среде для роста стволового потенциала с добавлением EGF и FGF и культивировали 9 сут для формирования нейросфер. После этого клетки были разделены на 2 группы: контрольную и с добавлением 50 мкМ темозоломида (замену среды проводили каждые 2 сут). В контрольные клетки добавляли аналогичную концентрацию ДМСО. После 7-дневной инкубации с темозоломидом клетки были окрашены с помощью Hoechst 33258 (ПанЭко, Россия). Стекла заключали под покровное стекло с использованием полимерной флуоресцентной монтажной среды (Dako, Дания) и изучали образовавшиеся нейросферы с помощью автоматической системы для клеточного анализа InCell Analyzer 6000 при увеличении 20 и программного обеспечения InCell Investigator (GE Healthcare).

Фиксация и иммунофлуоресцентное окрашивание сфероидов и клеток. Для проведения анализа экспрессии поверхностных маркеров на клетках глиобластомы фиксировали сфероиды *in situ* с использованием 10 % нейтрального забуференного формалина с последующей промывкой в PBS для удаления фиксатора. Для окрашивания сфероидов обрабатывали их метанолом с последующим добавлением 20 % ДМСО/метанола для улучшения проникновения антител, а затем инкубировали в 10 % BSA. Сфероиды окрашивали первичными антителами к рецепторам эндотелиального фактора роста 1-го и 2-го типов (VEGFR1, VEGFR2), фактора роста фибробластов 2-го типа (FGFR2) и фактору, индуцируемого гипоксией, 1α (HIF-1α) (Santa Cruz Biotechnology, США) при температуре 4 °C в течение 18 ч. Далее сфероиды промывали в PBS, последовательно обрабатывали конъюгатом антивидовых IgG с флуорофором AlexaFluor 488 (Life Technologies, США) и докрашивали ядра Hoechst 33258 (ПанЭко, Россия). Стекла заключали под покровное стекло с помощью полимерной флуоресцентной монтажной среды (Dako, Дания). Аналогично окрашивали клетки глиобластомы, культивировавшиеся в 2D-культуре. Стекла анализировали с помощью автоматической системы для клеточного анализа InCell Analyzer 6000 при увеличении 20 и программного обеспечения InCell Investigator (GE Healthcare).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки роста клеток первичной глиобластомы мы провели исследование с помощью автоматической системы для клеточного анализа InCell Analyzer 6000 с системой поддержки роста живых клеток InCell

Analyzer Live Cell Package C (GE Healthcare) в течение 9 сут после внесения клеток на поверхность планшета при температуре 37 °C (рис. 1).

Согласно полученным данным клетки первичной глиобластомы GBM002, выделенные из операционного материала, образуют нейросферы (см. рис. 1). После сборки 3D-модельной системы клетки глиобластомы GBM002 сохраняли способность к росту в 2D-культурах и образованию нейросфер. Клетки линии U-87MG при культивировании в 3D-модели также образовывали нейросферы. Это указывает на то, что культивирование в 3D-модели может влиять на популяцию стволовых клеток с образованием нейросфер. Исследование 3D-культуры с помощью автоматической системы для клеточного анализа InCell Analyzer 6000 с системой поддержки роста живых клеток InCell Analyzer Live Cell Package C (GE Healthcare) позволяет проводить динамический контроль изменений нейросфер при сохранении условий культивирования. Определение количества стволовых опухолевых клеток CD133+ при культивировании в 2D- и 3D-культурах было выполнено с использованием проточной цитометрии (рис. 2).

При культивировании клеток U-87MG в 2D-клеточных культурах количество клеток CD133+ не превышает 2 %, как было показано ранее [5, 6]. После культивирования клеток глиобластомы в 3D-культурах количество клеток CD133+ увеличивается до 19,22 % для клеток GBM002 и до 16,38 % для клеток линии U-87MG (см. рис. 2).

Для определения влияния темозоломида на рост клеток глиобластомы GBM002 мы проводили культивирование нейросфер в присутствии данного препарата (Sigma, Германия) в субцитотоксических концентрациях, затем дезинтегрировали их, наносили полученную суспензию клеток на 8-луночные культуральные стекла (BD Biosciences) и культивировали в течение 3 сут. Полученные нейросферы были окрашены с помощью Hoechst 33258 (ПанЭко, Россия) и были исследованы с использованием автоматической системы для клеточного анализа InCell Analyzer 6000 (GE Healthcare), результаты представлены на рис. 3.

