

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Жидкостная биопсия в диагностике
и лечении опухолей невыявленной
первичной локализации*

*Иматиниб как потенциальный
корректор пневмофиброза COVID-19*

*Молекулярно-биологические подтипы
рака молочной железы у носителей
мутаций BRCA1*

*Исследование цитостатической
и цитотоксической активности
пептидных ингибиторов CDK4/6*

ТОМ 7 № 4
2020



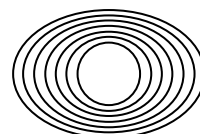
Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук.

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.

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

ТОМ 7
4'20

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 Е.В. Селиверстова
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук*

*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)*

**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.
2020. Том 7. № 4. 1–52.
Сдано в печать: 00.12.2020.
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2020

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562
Отпечатано в типографии
ООО «БУКИ ВЕДИ» 117246,
Москва, Научный проезд 19, этаж 2,
приложение 6Д, офис 202.
Тираж 1000 экз. Бесплатно.

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 Наталья 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)

Кжышковская 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 им. 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)

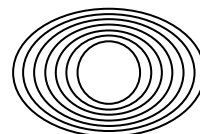
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

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. 7
'20

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 E.V. Seliverstova
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

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
(PII No. Φ C77-57560
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.
2020. Vol. 7 No. 4. 1–52.

Submitted: 00.12.2020.

© PH "ABV-Press", 2020
Pressa Rossii catalogue index: 93562

Printed at the BUKI VEDI LLC.
19, Nauchniy Proezd, floor 2, app. 6D,
office 202, Moscow, 117246.

1000 copies.

Free distribution.

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 City of the Ministry of Health of Russia (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)

Juriscic 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»),
- одобрение протокола исследования комитетом по биоэтике (с указанием номера и даты протокола),
- 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 подписными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т. д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подписной подписи. Подписи к рисункам даются на 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.

ПАМЯТНЫЕ ДАТЫ

К 80-летию Фёдора Львовича Киселёва, члена-корреспондента РАН	8
---	---

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

<i>И.Б. Кононенко, М.Г. Филиппова, А.В. Снеговой, С.Л. Гуторов</i> Перспектива использования жидкостной биопсии в диагностике и лечении опухолей невыявленной первичной локализации.	10
<i>И.Н. Михайлова, Е.М. Трещалина, И.Ж. Шубина, И.В. Манина, М.В. Киселевский, А.Н. Лукашев</i> Противоопухолевый ингибитор протеинтирозинкиназ иматиниб как потенциальный корректор пневмофиброза COVID-19	20

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>Н.И. Поспехова, Д.А. Головина, М.Г. Филиппова, А.В. Семьянихина, С.Л. Дранко, А.М. Данишевич, А.М. Строганова</i> Молекулярно-биологические подтипы рака молочной железы у носителей мутаций в гене <i>BRCA1</i>	29
<i>В.К. Боженко, Т.М. Кулинич, Е.А. Кудинова, А.В. Иванов, А.М. Шишкин, В.А. Солодкий</i> Исследование цитостатических и цитотоксических свойств модифицированных пептидных ингибиторов CDK4/6, функциональных аналогов p16INK4a (90-97)	37

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

<i>А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, М.Е. Аксельрод, С.А. Галецкий, Е.М. Чевкина</i> Влияние экспрессии CRABP1 на пролиферацию и чувствительность к ретиноевой кислоте клеток рака молочной железы различного происхождения.	46
---	-----------

MEMORABLE DATES

Celebrating the 80 th birthday of Fyodor Lvovich Kiselyov, corresponding member of the Russian Academy of Sciences	8
---	---

REVIEWS

I.B. Kononenko, M.G. Filippova, A.V. Snegovoy, S.L. Gutorov

The prospect of using liquid biopsy in diagnosis and treatment strategy in patients with carcinomas of unknown primary	10
---	-----------

I.N. Mikhaylova, H.M. Treshalina, I.Zh. Shubina, I.V. Manina, M.V. Kiselevsky, A.N. Lukashev

Antitumor proteinkinase inhibitor imatinib may be regarded as a potential correcting agent for COVID-19 associated pulmonary fibrosis.....	20
---	-----------

EXPERIMENTAL REPORTS

N.I. Pospekhova, D.A. Golovina, M.G. Filippova, A.V. Semyanikhina, S.L. Dranko, A.M. Danishevich, A.M. Stroganova

Molecular biological subtypes of breast cancer in <i>BRCA1</i> mutation carriers.....	29
--	-----------

V.K. Bozhenko, T.M. Kulinich, E.A. Kudinova, A.V. Ivanov, A.M. Shishkin, V.A. Solodkiy

Study of cytostatic and cytotoxic characteristics of modified peptide CDK4/6 inhibitors – functional analogs of p16INK4a (90-97).....	37
--	-----------

SHORT REPORT

A.D. Enikeev, A.V. Komelkov, M.E. Axelrod, S.A. Galetsky, E.M. Tchevkina

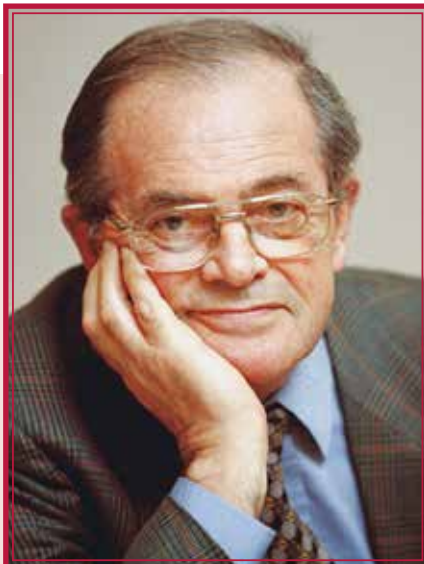
Effect of CRABP1 expression on the proliferation and the sensitivity to retinoic acid of breast cancer cells of different origin	46
---	-----------

К 80-летию Фёдора Львовича Киселёва, члена-корреспондента РАН

Фёдор Львович Киселёв родился 28 декабря 1940 г. в г. Москве, в семье выдающегося советского ученого Льва Александровича Зильбера и искусствоведа Валерии Петровны Киселёвой. Во время его рождения отец был узником ГУЛАГа, а в декабре 1941 г. вместе со старшим братом и мамой Фёдор Львович сам оказался узником немецких рабочих лагерей.

После счастливого освобождения всех членов семьи Фёдор Львович жил, учился и работал в г. Москве. По окончании биолого-химического факультета Московского государственного педагогического университета (современное название) в 1963–1966 гг. он проходил аспирантуру в лаборатории биохимии Института вирусологии им. Д.И. Ивановского под руководством Томаса Иосифовича Тихоненко, а затем работал в этом же институте до 1975 г. В этот период становления молекулярной вирусологии Фёдор Львович принимал участие в пионерских для тех времен работах по выяснению первичной и вторичной структур нуклеиновых кислот бактериофагов и инфекционных вирусов человека, защитил кандидатскую (1966 г.) и докторскую (1975 г.) диссертации.

На рубеже 60-х и 70-х годов прошлого века научный интерес Фёдора Львовича сместился в сторону онкогенных вирусов и их возможной роли в этиологии опухолей человека. К этому времени были открыты новые онковirusы млекопитающих (в том числе вирусы лейкозов) и первый онкогенный вирус человека (вирус Эпштейна–Барр). Накопленные экспериментальные данные о ДНК- и РНК-содержащих онковирусах человека и животных были обобщены и рассмотрены в свете вирусогенетической теории возникновения опухолей, выдвинутой в 40-годах XX века Л.А. Зильбером в книге, написанной совместно с сотрудником Института эпидемиологии и микробио-



28.12.1940–04.02.2016

логии им. Н.Ф. Гамалеи д. б. н. И.С. Ирлиным («Эволюция вирусогенетической теории возникновения опухолей». М.: Наука, 1975). В этот период экспериментальные работы Фёдора Львовича посвящены исследованию молекулярно-биологических характеристик новых эндогенных и экзогенных онкорнавирусов хомячков, кур, крупного рогатого скота, приматов, поискам вирусов лейкоза человека.

Общительность, инициативность, высокая требовательность к точности экспериментального исследования, воспитанная в семье, и творческая атмосфера, царившая в лаборатории Т.И. Тихоненко, позволяли Фёдору Львовичу работать в сотрудничестве со многими ведущими в своей области научными институтами: Институтом эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Институтом кристаллографии им. Б.К. Вайнштейна, Институтом химической физики им. Н.Н. Семёнова, Институтом микробиологии и вирусологии им. Августа Кирхенштейна (Рига), Институтом экспериментальной патологии и терапии (Сухуми), Институтом онкологии им. Н.Н. Петрова.

В 1975 г. Фёдор Львович по приглашению Николая Петровича Мазуренко начинает

работу в лаборатории вирусного канцерогенеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (современное название), где ему была предоставлена возможность продолжить исследования, начатые в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского, и организовать группу молекулярной биологии вирусов. По инициативе Н.П. Мазуренко в 1979 г. была создана лаборатория молекулярной биологии вирусов, которой Фёдор Львович руководил до конца своей жизни, и которая существует в составе НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина и в настоящее время.

В 1970 г. в составе РНК-содержащего вируса саркомы Рауса была открыта обратная транскриптаза, способность которой синтезировать копию ДНК на матрице вирусной РНК (образование провируса) предполагала возможность механизма трансформации за счет интеграции вирусной и клеточной ДНК и для РНК-содержащих вирусов. В сочетании с открытой ранее способностью птичьего вируса саркомы Рауса вызывать новообразования у грызунов (Л.А. Зильбер, И.Н. Крюкова, 1957; Г.Я. Свет-Молдавский, А.С. Скоринова, 1957) эти исследования привели к получению моделей для изучения вирусного канцерогенеза. В 70-х и начале 80-х годов прошлого века во вновь созданной лаборатории были исследованы механизмы взаимодействия геномов онкогенного вируса и клетки на панели клеток грызунов, трансформированных вирусом саркомы Рауса. Работы проводили в сотрудничестве с лабораториями Яна Свободы (J. Svoboda, Institute of Molecular Genetics, Прага) и Марты Грофовой (M. Grófová, Cancer Research Institute, Братислава). Эти работы внесли вклад в подтверждение одного из постулатов вирусогенетической теории возникновения опухолей: «опухолевая конверсия клеток вызывается не вирусом, а его нуклеиновой кислотой, вирус является только носителем того фактора, который вызывает опухолевую конверсию». Исследования

свойств генома вируса саркомы Рауса были проведены в серии работ по введению клонированной ДНК провируса в оплодотворенные яйцеклетки *Drosophila melanogaster* (совместно с лабораторией К.Г. Газаряна, Институт молекулярной генетики, Москва). В этих работах было показано, что как полный геном вируса, так и его регуляторные последовательности (LTRs) способны интегрироваться в геном мух и вызывать наследуемые в поколениях мутации (Nature 1984; 311(5984):394–6). Эти работы свидетельствовали в пользу предположения об экзогенном происхождении эндогенных ретровирусов, широко представленных в геномах млекопитающих и человека, которые, по современным представлениям, участвуют в регуляции транскрипции, эмбриогенезе, эволюции и канцерогенезе.

С открытием во второй половине 70-х годов прошлого века вирусных онкогенов и их клеточных аналогов – протоонкогенов, которые при активации в результате мутаций и других процессов приобретают онкогенные свойства, Фёдор Львович инициирует серию исследований по экспрессии клеточных онкогенов в опухолях человека на уровне РНК и белков. С этой целью были созданы панель антител к белковым продуктам клеточных онкогенов и коллекция солидных опухолей человека различных локализаций и разных стадий опухолевой прогрессии. В результате этих работ было установлено отсутствие специфической связи активации экспрессии какого-либо клеточного онкогена с одним определенным типом опухоли, показана активация двух и более онкогенов в одной опухоли, продемонстрировано, что каждая опухоль характеризуется своим специфическим набором экспрессируемых онкогенов, выявлены группы онкогенов, часто (*myc*, *fos*, *H-ras*) и редко (*src*, *fps*, *mos*) активирующихся в солидных опухолях. Совместно с лабораторией противоопухолевого иммунитета НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Г.И. Дейчман и сотр.), Институтом биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича (Н.И. Соловьева и сотр.), госпиталем Сан Луи и Университетом Paris 6 (Париж, Франция) (соответственно R. Emanuel-Ravier и A. Tavitian)

на культурах клеток, трансформированных онкогенами *H-ras*, *N-ras* и вирусными онкогенами, были изучены онкогенассоциированные механизмы злокачественной трансформации.

В 1993–2016 гг. в лаборатории Фёдора Львовича проводились исследования опухолей, ассоциированных с вирусами папилломы человека (ВПЧ). В этот период проведено первое исследование по распространенности различных типов ВПЧ высокого канцерогенного риска в России при раке шейки матки (РШМ). При исследовании особенностей интеграции ДНК ВПЧ в геном клетки было установлено, что она не является обязательным условием трансформации клеток, как считалось ранее, и показано отсутствие сайт-специфичности интеграции ДНК ВПЧ. При поиске серологических маркеров РШМ было показано, что антитела к онкогенам ВПЧ 16-го и 18-го типов обнаруживаются лишь у 40 % пациентов с ВПЧ-положительными опухолями (не могут служить диагностическим маркером). Одним из главных направлений лаборатории был поиск генетических и эпигенетических маркеров РШМ. Исследуются метилирование генов-супрессоров опухолей, деметилирование повторяющихся последовательностей ДНК, экспрессия некодирующих РНК, нестабильность генома, клеточный белок p16INK4a как суррогатный маркер трансформации ВПЧ, теломераза как потенциальный маркер для ранней диагностики РШМ. Часть этих работ была проведена в сотрудничестве с Онкологическим центром Германии (DKFZ, Н. Zur Hausen), Упсальским университетом (Швеция, J. Ponten), Каролинским институтом (Швеция, E. Zbarovsky), Университетом Чикаго (L. Laimins), Институтом молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта (Л.Л. Киселёв, Т.В. Наседкина), Московским государственным университетом им. М.В. Ломоносова (О.А. Донцова и сотр.), Институтом общей генетики им. Н.И. Вавилова (Г.Е. Сулимова), Онкологическим центром им. Густава Русси (Франция, Y. Vassetzky) и в постоянном сотрудничестве со многими клиническими отделениями НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Благодаря постоянной нацеленности на поиск, установке на широкое научное общение, созданию творческой атмосферы в лаборатории, воспитанию самостоятельности у сотрудников, высоким требованиям к качеству экспериментов и самообразованию сотрудников Фёдор Львович создал собственную научную школу. Под его руководством защищено более 30 кандидатских и докторских диссертаций, из лаборатории вышли 6 ученых, возглавлявших в разное время научные подразделения НИИ канцерогенеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Многие молодые ученые нашей страны и из-за рубежа проходили стажировку в лаборатории. Сегодня ученики Фёдора Львовича Киселёва работают в ведущих научных институтах разных стран, в том числе в качестве руководителей научных исследований (М.Ф. Муровска, Институт микробиологии и вирусологии им. Августа Кирхенштейна (Рига); Ю.И. Кудрявец, Институт онкологии им. Р.Е. Кавецкого (Киев); А.Ю. Тараховский, Университет Рокфеллера (Нью-Йорк)).

Фёдор Львович активно участвовал в работе ученых советов НИИ канцерогенеза и НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, предлагая для обсуждения наиболее актуальные вопросы молекулярной онкологии. Острый и быстрый ум, доброжелательное отношение к исследованиям коллег, открытость и прямота суждений делали бесценными его рекомендации, прямые и четкие критические замечания, которые существенным образом способствовали повышению уровня проводимых в институте научных исследований. Благодаря его инициативе сотрудниками НИИ канцерогенеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина была организована ежегодная Всероссийская научная конференция по молекулярной онкологии.

Фёдор Львович Киселёв по праву считается одним из основоположников молекулярной онкологии в нашей стране.

Коллектив сотрудников НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Перспектива использования жидкостной биопсии в диагностике и лечении опухолей невыявленной первичной локализации

И.Б. Кононенко, М.Г. Филиппова, А.В. Снеговой, С.Л. Гуторов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23

Контакты: Маргарита Геннадьевна Филиппова fimargarita@yandex.ru

Введение. Поиск и использование новых молекулярных прогностических и предиктивных маркеров, выявляемых методом жидкостной биопсии, направлены на определение молекулярно-биологических особенностей опухолей невыявленной первичной локализации (ОНПЛ), что должно способствовать более активному внедрению персонализированного подхода в терапии злокачественных новообразований и улучшению результатов лечения. Обзор посвящен системному анализу достижений в научных и клинических исследованиях по данной тематике.

Материалы и методы. В целях оценки современного состояния проблемы были осуществлены поиск и анализ актуальных данных по научным базам PubMed, Medline, РИНЦ и др.

Результаты. Представлено научное обоснование использования в клинической практике жидкостной биопсии для совершенствования лечения пациентов с ОНПЛ. Приведены результаты применения современных подходов к анализу образцов жидкостной биопсии при ОНПЛ. В частности, рассмотрены особенности использования в анализе циркулирующей свободной ДНК, циркулирующей опухолевой ДНК, циркулирующих опухолевых клеток. Обсуждены современные возможности определения тканевой специфичности с использованием жидкостной биопсии при ОНПЛ. Определены перспективы развития жидкостной биопсии для совершенствования диагностики, оценки прогноза заболевания, выбора стратегии лечения ОНПЛ.

Заключение. Обзор литературы подтверждает, что современные методы молекулярного профилирования опухолевых клеток, полученных как при жидкостной биопсии, так и в результате биопсии ткани, вносят значимый вклад в определение тканевой специфичности, молекулярных характеристик ОНПЛ для персонализированного подхода в целях совершенствования стратегии и улучшения результатов лечения пациентов с ОНПЛ.

Ключевые слова: опухоль невыявленной первичной локализации, жидкостная биопсия, циркулирующие опухолевые клетки, молекулярное профилирование, экспрессия генов, таргетная терапия

Для цитирования: Кононенко И.Б., Филиппова М.Г., Снеговой А.В., Гуторов С.Л. Перспектива использования жидкостной биопсии в диагностике и лечении опухолей невыявленной первичной локализации. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(4):10–9.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-4-10-19



The prospect of using liquid biopsy in diagnosis and treatment strategy in patients with carcinomas of unknown primary

I.B. Kononenko, M.G. Filippova, A.V. Snegovoy, S.L. Gutorov

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

Background. The search and use of new molecular prognostic and predictive markers of efficacy detected by liquid biopsy are aimed at understanding the biology of Carcinomas of Unknown Primary (CUP) and improving results of patient treatment. The review is devoted to advances in scientific and clinical research on this issue.

Materials and methods. In order to assess the current state of the problem, a search and analysis of relevant data of the scientific databases PubMed, Medline, RISC was carried out.

Results. The scientific rationale for the use of liquid biopsy in clinical practice to improve the treatment of cancer patients with CUP is presented. The results of the use of modern approaches to the analysis of fluid biopsy samples in CUP are presented. In particular, the features of using circulating free DNA, circulating tumor DNA, circulating tumor cells in the analysis are considered. The modern possibilities of determining tissue specificity using liquid biopsy in CUP are discussed. The prospects for the development of liquid biopsy for improving diagnostics, determining the prognosis of the disease, and choosing a strategy for treating CUP and the treatment monitoring have been determined.

Conclusion. A review of the literature confirms that modern methods of molecular profiling of tumor cells obtained both as a result of liquid biopsy and tissue biopsies will make a significant contribution to the determination of tissue specificity, molecular characteristics of CUP for a personalized approach in order to improve strategies and treatment outcomes for patients with CUP.

Key words: *carcinomas of unknown primary, liquid biopsy, circulating tumor cells, molecular profiling, gene expression, targeted therapy*

For citation: Kononenko I.B., Filippova M.G., Snegovoy A.V., Gutorov S.L. The prospect of using liquid biopsy in diagnosis and treatment strategy in patients with carcinomas of unknown primary. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2020;7(4): 10–9. (In Russ.).

Введение

Опухоли невыявленной первичной локализации (ОНПЛ) — заболевание, проявляющееся метастатическим процессом, при котором первичный очаг невозможно установить ни на основании анамнеза, ни по результатам стандартных диагностических обследований [1]. По данным литературы, ОНПЛ занимают 7-е место по частоте встречаемости и 4-е место в структуре смертности среди всех злокачественных новообразований [2, 3]. Пациенты с ОНПЛ составляют от 3 до 5 % среди онкологических больных [4, 5]. У мужчин и женщин ОНПЛ встречаются приблизительно с одинаковой частотой и имеют прямую корреляцию с увеличением возраста, достигая максимума к 65 годам [6, 7].

Выявление определенных молекулярных характеристик в биологических жидкостях пациентов с ОНПЛ, свидетельствующих об определенном тканевом происхождении опухоли, должно способствовать улучшению диагностики первичного очага. Однако в настоящее время не разработана доказательная научная база для использования молекулярного профилирования опухоли на основании жидкостной биопсии и не существует стандартов для его применения в практике.

В обзоре приведен анализ данных по потенциальной эффективности жидкостной биопсии при ОНПЛ. Информативность этого метода продемонстрирована при многих злокачественных опухолях. Использование жидкостной биопсии позволяет не только идентифицировать генотип опухоли и индивидуализировать лечение, но и предсказать его эффективность.