Согласно полученным данным клетки глиобластомы GBM002, которые длительно культивировали в присутствии нецитотоксических концентраций

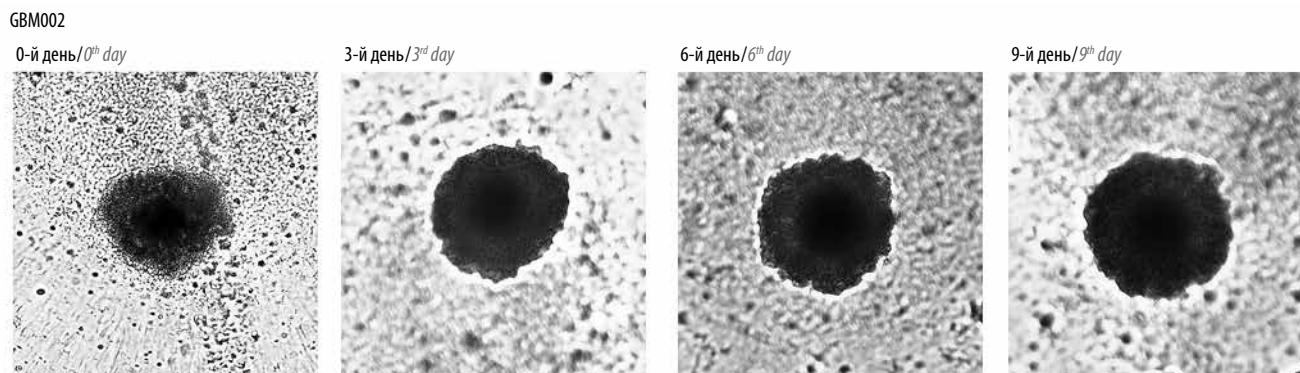


Рис. 1. Образование сфероидов из первичных клеток глиобластомы человека GBM002 на 0–9-е сутки культивирования

Fig. 1. The formation of spheroids from primary cells of human glioblastoma GBM002 on 0–9 days of cultivation

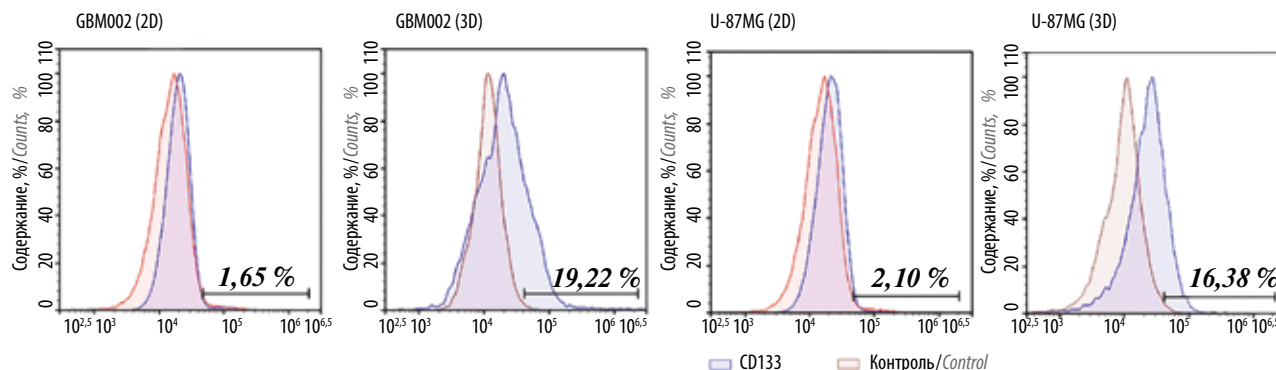


Рис. 2. Сравнение содержания клеток CD133+ при культивировании клеток GBM002 и U-87MG в нейросферах и двухмерных (2D) культурах на 14-й день культивирования. Маркер установлен по отношению к контрольному образцу с изотипическим контролем, меченным AlexaFluor 488

Fig. 2. Comparison of CD133+ cell content in GBM002 and U-87MG cells cultured in neurospheres and 2D-cultures on day 14 of cultivation. The marker is set in relation to the control sample with isotypic control labeled AlexaFluor 488