Основные подходы в лечении онкологических заболеваний опираются на 2 принципа, оба из которых тесно связаны с концепцией «первичной опухоли». Первый заключается в необходимости диагностики первичной опухоли до появления метастазов в других органах. После выполнения радикального хирургического лечения в большинстве случаев пациенты получают дополнительное локальное и/или системное лечение в целях профилактики метастазирования. Второй принцип заключается в том, что локализация первичной опухоли или ее тканевое происхождение является ключевым фактором, определяющим выбор стратегии дальнейшей химиотерапии. В результате использования этих 2 принципов достигнут существенный прогресс в терапии целого ряда онкологических заболеваний и наблюдается постоянное снижение смертности от злокачественных новообразований.

Достижения последних 2 десятилетий в химиотерапии онкологических заболеваний связаны прежде

всего с появлением биологически направленной, так называемой таргетной терапии, которая позволила существенно увеличить продолжительность жизни пациентов при раке молочной железы, легкого, толстой кишки, предстательной железы и меланоме. Несмотря на заметные успехи в химиотерапии, достигнутые благодаря таргетной терапии и иммунотерапии, лечение метастатических форм заболеваний в большинстве случаев остается исключительно сложной задачей.

В настоящее время выбор стратегии химиотерапии ОНПЛ зависит от клинических проявлений. Из-за гетерогенности группы ОНПЛ отсутствует единое мнение по вопросам выбора «оптимальных» схем лечения, включая таргетную терапию и/или иммунотерапию, а также использования прогностических и предиктивных маркеров. Представленный обзор освещает текущие достижения по выявлению маркеров тканевой специфичности (ТС) и ряда молекулярных характеристик ОНПЛ, а также по развитию персонализированного подхода в целях совершенствования стратегии и улучшения результатов лечения больных.

Ограничения диагностических возможностей биопсий при опухолях невыявленной первичной локализации

Отсутствие международного консенсуса по определению и классификации ОНПЛ, а также их значительная гетерогенность ограничивают возможности исследований. В настоящее время «золотым стандартом» диагностики злокачественного новообразования и определения режима лечения онкологического заболевания является биопсия первичной опухоли. Однако при ОНПЛ существуют объективные ограничения как при получении образцов опухолевой ткани, так и при интерпретации результатов биопсий, позволяющих, как правило, получить малое количество материала. Также часто отсутствует уверенность, что полученный образец может в полной мере характеризовать весь молекулярный «ландшафт» опухоли [8]. Показано, что в пределах практически всех известных типов опухолей существуют как внутриопухолевая гетерогенность, так и клональные и субклональные вариации в ткани опухоли и метастазов больного [9].

Биоптаты тканей, взятые из отдельных метастатических образований, с меньшей вероятностью определяют происхождение опухоли с помощью иммуногистохимического анализа, чем таковые, взятые из первичной опухоли [10]. Однако биопсия опухоли является инвазивным методом диагностики, в ряде случаев трудно выполнимым и небезопасным для пациента и в рутинной практике обычно выполняется

только один раз для постановки диагноза. На фоне лекарственной терапии изменяется чувствительность опухолевых клеток к препаратам и формируются резистентные клоны опухолевых клеток, что требует повторного, иногда неоднократного, исследования опухоли для коррекции лечения. Для преодоления перечисленных ограничений в последние годы активно разрабатываются и внедряются в практику неинвазивные методы жидкостной биопсии.

Применение жидкостной биопсии при опухолях невыявленной первичной локализации

С момента установления факта присутствия опухолевого генетического материала в кровотоке возможность использования жидкостной биопсии для выявления клинически значимых биомаркеров опухоли приобрела большой исследовательский интерес [11]. Жидкостная биопсия имеет ряд преимуществ перед биопсией опухоли. В частности, она менее инвазивна, что упрощает получение необходимого количества образцов. В то же время жидкостная биопсия обладает потенциалом в плане совершенствования скрининга, диагностики, выбора стратегии лечения и мониторинга проводимой терапии. Прогресс в технологиях геномного анализа позволил обнаруживать малое количество генетического материала опухоли в крови, что повысило как чувствительность, так и специфичность проводимых анализов. Биомаркеры опухоли, получаемые из крови, включают циркулирующую опухолевую ДНК (цОДНК), опухолевые микроРНК, матричные РНК (мРНК) из опухолеассоциированных тромбоцитов, циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) с последующим анализом в них экспрессии ДНК, РНК и белка [11, 12].

Циркулирующая свободная ДНК и циркулирующая опухолевая ДНК

В множестве последних работ по жидкостной биопсии показана ее клиническая значимость для обнаружения биомаркеров при известных типах опухолей. В частности, мутации в гене *EGFR* при немелкоклеточном раке легкого в ДНК, содержащейся в плевральной жидкости и плазме крови, с высокой вероятностью предсказывают чувствительность или устойчивость к ингибиторам *EGFR* [13]. Результаты исследований роли жидкостной биопсии при ОНПЛ обобщены в табл. 1.

Циркулирующая опухолевая ДНК отражает молекулярные характеристики и происходящие физиологические процессы в опухоли в режиме реального времени. Пациенты с онкологическим заболеванием имеют гораздо большую концентрацию циркулирующей свободной ДНК (цсДНК) по сравнению с таковой у здоровых доноров из-за высокой пролиферативной активности опухолевых клеток и в результате их гибели. В связи с этим в нескольких исследованиях была изучена возможность использования цсДНК

в качестве биомаркера при различных типах онкологических заболеваний [14]. Было установлено, что определение характеристик цсДНК можно использовать для диагностики и раннего выявления заболевания, прогнозирования его развития (при использовании цсДНК в качестве суррогата опухолевой нагрузки), мониторинга реакции на лечение, а также в качестве индикатора рецидива и резистентности к терапии [15].

В работе S. Kato и соавт. для мутационного профилирования ОНПЛ использовали цсДНК. По данным таргетного секвенирования 54–70 генов на 442 образцах, 80 % пациентов имели как минимум одно генетическое нарушение. Мутационный профиль был сопоставим с данными исследования профиля опухолевой ткани ОНПЛ и продемонстрировал гетерогенность, сходную с наблюдаемой для всех типов опухолей. У 1 пациента анализ серии образцов цОДНК, взятых в процессе лечения, показал динамические изменения в мутационном профиле, соответствующие первоначально ответу, а затем формированию резистентности к терапии [16]. Это указывает на возможность использования цОДНК не только для профилирования опухоли, но и для отслеживания механизмов устойчивости к лечению и раннего прогнозирования рецидива (до его выявления объективными методами). При ОНПЛ особенно важно на раннем этапе лечения получить информацию о резистентности к лекарственной терапии, что позволит своевременно поменять тактику и уменьшить риск тяжелых побочных эффектов.

Одним из ограничений анализа цсДНК является определение биологической значимости и патогенности обнаруживаемых мутаций с учетом того, что аналогичные мутации встречаются в цсДНК у здоровых лиц [17]. Помимо мутаций, эпигенетические изменения, такие как метилирование ДНК, модификация гистонов и микроРНК-опосредованная регуляция генов, обеспечивают контроль транскрипции и регулируют экспрессию генов без внесения структурных изменений. В последнее время появляется все больше данных о том, что изучение этих особенностей позволит обеспечить более качественный анализ ДНК и преодолеть неопределенность мутационного статуса за счет лучшей оценки экспрессии генов и их функционирования.

Известно, что наряду с мутациями эпигенетические модификации играют исключительно важную роль в инициации опухолевого роста, предрасположенности к злокачественным новообразованиям, а также специфичны для типа опухоли [18]. Эпигенетические биомаркеры уже начали использоваться в клинических условиях и оказались потенциально полезны для прогнозирования ТС при анализе опухолевого материала из ОНПЛ [19]. Несколько групп исследователей продемонстрировали, что эпигенетические изменения цОДНК можно рассматривать как прогностический и предиктивный маркер, а также для мониторинга ответа на лечение и выявления минимальной остаточной болезни [20].

Циркулирующие опухолевые клетки

Циркулирующие опухолевые клетки — первичные опухолевые или метастатические клетки, которые вошли в периферическое кровообращение в виде единичных клеток или клеточных кластеров, называемых циркулирующими микроэмболами опухоли [8]. Примечательно, что большинство ЦОК подвергаются некоторой стадии апоптоза в кровотоке, что является источником цоДНК [21, 22]. К возможным механизмам, лежащим в основе гематогенного распространения ЦОК из первичной и/или метастатической опухоли, относят пассивное выделение опухолью и перисосудистую инвазию, сопровождаемые эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП) и нарушением межклеточного взаимодействия [23, 24]. Эпителиальные клетки при ЭМП теряют способность к межклеточным взаимодействиям, приобретают мобильность и инвазивный потенциал. ЦОК после ЭМП могут попадать в определенные опухолевые ниши и формировать метастазы с обратным переходом к фенотипу эпителиальных клеток. Однако лишь очень небольшая часть ЦОК способна впоследствии образовать отдаленный метастаз [8]. На генетическом материале ЦОК могут быть выполнены различные молекулярные исследования, включая анализ вариации числа копий различных генов, наличие активирующих мутаций, амплификаций и делеций, а также могут быть проведены эпигенетический и транскриптомный анализы.

Циркулирующие опухолевые клетки редко встречаются у здоровых лиц или у пациентов с доброкачественным заболеванием [25] и часто обнаруживаются при многих типах злокачественных новообразований. Количество присутствующих в крови ЦОК варьирует в зависимости от многих характеристик опухоли и пациента, а также зависит от технологической платформы, используемой для их обнаружения. ЦОК являются многообещающим источником информации при жидкостной биопсии. Важно, что результаты различных клинических исследований подтвердили, что наличие ЦОК в плазме пациента считается маркером плохого прогноза при многих типах онкологических заболеваний, особенно при раке молочной железы, толстой кишки и предстательной железы [26].

Пациенты с ОНПЛ часто имеют высокую опухолевую нагрузку и агрессивное клиническое течение с множественными метастазами, что позволяет предположить наличие у них относительно высокой частоты ЦОК, а также высокие уровни цоДНК, отражающие высокий уровень пролиферативной активности и гибели опухолевых клеток. Технологии, одобренные Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), такие как CellSearch® (Veridex, Warren, США), RCCT (Janssen Diagnostics, США), используют для детекции ЦОК в крови антитела к эпителиальным молекулам клеточной адгезии (EpCam) или к цитокератинам 8, 18 и 19. Недостатком данных технологий является отсутствие

в панели маркеров стволовых клеток и опухолевых клеток, осуществивших ЭМП, а также маркеров возможных переходных состояний и атипичных субпопуляций ЦОК. Оценка различных характеристик ЦОК считается перспективной для изучения новых биомаркеров и мишеней для таргетной терапии. Особое клиническое значение имеет определение гетерогенности ЦОК, в частности субпопуляции стволовых опухолевых клеток и клеток с признаками ЭМП [27]. В нескольких исследованиях оценивали ЦОК у небольшого числа пациентов с ОНПЛ [16, 28–30]. В работе K. Komine и соавт. исследовали образцы крови 10 пациентов с ОНПЛ и обнаружили ЦОК в 50 % случаев. ЦОК чаще обнаруживали у пациентов, не получавших лечение, в то же время у пациента в процессе лечения было отмечено снижение их уровня [29]. В 2 исследованиях использовали платформу CellSearch® (см. табл. 1).