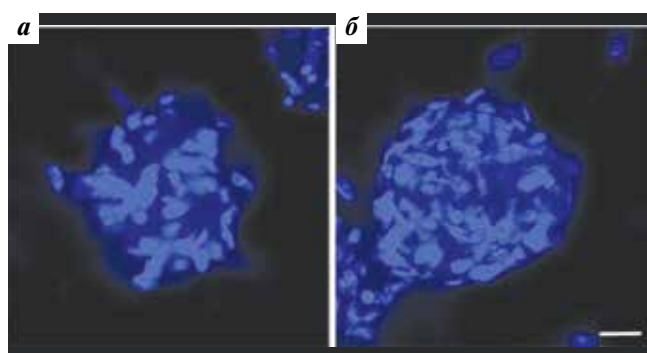


Рис. 3. Образование сфероидов из клеток глиобластомы GBM002 под действием темозоломида (а) и контрольные нейросферы (б). Масштаб 50 мкм

Fig. 3. The formation of spheroids from GBM002 glioblastoma cells under the influence of temozolomide (a) and control neurospheres (b). Scalebar 50 μ m

темозоломида, образуют нейросферы меньших плотности и размера по сравнению с нейросферами, образованными контрольными клетками глиобластомы GBM002.

Для оценки экспрессии поверхностных рецепторных тирозинкиназ VEGFR1, VEGFR2, FGFR2, а также HIF-1 α при росте клеток глиобластомы GBM002 в нейросферах мы проводили окрашивание образованных сфероидов с помощью антител к VEGFR1, VEGFR2, FGFR2, HIF-1 α и вторичных антител, конъюгированных с флуорофором AlexaFluor 488 (Life Technologies, США) и Hoechst 33258 (ПанЭко,

Россия) для окраски ядер. Серию микрофотографий экспрессии исследуемых биомаркеров получали с помощью InCell Analyzer 6000 (GE Healthcare) (рис. 4).

Было показано, что экспрессия рецепторных тирозинкиназ при культивировании клеток глиобластомы GBM002 в нейросферах отличается от таковой в 2D-культурах. Установлено, что в нейросферах в значительной степени увеличивается экспрессия FGFR2 и VEGFR1. В то же время экспрессия VEGFR2 снижалась по сравнению с клетками, культивировавшимися в плоских культурах. Экспрессия HIF-1 α увеличивалась на клетках внутри нейросферы, но отсутствовала на поверхности, что свидетельствует об увеличении уровня гипоксии внутри сфероида. Клетки глиобластомы GBM002 в культуре не экспрессируют данный маркер.

Таким образом, при культивировании клеток в нейросферах они изменяют экспрессию ряда рецепторных тирозинкиназ, увеличивают количество клеток CD133+ и повышают экспрессию HIF-1 α внутри сфероида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение системы 3D-культур клеток позволяет получать более гетерогенную популяцию опухолевых клеток, отражающую пространственную неоднородность клеток, повышать пул стволовых клеток и воссоздавать условия гипоксии внутри микроопухолей головного мозга.