В последнее время разработаны новые подходы к анализу ЦОК. Так, платформа RareCyte предназначена для комплексного сбора и идентификации ЦОК, позволяет проводить многопараметрическую оценку отдельных ЦОК и извлекать отдельные клетки для молекулярного анализа. Платформа имеет 4 интегрированных компонента: 1) разделение на основе отделения слоя лейкоцитов от эритроцитов и плазмы путем центрифугирования, позволяющего фракционировать клетки крови на основе различий их плавучей плотности, и выделение фракции ядерных клеток, включающей ЦОК, с последующим нанесением образца на предметные стекла микроскопа; 2) автоматическое многопараметрическое флуоресцентное окрашивание; 3) сканирование, анализ и просмотр изображений; 4) механический поиск ЦОК [31]. Высокора разрешающий анализ единичных клеток (the high-definition single-cell analysis, HD-SCA) сочетает выявление всей популяции ЦОК и редких опухоль-ассоциированных клеток и последующий геномный анализ для обнаружения отдельных субпопуляций с учетом молекулярных и морфологических особенностей [32]. Применение этих подходов к ОНПЛ должно улучшить выявление ЦОК при ОНПЛ, которые, согласно природе заболевания, возможно, потеряли свои эпителиальные маркеры.

На моделях *in vivo*, созданных из культивируемых ЦОК больных распространенным раком (легкого и меланомой), продемонстрировано высокое количество ЦОК [33, 34]. Эксплантаты, полученные из мелкоклеточного рака легкого, точно отражали реакции опухоли на химиотерапию, указывая на то, что они могут быть хорошими моделями для изучения механизмов резистентности опухолевых клеток к химиопрепаратам [35].

Таким образом, эти модели эксплантатов (CDX), полученные из ЦОК, можно использовать для разработки и тестирования новых лекарств, а также для изучения механизмов и закономерностей возникновения гетерогенности в опухоли [33]. В публикации

Таблица 1. Исследования методом жидкостной биопсии при ОНПЛ

Table 1. Liquid biopsy examinations in CUP

Источник Source	Метод Method	Исследуемая выборка Studied sample	Результаты Results
W.J. Allard и соавт., 2004 [25] W.J. Allard et al., 2004 [25]	Подсчет ЦОК (CellSearch®) CTC count (CellSearch®)	964 пациента со злокачественными ново- образованиями (в том числе 11 случаев с ОНПЛ). 244 пациента с доброкачественными новообразованиями и здоровых лиц 964 patients with malignant tumors (including 11 cases of CUP). 244 patients with benign tumors and healthy individuals	ЦОК обнаружены в 52 % ($n = 27$) случаев ОНПЛ. Среднее количество ЦОК 16 ± 35 CTC found in 52 % ($n = 27$) of CUP cases. Mean CTC count 16 ± 35
K. Komine и соавт., 2014 [29] K. Komine et al. [29]	Подсчет ЦОК (CellSearch®) CTC count (CellSearch®)	10 пациентов с ОНПЛ (5 из которых до начала лечения) 10 patients with CUP (5 of them prior to treatment)	ЦОК — в 50 % случаев. Среднее количество ЦОК 3–207 (медиана 31). У 1 пациента наблюдалось уменьшение числа ЦОК в ходе терапии CTC in 50 % of cases. Mean CTC count 3–207 (median 31). In 1 patient CTC count decreased during therapy
G. Pentheroudakis, 2012 [30]	Детекция ЦОК с помощью иммуно- флуоресценции CTC detection using immunofluorescence	24 пациента с ОНПЛ 24 patients with CUP	ЦОК — у 15 (62,5 %) пациентов, при этом их прогностическая ценность не выявлена CTC in 15 patients (62.5 %), prognostic value not established
S. Kato и соавт., 2017 [16] S. Kato et al., 2017 [16]	Анализ мутационного профиля цсДНК. Панели до 70 генов Analysis of cfDNA mutation profile. Panels up to 70 genes	442 пациента с ОНПЛ 442 patients with CUP	$TP53 - 37,1 \%$ $KRAS - 18,6 \%$ $PIK3CA - 15,4 \%$ $BRAF - 7,5 \%$ $MYC - 7,5 \%$. Изменение мутационного профи- ля цсДНК в ходе терапии зарегистрировано у 1 пациента Changes in cfDNA mutation profile detected in 1 patient

Примечание. ОНПЛ — опухоли невыявленной первичной локализации; ЦОК — циркулирующие опухолевые клетки; цсДНК — циркулирующая свободная ДНК.

Note. CUP — carcinoma of unknown primary; CTC — circulating tumor cells; cfDNA — circulating free DNA.

P. Torres-Ayuso и соавт. описан аналогичный подход с использованием клеточной культуры — эксплантат (patient-derived xenograft model, PDX), полученный из нейроэндокринной ОНПЛ пациента. Были проведены секвенирование следующего поколения, высокопроизводительный (high-throughput) анализ сигнальных путей и испытания на эффективность лекарственного средства. Драйверных мутаций не обнаружено. Однако полное секвенирование генома выявило амплификацию участков 3q и 5p, включающих гены *PIK3CA* и *RICTOR* соответственно. Анализ сигнальных путей выявил активацию пути АКТ. На основании этих данных эффективность ингибиторов *PIK3CA* и АКТ оценивали в культуре клеток, полученных при биопсии опухоли и в PDX. Ответная реакция на ингибитор АКТ AZD5363 наблюдалась как *in vitro*, так и *in vivo*, указывая на то, что лечение, приводящее к ингибированию серин-/треонинкиназы АКТ, может быть эффективным для данного пациента [36].

Определение тканевой специфичности с использованием жидкостной биопсии

Результаты недавних исследований при известных типах опухолей демонстрируют чувствительность и специфичность метода выявления рака с помощью жидкостных биопсий (см. табл. 1, табл. 2). Они включают генетическое и эпигенетическое профилирование цсДНК, окрашивание ЦОК и анализ мРНК опухолевых тромбоцитов [12, 37–43]. Многие из этих исследований были сосредоточены на раннем выявлении заболевания в поисках неинвазивного метода обнаружения рака, пригодного для скрининга. Однако очевидно, что выявление мутаций цсДНК надежнее при распространенном метастатическом процессе [44], в условиях более высокой опухолевой нагрузки и большего объема циркулирующего генетического опухолевого материала. Результаты исследования ТС демонстрируют чувствительность 60–98 % в зависимости от типа опухоли и молекулярного подхода [12, 37–41].

Таблица 2. Исследования ТС опухоли на образцах, полученных из крови, при злокачественных опухолях различной локализации

Table 2. Studies of tumor TS in samples obtained from blood in malignant tumors of different sites

Источник Source	Метод Method	Исследуемая выборка Studied sample	Результаты Results
M.G. Best и соавт., 2015 [12] M.G. Best et al., 2015 [12]	ОАТ; профилирование мРНК ОАТ TEP, TEP mRNA profiling	55 здоровых доноров; 55 healthy donors; ЗНО различной локализации: MTs of varying sites: 60 случаев немелкоклеточного рака легкого; 60 cases of non-small-cell lung cancer; 41 – КРР; 41 – CRC; 39 – глиобластомы; 39 – glioblastoma; 35 – рака поджелудочной железы; 35 – pancreatic cancer; 39 – РМЖ; 39 – BC; 14 – ГБК 14 – HBC	Профили мРНК ОАТ, способных прогнозировать происхождение ткани по 6 типам первичных опухолей с медианной точностью 73 % TED mRNA profiles allowing to predict tissue origin for 6 types of primary tumors with median accuracy of 73 %
E.A. Klein и соавт., 2018 [37] E.A. Klein et al., 2018 [37]	цсДНК. Таргетное секвенирова- ние следующего поколения (панель из 507 генов), анализ вариации числа копий, полногеномное бисульфитное секвени- рование cfDNA. Targeted next generation sequencing (507 gene panel), copy number analysis, whole genome bisulfite sequencing	749 здоровых доноров; 749 healthy donors; 878 случаев ЗНО: 878 cases of MTs: 28 – КРР; 28 – CRC; 19 – рака пищевода; 19 – esophageal cancer; 5 – опухолей головы и шеи; 5 – head and neck tumors; 5 – ГБК; 5 – HBC; 73 – рака легкого; 73 – lung cancer; 17 – лимфомы; 17 – lymphomas; 11 – множественной миеломы; 11 – multiple myeloma; 10 – рака яичников; 10 – ovarian cancer; 10 – РПЖ 10 – PCa	Чувствительность метода – 60–90 % при обнаружении перечисленных типов опухолей (стадии I–III) Method sensitivity is 60–90 % for diagnosis of the listed tumor types (stages I–III)
J.D. Cohen и соавт., 2018 [38] J.D. Cohen et al., 2018 [38]	цсДНК. Панель из 16 генов и 8 экспрессируемых опухолью белков (CancerSEEK) cfDNA. Panel of 16 genes and 8 tumor-expressed proteins (CancerSEEK)	812 здоровых доноров 812 healthy donors; 626 случаев ЗНО различной локализа- ции (рак яичников, легкого, печени, желудка, поджелудочной железы, пищевода, РМЖ, КРР) 626 cases of MTs of varying sites (ovarian, lung, liver, stomach, pancreatic, esophageal, BC, CRC)	Верифицирована ТС опухоли у 69–98 % пациентов Tumor TS verified in 69–98 % of patients
K. Sun и соавт., 2015 [39] K. Sun et al., 2015 [39]	цсДНК. Паттерны метилирования cfDNA. Methylation patterns	32 здоровых донора; 32 healthy donors; 29 пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой 29 patients with hepatocellular carcinoma	Картирование паттернов метилиро- вания цсДНК позволило отличить гепатоцеллюлярный источник опухолевого генетического материала cfDNA pattern mapping allowed to distinguish hepatocellular source of tumor genetic material
R. Lehmann- Werman и соавт., 2016 [40] R. Lehmann-Werman et al., 2016 [40]	цсДНК. Паттерны метилирования. Метилонные исследования Methylation patterns. Methylation analysis	47 здоровых доноров; 47 healthy donors; 42 больных раком поджелудочной железы 42 patients with pancreatic cancer	В цсДНК обнаружены паттерны метилирования гибели панкреатиче- ских клеток у 20 из 42 больных раком поджелудочной железы In cfDNA, methylation patterns of pancreatic cell death were observed in 20 of 42 patients with pancreatic cancer

Окончание табл. 2

End of table 2

Источник Source	Метод Method	Исследуемая выборка Studied sample	Результаты Results
S. Guo и соавт., 2017 [41] S. Guo et al., 2017 [41]	цсДНК. Паттерны метилирования cfDNA. Methylation patterns	75 здоровых доноров; 75 healthy donors; 29 случаев рака легкого; 29 cases of lung cancer; 30 случаев КРР 30 cases of CRC	ТС определена в 82,8 % образцов КРР и в 88,5 % образцов рака легкого TS determined in 82.8 % of CRC samples and in 88.5 % of lung cancer samples
Е. М. Matthew и соавт., 2016 [42] E. M. Matthew et al., 2016 [42]	Подсчет ЦОК (CellSearch®) CTC count (CellSearch®)	2 случая РМЖ; 2 cases of BC; 1 случай РПЖ 1 case of PCa	ИГХ-анализ ЦОК, способных определять происхождение ткани в РМЖ и РПЖ с использованием маркеров: СК7, СК20, ТТf-1, ER, ПСА IHC analysis of CTC allowing to determine tissue source in BC and PCa using CK7, CK20, TTF-1, ER, PSA markers
S. H. Lu и соавт., 2016 [43] S. H. Lu et al., 2016 [43]	Подсчет ЦОК (мультибиомаркерная платформа CellMax, CMx®) CTC count (multi-biomarker platform CellMax, CMx®)	12 здоровых доноров; 12 healthy donors; 13 случаев ЗНО различной локализации (рак легкого, толстой кишки, РПЖ) 13 cases of MTs of varying sites (lung, colon, PCa)	Специфичность метода неудовлетворительная: Unsatisfactory method specificity: была выявлена цсДНК у клинически здоровых лиц; ctDNA was detected in clinically healthy individuals; ТС верифицирована путем ИГХ-метода (маркеры СК7, СК20, ТТf-1, CDX2, ПСА) TS verified using IHC (CK7, CK20, TTF-1, CDX2, PSA markers)

Примечание. ТС — тканевая специфичность; ОАТ — опухоль-ассоциированные тромбоциты; мРНК — матричные РНК; ЗНО — злокачественные новообразования; КРР — колоректальный рак; РМЖ — рак молочной железы; ГБК — гепатобилиарная карцинома; цсДНК — циркулирующая свободная ДНК; РПЖ — рак предстательной железы; ЦОК — циркулирующие опухолевые клетки; ИГХ — иммуногистохимический; ПСА — простатический специфический антиген; цсДНК — циркулирующая опухолевая ДНК.

Note. TS — tissue specificity; TEP — tumor-educated platelets; mRNA — matrix RNA; MTs — malignant tumors; CRC — colorectal cancer; BC — breast cancer; HBC — hepatobiliary cancer; cfDNA — circulating free DNA; PCa — prostate cancer; CTC — circulating tumor cells; IHC — immunohistochemistry; PSA — prostate-specific antigen; ctDNA — circulating tumor DNA.

В этих исследованиях показано, что молекулярная характеристика опухоли с использованием жидкостной биопсии возможна, особенно при интенсивном метастатическом распространении. Прогнозирование ТС с помощью молекулярного профилирования при ОНПЛ активно обсуждается специалистами, но пока не применяется на практике. Кроме этого, типичное для таких пациентов наличие множественных метастазов, которые зачастую утрачивают очевидные «молекулярные признаки» для определения ТС, может увеличить гетерогенность цсДНК при ОНПЛ и сделать фенотипирование ЦОК малоинформативным. Несмотря на то что исследования в этой области очень интересны, практическую пользу использования любого из этих методов в отношении определения ТС у пациентов с ОНПЛ еще предстоит выяснить.

В ограниченных исследованиях, оценивающих роль цсДНК и ЦОК при ОНПЛ, продемонстрирована осуществимость использования методов, но о их клинической целесообразности пока судить рано. Классификаторы ТС с использованием жидкостной биопсии

показывают значительный потенциал для диагностики известных типов опухолей, но еще не применены к пациентам с ОНПЛ. Это может быть неопределимым в рационализации диагностического поиска при ОНПЛ и злокачественных новообразованиях неизвестной природы, а также в быстрой диагностике потенциально излечимых злокачественных новообразований, при которых диагностика является критической по времени, например герминогенных опухолей и лимфом. Наиболее полезными жидкостными биопсиями, скорее всего, будут те, которые позволят получать комплексные данные — не только для прогнозирования ТС, но и для обеспечения лучшего прогнозирования, выявления действенных мутаций и маркеров ответа на химиотерапию и/или иммунотерапию, а также для оценки чувствительности к терапии или мониторинга резистентности. Немногочисленные данные исследований при ОНПЛ, выполненных с использованием жидкостной биопсии, представлены в табл. 1.

В литературе опубликовано значительно больше результатов исследований, выполненных на образцах

крови для определения ТС злокачественных опухолей различных локализаций (см. табл. 2).

Заключение

Отсутствие надежных прогностических и предиктивных биомаркеров при ОНПЛ означает неприменимость научно обоснованного выбора терапии. Небольшая часть пациентов группы благоприятного прогноза ОНПЛ имеют хороший ответ на лечение и в результате достигают значимого увеличения выживаемости. Тем не менее большинство пациентов (около 80 %) относятся к группе неблагоприятного прогноза, они чаще имеют висцеральное распространение заболевания, большую опухолевую нагрузку, демонстрируют слабый ответ на стандартную химиотерапию и в настоящее время получают комбинированную химиотерапию на основе клинических и рентгенологических характеристик и ограниченной гистопатологической информации. Эмпирический подход не учитывает гетерогенность этих опухолей и подтверждает необходимость лучшей стратификации лечения.

Поиск новых биомаркеров, в идеале получаемых при жидкостной биопсии, открывает перспективы в диагностике и лечении не только ОНПЛ, но и других типов опухолей. Определение биологического портрета метастатической опухоли на этой основе позволит лучше предсказывать чувствительность к химио-, таргетной и иммунотерапии. Однако для внедрения жидкостной биопсии в клиническую практику существует необходимость в надежных доказательствах. Включение в дизайн клинических исследований при ОНПЛ оценки биомаркеров, получаемых в результате жидкостной биопсии, является одной из важных задач современной онкологии. Такая технология позволит более детально изучить гетерогенность ОНПЛ на молекулярном уровне, а также обеспечить большую безопасность при меньшей инвазивности процедур. В НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина инициировано исследование, направленное на поиск надежных прогностических и предиктивных биомаркеров, позволяющих персонифицировать диагностику и лечение пациентов с ОНПЛ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Комаров И.Г., Комов Д.В. Метастазы злокачественных опухолей без выявленного первичного очага. Онкология. Справочник практического врача 2009; 750–57. [Komarov I.G., Komov D.V. Metastases of malignant tumors without an identified primary focus. *Onkologiya. Spravochnik prakticheskogo vracha* = *Oncology. Practitioner Handbook* 2009;750–57. (In Russ.)].
2. Pentheroudakis G., Briasoulis E., Pavlidis N. Cancer of Unknown Primary site: missing primary or missing biology? *Oncologist* 2007;12(4):418–25. DOI: 10.1634/theoncologist.12-4-418.
3. Pavlidis N., Pentheroudakis G. Cancer of unknown primary site: 20 questions to be answered. *Ann Oncol* 2010; 21(Suppl 7): vii303–7. DOI: 10.1093/annonc/mdq278.
4. Рак без выявленного первичного очага. Минимальные клинические рекомендации Европейского общества медицинской онкологии (ESMO). Редакторы русского перевода: С.А. Тюляндин, Д.А. Носов, Н.И. Переводчикова. М.: Издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2010. 436 с. [The European Society of Medical Oncology (ESMO) Clinical Practice Guidelines on Cancers of Unknown Primary. Eds. of Russian translation: S.A. Tulyandin, D.A. Nosov, N.I. Perrevodchikova. Moscow: Izatel'skaya gruppa RONC im. N.N. Blokhina RAMN, 2010. 436 p. (In Russ.)].
5. Blaszyk H., Hartmann A., Björnsson J. Cancer of unknown primary: clinicopathologic correlations. *APMIS* 2003;111:1089–94. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2003.apm1111203.x.
6. Hillen H.F.P. Unknown primary tumours. *Postgr Med J* 2000;76:690–3. DOI: 10.1136/pmj.76.901.690.
7. Siegel R., Naishadham D., Ahmedin J. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62(1):10–29. DOI: 10.3322/caac.20138.
8. Thiele J.A., Bethel K., Králíčková M. et al. Circulating tumor cells: fluid surrogates of solid tumors. *Ann Rev Pathol Mech Dis* 2017;12:419–47. DOI: 10.1146/annurev-pathol-052016-100256.
9. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883–92. DOI: 10.1056/NEJMoa1113205.
10. Anderson G.G., Weiss L.M. Determining tissue of origin for metastatic cancers: meta-analysis and literature review of immunohistochemistry performance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010;18:3–8. DOI: 10.1097/PAI.0b013e3181a75e6d.
11. Alix-Panabières C., Schwarzenbach H., Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Ann Rev Med* 2012;63:199–215. DOI: 10.1146/annurev-med-062310-094219.
12. Best M.G., Sol N., Kooi I. et al. RNA-Seq of tumor-educated platelets enables blood-based pancreatic, multiclass, and molecular pathway cancer diagnostics. *Cancer Cell* 2015;28:666–76. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.09.018.
13. Malapelle U., Sirena R., Jantus-Lewintre E. et al. Profile of the Roche cobas® EGFR mutation test v2 for nonsmall cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2017;17:209–15. DOI: 10.1080/14737159.2017.1288568.
14. Bardelli A., Pantel K. Liquid biopsies, what we do not know (yet). *Cancer Cell* 2017;31:172–9. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.01.002.
15. Wan J.C.M., Garcia-Corbacho J., Mouliere F. et al. Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumor DNA. *Nat Rev Cancer* 2017;17: 223–38. DOI: 10.1038/nrc.2017.7.
16. Kato S., Krishnamurthy N., Banks K.C. et al. Utility of genomic analysis in circulating tumor DNA from patients with carcinoma of unknown primary. *Cancer Res* 2017;77:4238–46. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0628.
17. Martincorena I., Roshan A., Gerstung M. et al. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* 2015;348:880–6. DOI: 10.1126/science.aaa6806.
18. Feinberg A.P., Ohlsson R., Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006;7:21–33. DOI: 10.1038/nrg1748.
19. Moran S., Martínez-Cardús A., Sayols S. et al. Epigenetic profiling to classify cancer of unknown primary: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2016;17:1386–95. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30297-2.