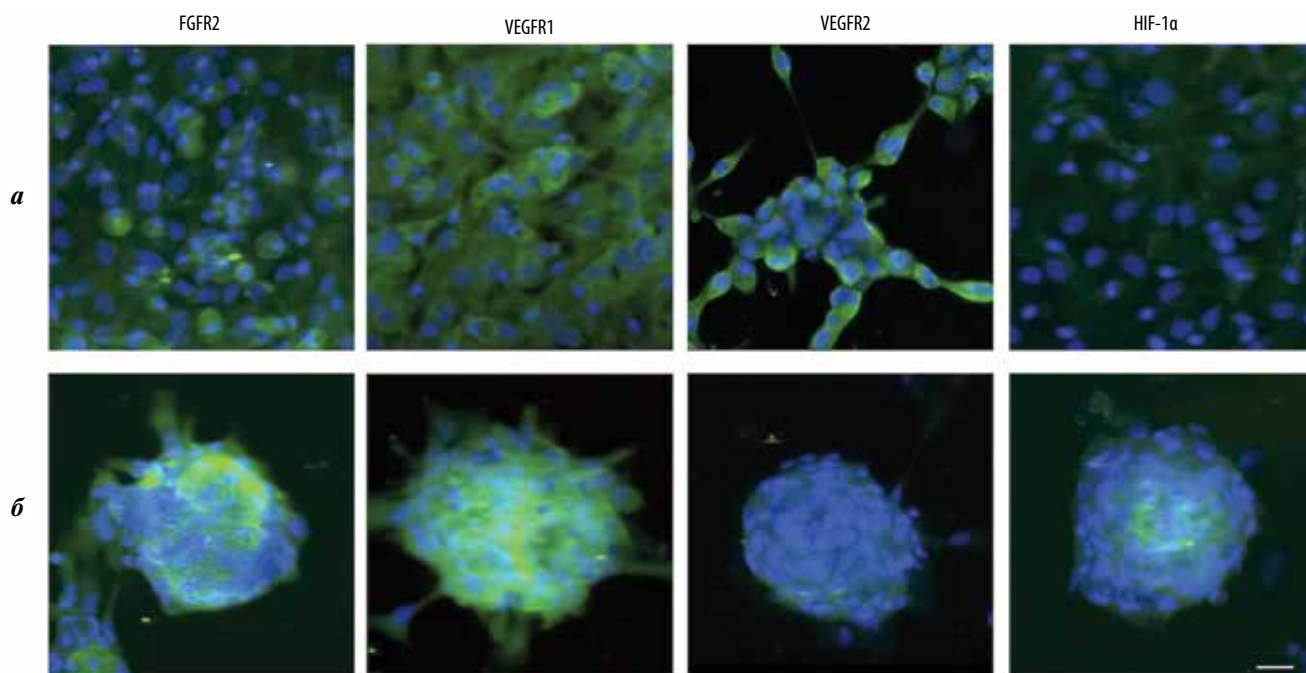


Рис. 4. Экспрессия рецепторных тирозинкиназ и фактора, индуцируемого гипоксией, 1 α (HIF-1 α) на клетках, культивировавшихся в двухмерных культурах (а) и нейросферах (б) глиобластомы GBM002. Масштаб 50 мкм

Fig. 4. Expression of receptor tyrosine kinases and hypoxia inducible factor, 1 α (HIF-1 α) on cells cultured in two-dimensional cultures (a) and neurospheres (b) of GBM002 glioblastoma. Scalebar 50 μ m

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

1. Zong H., Verhaak R.G.W., Canoll P. The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. *Expert Rev Mol Diagn* 2012;4(12):383–94. DOI: 10.1586/erm.12.30.
2. Venur V.A., Peereboom D.M., Ahluwalia M.S. Current medical treatment of glioblastoma. *Cancer Treat Res* 2015;(163):103–15. DOI: 10.1007/978-3-319-12048-5_7.
3. Morokoff A., Ng W., Gogos A., Kaye A.H. Molecular subtypes, stem cells and heterogeneity: Implications for personalised therapy in glioma. *J Clin Neurosci* 2015;8(22):1219–26. DOI: 10.1016/j.jocn.2015.02.008.
4. Bez A., Corsini E., Curti D. et al. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res* 2003;1–2(993):18–29. DOI: 10.1016/j.brainres.2003.08.061.
5. Kahlert U.D., Koch K., Suwala A.K. et al. The effect of neurosphere culture conditions on the cellular metabolism of glioma cells. *Folia Neuropathol* 2015;3(53):219–25. DOI: 10.5114/fn.2015.54422.
6. Platet N., Liu S.Y., Atifi M.E. et al. Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. *Cancer Lett* 2007;258(2):286–90. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.09.012.

Вклад авторов

Ю.А. Хоченкова, Ю.С. Мачкова: получение и поддержание первичных опухолевых культур, формирование нейросфер, написание текста рукописи;

И.Г. Дырда: получение операционного материала для исследований, верификация диагноза;

Э.Ш. Соломко, Т.С. Сидорова: изучение экспрессии маркеров методом проточной цитометрии, иммунофлуоресцентная окраска клеток;

Д.А. Хоченков, Е.А. Авилова: конфокальная микроскопия, разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

Yu.A. Khochenkova, Yu.S. Machkova: receiving and maintaining primary tumor cultures, forming neurospheres, writing manuscript text;

I.G. Dyrd: obtaining operational material for research, verification of the diagnosis;

E.Sh. Solomko, T.S. Sidorova: study of marker expression by flow cytometry, immunofluorescence staining of cells;

D.A. Khochenkov, E.A. Avilova: confocal microscopy, development of research design.

ORCID авторов/ORCID of authors

Ю.А. Хоченкова/Yu.A. Khochenkova: <https://orcid.org/0000-0001-8392-5495>

Ю.С. Мачкова/Yu.S. Machkova: <https://orcid.org/0000-0002-1138-8827>

Э.Ш. Соломко/E.Sh. Solomko: <https://orcid.org/0000-0002-8070-4707>

Д.А. Хоченков/D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке компании GE Healthcare Life Sciences.

Financing. The study was performed with the support of GE Healthcare Life Sciences.

Статья поступила: 14.11.2019. Принята к публикации: 19.11.2019.

Article submitted: 14.11.2019. Accepted for publication: 19.11.2019.