20. Warton K., Mahon K.L., Samimi G. Methylated circulating tumor DNA in blood: power in cancer prognosis and response. *Endocr Relat Cancer* 2016;23(3):R157–71. DOI: 10.1530/ERC-15-0369.
21. Meng S., Tripathy D., Frenkel E.P. et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004;10:8152–62. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1110.
22. Bockhorn M., Roberge S., Sousa C. et al. Differential gene expression in metastasizing cells shed from kidney tumors. *Cancer Res* 2004;64:2469–73. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-0256.
23. Williamson S.C., Metcalf R.L., Trapani F. et al. Vasculogenic mimicry in small cell lung cancer. *Nat Commun* 2016;7:13322. DOI: 10.1038/ncomms13322.
24. Kwon M.C., Proost N., Song J.Y. et al. Paracrine signaling between tumor subclones of mouse SCLC: a critical role of ETS transcription factor Pea3 in facilitating metastasis. *Genes Dev* 2015;29(15):1587–92. DOI: 10.1101/gad.262998.115.
25. Allard W.J., Matera J., Miller M.C. et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004;10:6897–904. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0378.
26. Pantel K., Alix-Panabières C. Liquid biopsy in 2016: circulating tumour cells and cell-free DNA in gastrointestinal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:73–74. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.198.
27. Кайгородова Е.В. Циркулирующие опухолевые клетки: клиническое значение при раке молочной железы (обзор литературы). *Вестник РАМН* 2017;72(6):450–7. [Kaigorodova E.V. Circulating tumor cells: clinical significance in breast cancer (review). *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences* 2017;72(6):450–7. (In Russ.)]. DOI: 10.15690/vramn833.
28. Murtaza M., Dawson S.J., Tsui D.W. et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013;497:108–12. DOI: 10.1038/nature12065.
29. Komine K., Inoue M., Otsuka K. et al. Utility of measuring circulating tumor cell counts to assess the efficacy of treatment for carcinomas of unknown primary origin. *Anticancer Res* 2014;34(6):3165–8.
30. Pentheroudakis G. CUP: looking for a missing primary site and its biology. *Ann Oncol* 2012;23(suppl 10):x278–81. DOI: 10.1093/annonc/mds318.
31. Eric P.K., Arturo B.R., Yao S. et al. The RareCyt[®] platform for next-generation analysis of circulating tumor cells. *Cytometry A* 2018;93(12):1220–5. DOI: 10.1002/cyto.a.23619.
32. Thiele J.A., Pitule P., Hicks J. et al. Single-cell analysis of circulating tumor cells. *Methods Mol Biol* 2019;1908:243–64. DOI: 10.1007/978-1-4939-9004-7_17.
33. Hodgkinson C.L., Morrow C.J., Li Y. et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med* 2014;20:897–903. DOI: 10.1038/nm.3600.
34. Girotti M.R., Gremel G., Lee R. et al. Application of sequencing, liquid biopsies, and patient-derived xenografts for personalized medicine in melanoma. *Cancer Discov* 2016;6(3):286–99. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1336.
35. Carter L., Rothwell D.G., Mesquita B. et al. Molecular analysis of circulating tumor cells identifies distinct copy-number profiles in patients with chemosensitive and chemorefractory small-cell lung cancer. *Nat Med* 2016;23(1):114–9. DOI: 10.1038/nm.4239.
36. Torres-Ayuso P., Sahoo S., Ashton G. et al. Signaling pathway screening platforms are an efficient approach to identify therapeutic targets in cancers that lack known driver mutations: a case report for a cancer of unknown primary origin. *NPJ Genomic Med* 2018;3:15. DOI: 10.1038/s41525-018-0055-6.
37. Klein E.A., Hubbell E., Maddala T. et al. Development of a comprehensive cell-free DNA (cfDNA) assay for early detection of multiple tumor types: the circulating cell-free genome atlas (CCGA) study. *J Clin Oncol* 2018;36(15_suppl):12021. DOI: 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.12021.
38. Cohen J.D., Li L., Wang Y. et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018;23:359(6378):926–30. DOI: 10.1126/science.aar3247.
39. Sun K., Jiang P., Chan K.C. et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112:E5503–12. DOI: 10.1073/pnas.1508736112.
40. Lehmann-Werman R., Neiman D., Zemmour H. et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113:E1826–34. DOI: 10.1073/pnas.1519286113.
41. Guo S., Diep D., Plongthongkum N. et al. Identification of methylation haplotype blocks AIDS in deconvolution of heterogeneous tissue samples and tumor tissue-of-origin mapping from plasma DNA. *Nat Genet* 2017;49:635–42. DOI: 10.1038/ng.3805.
42. Matthew E.M., Zhou L., Yang Z. et al. A multiplexed marker-based algorithm for diagnosis of carcinoma of unknown primary using circulating tumor cells. *Oncotarget* 2016;7:3662–76. DOI: 10.18632/oncotarget.6657.
43. Lu S.H., Tsai W.S., Chang Y.H. et al. Identifying cancer origin using circulating tumor cells. *Cancer Biol Ther* 2016;17:430–8. DOI: 10.1080/15384047.2016.1141839.
44. Bettegowda C., Sausen M., Leary R.J. et al. Detection of circulating tumor dna in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014;6:224ra24. DOI: 10.1126/scitranslmed.3007094.

Вклад авторов

И.Б. Кононенко: анализ научной работы, редактирование черновика рукописи;

М.Г. Филиппова: анализ научной работы, обзор литературы, составление черновика рукописи и оформление статьи;

А.В. Снеговой: разработка концепции научной работы, анализ научной работы, обзор литературы, составление черновика рукописи;

С.Л. Гуторов: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержимого, редактирование черновика рукописи.

Authors' contributions

I.B. Kononenko: analysis of scientific study, manuscript editing;

M.G. Filippova: analysis of scientific study, literature review, manuscript preparation and formatting;

A.V. Snegovoy: development of study concept, analysis of scientific study, literature review, manuscript preparation;

S.L. Gutorov: analysis of scientific study, critical review with addition of valuable intellectual content, manuscript editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.Б. Кононенко / I.B. Kononenko: <https://orcid.org/0000-0002-7142-2986>

М.Г. Филиппова / M.G. Filippova: <https://orcid.org/0000-0002-1883-2214>

А.В. Снеговой / A.V. Snegovoy: <https://orcid.org/0000-0002-0170-5681>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Противоопухолевый ингибитор протеинтирозинкиназ иматиниб как потенциальный корректор пневмофиброза COVID-19

И. Н. Михайлова¹, Е. М. Трещалина¹, И. Ж. Шубина¹, И. В. Манина², М. В. Киселевский¹, А. Н. Лукашев³

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

²ООО «Институт аллергологии и клинической иммунологии»; Россия, 123104 Москва, Малая Бронная ул., 20, стр. 1;

³Научно-исследовательский институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е. И. Марциновского ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет) Минздрава России; Россия, 119435 Москва, Малая Пироговская ул., 20, стр. 1

Контакты: Ирина Николаевна Михайлова irmikhaylova@gmail.com

Иматиниб мезилат — известный противоопухолевый таргетный ингибитор протеиновых тирозинкиназ, эффективный при различной онкологической патологии с экспрессией Bcr/Abl, особенно при гемобластозах. На фоне пандемии коронавируса COVID-19 интерес к иматинибу возрос в связи с тем, что онкологические пациенты относятся к одной из групп риска заболевания COVID-19. Более того, определяющий применение иматиниба при онкологических заболеваниях таргетный механизм действия может быть перспективен для коррекции наиболее опасного осложнения — COVID-19-ассоциированного пневмофиброза. COVID-19-ассоциированный интерстициальный пневмофиброз возникает аутоиммунно вследствие системного воспаления с развитием атипичной (идиопатической) пневмонии под действием острого респираторного дистресс-синдрома с тирозинкиназным механизмом активации сигнальных путей и клеточного ответа. Экспериментальные и клинические данные, выявившие антифибротическое и дозозависимое антитромботическое действие иматиниба, свидетельствуют о целесообразности применения этого противоопухолевого препарата для коррекции COVID-19-ассоциированной пневмонии — причины высокой смертности пациентов с COVID-19.

В обзоре приведены данные литературы 2001–2020 гг., посвященные патогенетическим и клиническим особенностям развития пневмофиброза, проанализированы данные об особенностях течения пневмонии COVID-19 у взрослых. Приведенная последовательность событий показывает, что прогрессирование процесса со снижением сатурации кислорода в периферической крови усиливает локальное тромбообразование в легких. В результате возникает плохо управляемая гипоксия, которая в тяжелых случаях является причиной летального исхода. Воздействие на процесс развития пневмофиброза с помощью известных антифибротических и тромболитических препаратов позволяет лишь частично контролировать процесс, в том числе у онкологических пациентов. Ориентировочная антифибротическая доза иматиниба 400 мг/сут считается терапевтической для онкологической патологии. Зарегистрированный во многих странах противоопухолевый препарат не требует длительных регистрационных исследований по новому показанию, а известные побочные эффекты и противопоказания к применению позволяют быстро подготовить его клиническую апробацию.

Ключевые слова: противоопухолевый препарат, иматиниб мезилат, протеинтирозинкиназа, пневмофиброз, COVID-19

Для цитирования: Михайлова И. Н., Трещалина Е. М., Шубина И. Ж. и др. Противоопухолевый ингибитор протеинтирозинкиназ иматиниб как потенциальный корректор пневмофиброза COVID-19. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(4):20–8.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-4-20-28



Antitumor protein kinase inhibitor imatinib may be regarded as a potential correcting agent for COVID-19 associated pulmonary fibrosis

I. N. Mikhaylova¹, H. M. Treshalina¹, I. Zh. Shubina¹, I. V. Manina², M. V. Kiselevsky¹, A. N. Lukashev³

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

²Institute of Allergology and Clinical Immunology; Build. 1, 20 Malaya Bronnaya St., Moscow 123104, Russia;

³Research Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-borne Diseases named after E. I. Marcinovsky, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia; Build. 1, 20 Malaya Pirogovskaya St., Moscow 119435, Russia

Imatinib mesilate is a well-known antitumor target inhibitor of protein tyrosine kinase, which is effective in different cancer types expressing Bcr/Abl and, in particular, in hemoblastosis. A higher interest to imatinib during the COVID-19 epidemic is explained by the fact that cancer patients are one of the COVID-19 risk groups. Moreover, imatinib target mechanism of action, which is effective in cancer, can have a high potential against the most severe COVID-19 complication such as the disease associated pulmonary fibrosis. COVID-19 associated interstitial pulmonary fibrosis develops as an autoimmune process caused by systemic inflammation with atypical (idiopathic) pneumonia resulting

from acute respiratory distress syndrome with the tyrosine kinase mechanism of signaling pathway activation and cellular response. Experimental and clinical results showing antifibrotic and dose-related antithrombotic imatinib effect demonstrate perspective use of this antitumor agent to correct COVID-19 associated pneumonia causing a high death rate of patients with COVID-19.

The review presents literature data of 2001–2020 discussing pathologic genetic and clinical characteristics of the fibrosis which exacerbates COVID-19 pneumonia in adults. The sequence of the disease processes demonstrates that disease progression with the decreasing oxygen saturation in the peripheral blood intensifies local thrombosis in the lungs. As a result, hypoxia is developing, which is difficult to control and can cause lethal outcome in severe cases. Yet, the conventional antifibrotic and thrombolytic agents can only partially control the process of pneumofibrosis including that of cancer patients. The approximate antifibrotic dose of imatinib 400 mg/day is therapeutic for oncopathology. The antitumor drug registered in many countries and well described side effects and contraindications needs no long-term registration studies for a new indication, therefore, it may be easily prepared for clinical testing.

Key words: antitumor drug, imatinib mesylate, tyrosine protein kinase, pneumofibrosis, COVID-19

For citation: Mikhaylova I.N., Treshalina H.M., Shubina I.Zh. et al. Antitumor proteinkinase inhibitor imatinib may be regarded as a potential correcting agent for COVID-19 associated pulmonary fibrosis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2020;7(4):20–8. (In Russ.).

Введение

Экспериментальные данные

Среди ингибиторов тирозинкиназы c-Abl известен протектор эндотелиальных клеток иматиниб мезилат, который используется для лечения злокачественных гемобластозов и некоторых солидных опухолей с экспрессией Vcr/Abl. Ингибирующий злокачественную пролиферацию клеток иматиниб параллельно нормализует секрецию иммунокомпетентными клетками интерлейкинов (ИЛ), как провоспалительных (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8), так и противовоспалительных (ИЛ-4, ИЛ-10) [1].

Регуляторная роль иматиниба в развитии патофизиологических событий острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) выявлена экспериментально *in vivo* на мышинной модели аутоиммунного пневмофиброза, индуцированного эндотоксином. Показано, что в условиях гипоксии иматиниб в высоких дозах блокирует сосудистую архитектуру легких, т. е. нарушает нормальную анатомию бронхов, сосудов и перегородок, что проявляется в виде потери естественного хода и сгущения расширенных бронхиол или сосудов, а при низких дозах усиливает гипервентиляцию [2]. Роль Abl-киназ при этом феномене получила объяснение в исследованиях на культуре эндотелиальных клеток пневмоцитов человека. Оказалось, что в зависимости от концентрации иматиниб уменьшает эндотоксининдуцированную проницаемость клеток, восстанавливает соединения VE-кадгерина и уменьшает воспаление, подавляя экспрессию молекулы VCAM-1 и секрецию воспалительных цитокинов ИЛ-8 и ИЛ-6. В противном случае иматиниб снижает экспрессию VE-кадгерина, нарушает межклеточные соединения и повышает уровень ИЛ-8 в эндотелиальных клетках, подверженных патологическому циклическому растяжению подобно мезенхимальным стромальным клеткам. Снижение регуляции экспрессии c-Abl с помощью малых интерферирующих РНК ослабляет эндотоксининдуцированную экспрессию VCAM-1, в то время как специфическое снижение экспрессии Arg снижает экспрессию VE-кадгерина. Аналогичные

свойства иматиниба и других ингибиторов тирозинкиназы рецепторов малых молекул тромбоцитарного фактора роста (PDGF) продемонстрированы на животных моделях радиационноиндуцированного легочного фиброза [3]. Авторы показали, что ингибиторы тирозинкиназы рецепторов малых молекул PDGF (RTKI) могут резко ослабить радиационноиндуцированный легочный фиброз, если введение препарата начинается в момент облучения во время острого воспаления с присутствующими, но ограниченными эффектами против острого воспаления. Иматиниб даже при введении после того, как острое воспаление спало, ослаблял радиационноиндуцированный фиброз легких у мышей.

Показана также возможность экспериментальной коррекции фиброгенеза, развившегося при индуцированной асбестом пневмонии [4].

Возможность иматиниба останавливать развитие фиброза косвенно показана на примере активности в модели экспериментального серповидного гломерулонефрита. Препарат ингибировал рецепторы макрофагального гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и PDGF (PDGFR), а также сигналинг и пролиферацию фибробластов и продукцию цитокинов. Отмечено снижение PDGFR-сигналов в фибробластоподобных синовиоцитах и уровня фактора некроза опухоли α (ФНО- α), продукта мононуклеарных клеток. Таким образом, механизмы прямого влияния иматиниба на развитие фиброза и его противовоспалительное действие достаточно хорошо охарактеризованы.

Вторым механизмом, по которому иматиниб может снижать тяжесть как острого поражения легких, так и поздних осложнений, является способность эффективно подавлять продукцию ФНО- α и передачу сигналов NF- κ B в макрофагах и моноцитах, стимулированных эндотоксином [5]. Активация макрофагов рассматривается как один из важных патогенетических путей запуска идиопатического легочного фиброза COVID-19 [6–8].

Противовоспалительные эффекты иматиниба были продемонстрированы на мышинной модели астмы

[9] и на трансфицированных Vsc/Abl гемопоэтических клеточных линиях [10]. Выявлены также дозозависимый протекторный и противовоспалительный эффекты иматиниба при аутоиммунном повреждении легких у мышей [2]. Блокирование острого воспаления показано при аллергическом васкулите с эозинофильной инфильтрацией [11] и аутоиммунном артрите [12]. На модели индуцированного коллагеном артрита иматиниб продемонстрировал способность в микромолярной концентрации блокировать сигнальные пути активации тучных $c\text{-Kit}^+$ -клеток и высвобождение ФНО- α , цитокиновую продукцию и пролиферацию клеток. Иматиниб снижает PDGFR-сигналы в фибробластоподобных синовиоцитах [12].

Обоснование применения иматиниба при пневмофиброзе COVID-19

Патогенетические особенности

Как известно, входные ворота возбудителя — эпителий верхних дыхательных путей и эпителиоциты желудка и кишечника. Начальным этапом заражения является проникновение SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2019-nCoV) в клетки-мишени, имеющие рецепторы ангиотензинпревращающего фермента 2-го типа (АПФ2). В соответствии с современными представлениями этот рецептор экспрессирован на поверхности различных клеток органов дыхания, пищевода, кишечника, сердца, надпочечников, мочевого пузыря, головного мозга (гипоталамуса) и гипофиза, а также эндотелия и макрофагов. Нуклеокапсидный белок вируса был обнаружен в цитоплазме эпителиальных клеток слюнных желез, желудка, двенадцатиперстной и прямой кишки, мочевыводящих путей, а также в слезной жидкости. Однако основной и быстро достижимой мишенью SARS-CoV-2 являются альвеолярные клетки 2-го типа легких, что определяет развитие диффузного альвеолярного повреждения. Полагают, что при COVID-19 может развиваться катаральный гастроэнтероколит, так как вирус поражает клетки эпителия желудка, тонкой и толстой кишки, имеющие рецепторы АПФ2. Однако его морфологические особенности практически неизвестны. Есть данные о возможности специфического поражения сосудов (эндотелия), миокарда и почек. Изменения иммунокомпетентных органов изучены недостаточно. Высказываются предположения о значении «цитокинового шторма» при тяжелом поражении легких и других органов и, как следствие, о повреждении микроциркуляторного русла с нарушениями в системе свертывания крови. В ряде работ на основании теоретических предпосылок постулируется ведущая патогенетическая роль аутоиммунных механизмов. Также обсуждается роль трансмембранного гликопротеина CD147 в инвазии клеток SARS-CoV-2 [13]. SARS-CoV-2 может связываться с рецептором CD147 на поверхности клеток. Это белок из семейства иммуноглобулинов. Судя по всему, у него несколько

функций, например, он запускает работу металлопротеиназ — белков, перестраивающих внеклеточное вещество в тканях. Кодирующая область CD147 содержит 269 аминокислотных остатков, которые образуют 2 сильно гликозилированных иммуноглобулинподобных домена типа C2 в N-концевой внеклеточной части, 24 аминокислотных остатка, расположенных в трансмембранной области, и 39 аминокислотных остатков в C-концевой внутриклеточной части [14]. В 3'-области гена *CD147* также имеются сайты связывания для фактора транскрипции, индуцируемого при гипоксии [15].

Было показано, что в основе патогенеза осложненный COVID-19 лежит интенсивная активация большого числа провоспалительных цитокинов («цитокиновый шторм»), в том числе ИЛ-1, -2, -6, -7. Помимо ряда ИЛ в процессе участвует хемокин, белок 10 (CXCL10), секретируемый несколькими типами клеток: макрофагами, эндотелиальными клетками и фибробластами в ответ на продукцию интерферона γ . Определенную роль в реализации конечного эффекта играет ГМ-КСФ, а также представитель большой семьи хемотаксических цитокинов — моноцитарный хемоаттрактантный протеин 1 (MCP-1). Последний стимулирует миграцию лейкоцитов в очаг воспаления и повышает экспрессию P2-интегрина на поверхности моноцитов, что сопровождается их адгезией к экстрацеллюлярным матриксным белкам. Не остаются в стороне ФНО- α и макрофагальный воспалительный протеин 1 α , обуславливающие развитие «цитокинового шторма», который, в свою очередь, приводит к коагулопатии или тромбозу. Тромбоз часто сопровождает онкологические заболевания и является следствием нарушения системы свертывания крови с развитием тромбоэмболии и пневмосклероза. Аналогичный процесс наблюдается при развитии индуцируемого COVID-19 пневмофиброза [16–18].

Фиброз — достаточно частое осложнение COVID-19, причем частота развития зависит от тяжести и длительности основного заболевания. При длительности пневмонии более 3 нед фиброз развивался у 61 % пациентов [19]. Развитие фиброза при пневмонии COVID-19 в результате ОРДС включает, по-видимому, следующие патогенетические механизмы: 1) раннюю активацию иммунной системы с индукцией высокоактивного интерферона; 2) выключение иммунного ответа и прогрессирующее повреждение ткани-мишени; 3) гипервоспалительную реакцию с чрезмерной активацией макрофагов и клеток эндотелия со сдвигом равновесия в сторону коагуляции без восстановления [20, 21]; 4) микротромбоз капилляров легких; 5) интерстициальную и экссудативную пневмонию; 6) организацию фиброза, в основном в альвеолярной перегородке, и гиперплазию пневмоцитов 2-го типа [22].

В основе патогенеза ОРДС лежит эндотелиальная дисфункция, последовательность событий которой описывается диффузным повреждением альвеол

за счет микрососудистого тромбоза, развитием прогрессирующей гипоксии на фоне пневмофиброза и летальным снижением жизненной емкости легкого, особенно при двустороннем процессе. Помимо повреждения эндотелия в течение воспалительной фазы ОРДС происходит дисрегуляция матриксных металлопротеиназ с неконтролируемой эпителио- и фибропролиферацией. Включаются регулируемые трансформирующим ростовым фактором β (TGF- β) канонические профибротические пути, представляющие собой сосудистую дисфункцию, как ключевой компонент перехода от ОРДС к фиброзу с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и цитокинами, такими как ИЛ-6 и ФНО- α [23]. В клеточном ответе на окислительный стресс задействованы тирозинкиназы c-Abl и Arg, которые активируются в ответ на ОРДС, участвуют в регуляции эндотелиального клеточного барьера и запуске апоптоза [24]. Данные о предыдущих коронавирусных инфекциях, таких как тяжелый ОРДС и ближневосточный респираторный синдром, а также новые данные о COVID-19, возбудителем которой является SARS-CoV-2, предполагают, что существенные фиброзные последствия могут встречаться после различных коронавирусных инфекций. Среди факторов риска развития тяжелого COVID-19 одно из первых мест занимает атипичный идиопатический (аутоиммунный) пневмофиброз [25].

В настоящее время в качестве паллиативной помощи при этом осложнении используются ингибиторы протеинкиназ с плеiotропным механизмом действия, предполагающим влияние на несколько мишеней и запускающим различные биохимические процессы, в том числе дивергенцию биохимических и патофизиологических процессов, исходящих от основной (единственной) мишени. Среди них противоопухолевые мультитаргетные ингибиторы нинтеданиба и пирфенидона с подтвержденной эффективностью при поражении легочной ткани, в том числе при идиопатическом пневмофиброзе. Причиной эффективности, в частности нинтеданиба, служит его плеiotропный эффект, заключающийся в мультитаргетном ингибировании функциональной активности не только ангиокиназы, но и других комплексов. Препарат блокирует рецепторы VEGF (VEGFR1–3), PDGFR α , - β и фактора роста фибробластов (FGFR1–3), через которые реализуется его киназная активность [26].

Таким образом, в патогенезе COVID-19 есть 2 компонента, которые реализуются на разных стадиях заболевания, но имеют в своей основе некоторые общие механизмы.

Первый — микротромбоз в легочных капиллярах. Именно тромбирование венозных капилляров легких, названное «развивающаяся приобретенная коагулопатия COVID-19», является основной причиной тяжелых осложнений и повышает риск летального исхода у пациентов, особенно находящихся на искусственной вентиляции легких [27]. Соответственно этой страте-

гии Национальное и Международное общества по изучению тромбозов и гемостаза выпустили оперативные и своевременные ответы для распознавания и лечения коагулопатии, связанной с COVID-19. Предупреждение или снижение интенсивности COVID-19-ассоциированного пневмофиброза с серьезной опасностью летального исхода — главная задача лечения, частично решаемая применением антифибротических и антитромботических киназных ингибиторов [25]. Отсутствие радикального подхода к лечению послужило отправной точкой для анализа различных стратегий антикоагуляции у пациентов с COVID-19 для формирования предложений по конкретным факторам риска коагулопатии COVID-19 и специализированным испытаниям.

Вторым патогенетическим механизмом со сходным действием является фиброз легких — намного менее изученное осложнение, которое развивается на поздних стадиях пневмонии у многих пациентов. Возможности борьбы с микротромбозом достаточно хорошо отработаны, но снижение фиброза все еще остается актуальной задачей.

Возможный эффект иматиниба при пневмонии, опосредованной COVID-19, — контроль разрушения эндотелиального барьера, индуцированного тромбином или гистамином и VEGF, что было подтверждено результатами исследования на модели мышинного сепсиса [28, 29]. В эксперименте показана также способность иматиниба снижать проницаемость эндотелия, индуцированную воспалительными агентами (VEGF, тромбином и гистамином) [30].

Потенциальный эффект иматиниба на развитие системных осложнений связан с возможностью коррекции цитокиновых реакций в виде уменьшения продукции ИЛ-6 (возможно, основного фактора патогенеза «цитокинового шторма» при COVID-19) и ИЛ-8, а также снижения активации NF- κ B в лимфоцитах, что наблюдалось на фоне лечения иматинибом пациентов с Ph⁺-хроническим миелоидным лейкозом [31]. Нормализация секреции иммунокомпетентными клетками провоспалительных ИЛ-1 β , -6, -8 и противовоспалительных ИЛ-4, -10 под действием иматиниба позволила применять его для лечения не только аллергического васкулита с эозинофильной инфильтрацией, но и аутоиммунных артритов и фиброзов легких [32]. Под действием препарата существенно уменьшается продукция ИЛ-6 с купированием развития отека легкого [33]. При этом очень важно, что иматиниб, в отличие от классических средств борьбы с «цитокиновым штормом» при COVID-19 (блокаторы ИЛ-6, дексаметазон), не является выраженным иммуносупрессантом. Напротив, иматиниб в низких дозах способен снижать микобактериальную нагрузку, имитируя врожденный иммунный ответ по типу «экстренного гемопоэза». При этом стволовые клетки и мультипотентные предшественники пролиферируют и дифференцируются в зрелые миелоидные клетки,

которые мигрируют на периферию. Подтверждением этого служит увеличение числа нейтрофилов на фоне снижения бактериальной нагрузки *Francisella* spp. (туляремиальная палочка), чувствительной к интерферонам и резистентной к антибактериальным антибиотикам [34]. Серьезную роль в развитии COVID-19-ассоциированного пневмофиброза играет локальное нарушение тромбогенеза в капиллярах легкого, выявленное в период распространения COVID-19 [18, 35–40].

Таким образом, обнаруженные в эксперименте особенности патогенеза COVID-19-ассоциированного идиопатического пневмофиброза свидетельствуют об иммуновоспалительном процессе, запускаемом активацией аутоиммунных, васкулярных, биохимических и гемостимулирующих факторов, в том числе конкретных факторов риска коагулопатии COVID-19. Снижение аутовоспаления и фибротической прогрессии с контролем тромбопоэза соответствует принципу патогенетической терапии и имеет доказательную базу в современных публикациях, показавших искомые эффекты *in vitro* и *in vivo*. Препараты, ингибирующие тирозинкиназы, продемонстрировали антифибротический и противовоспалительный эффекты на животных моделях легочного фиброза, а один из них — нинтеданиб — показал положительные результаты в 2 исследованиях III фазы у пациентов с идиопатическим пневмофиброзом.

Суммируя доказательства участия специфических ингибиторов тирозинкиназы в патогенезе идиопатического пневмофиброза, мы принимаем сформулированную ранее стратегию разработки ингибиторов тирозинкиназы в качестве одного из подходов к лечению [41]. Таким образом, иматиниб может оказаться именно тем «нормализатором воспаления», который позволит предотвратить развитие тяжелых системных повреждений при COVID-19 без серьезных побочных эффектов.

Клинические данные

Как известно, острые воспалительные изменения инициируют фиброз при различных заболеваниях, но наиболее значимы для прогноза жизни при сердечно-сосудистых заболеваниях и гипертонической болезни. При многих фиброзных осложнениях стойкий воспалительный стимулятор имеет решающее значение для блокирования программы активации заживления. Следовательно, восстановление выключения или удаление воспалительного стимулятора способно остановить прогрессирование фиброза и запустить ремоделирование тканей с восстановлением прежде всего нормальной сосудистой архитектоники. Если эти процессы носят аутоиммунный характер и не имеют нозологической специфичности, они протекают практически идентично, а их коррекция достигается препаратами, направленными на одно или несколько патогенетических звеньев, определяющих прогрессирование фиброза различного происхождения.

Примерами служат клинические наблюдения (II фаза) применения противоопухолевого препарата иматиниба мезилата у пациентов ($n = 30$) со склеродермией, осложненной идиопатическим (аутоиммунным) пневмофиброзом. Показано, что после ежедневного приема препарата в суточной дозе 400 мг у 11 % пациентов констатировали улучшение жизненной функции легких [42]. В другом исследовании у пациентов ($n = 30$) с активным пневмофиброзом, не отвечающим на циклофосфамид, 6-месячный курс иматиниба в суточной дозе 200 мг стабилизировал процесс [43]. Переносимость иматиниба в ежедневной дозе 400 мг при лечении легочных осложнений кожной системной склеродермии доказана в открытом 1-годичном клиническом исследовании II фазы ($n = 24$) [44].

Наиболее уязвимыми для развития COVID-19-ассоциированной пневмонии считаются онкологические пациенты, которые подвергаются высокому риску инфицирования и имеют более высокую вероятность тяжелого заболевания и смертности после постановки диагноза COVID-19.

Первое исследование данных пациентов ($n = 184$) с описанием клинических особенностей, результатов и факторов риска смертности у пациентов с раком и диагнозом COVID-19 было проведено недавно в Китае [45]. В данном исследовании тяжелая пневмония имела место у 25 % пациентов, госпитальная летальность составила 20 %, что значительно выше 1 % летальности неонкологических пациентов с COVID-19 в общей китайской популяции и 8 % в Ухане. Помимо количественных показателей были установлены факторы риска смерти у пациентов со злокачественными новообразованиями, которым был поставлен диагноз COVID-19. Такими факторами оказались мужской пол и проведение химиотерапии в течение 4 нед до появления симптомов пневмонии.

Второе исследование данных пациентов ($n = 205$; средний возраст 63 года; 53 % женщин) с лабораторно подтвержденным тяжелым пневмофиброзом COVID-19 на фоне ОРДС и патогистологической верификацией злокачественной опухоли проведено 13–18 марта 2020 г. в 9 больницах провинции Хубэй (Китай). У 183 (89 %) пациентов имелись солидные опухоли, в том числе 20 % — рак молочной железы, 14 % — рак толстой кишки, 12 % — рак легкого, у 11 % — гематологические злокачественные новообразования. Средняя продолжительность наблюдения составила 68 дней (межквартильный диапазон 59–78 дней). У пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями прогноз был хуже, чем у пациентов с солидными опухолями: 41 % против 31 % (*log-rank*-тест $p = 0,0009$). Многофакторный регрессионный анализ показал, что проведение химиотерапии пациентам ($n = 182$) в течение 4 нед до появления симптомов пневмофиброза и мужской пол были факторами риска смерти при поступлении в стационар ($p = 0,026$).

и $p = 0,0033$ соответственно). Все онкологические пациенты с COVID-19 имели высокий уровень летальности [45, 46].

Наиболее многочисленное исследование, включившее 2665 пациентов с COVID-19 и злокачественной патологией, позволило не только согласиться с основным выводом 2 первых протоколов о том, что наличие онкологического заболевания в анамнезе является независимым фактором риска смертности от COVID-19, но и с помощью эпидемиологического анализа определить некоторые прогностически значимые маркеры, в частности маркеры коагулопатии. Для доказательства вывода были просчитаны сравнительные показатели смертности в 2 группах: 1-я — сочетание онкологического заболевания с COVID-19; 2-я — неонкологические пациенты с диагнозом COVID-19. Смертность в этих группах составила 29,4 и 10,2 % соответственно ($p < 0,0001$). Клинические результаты у пациентов с гематологическими заболеваниями были хуже, чем у пациентов с солидными опухолями, а смертность в 2 раза выше (50 % против 26,1 %). У онкологических пациентов был более высокий риск смертности, чем у сопоставимых неонкологических пациентов (отношение шансов 2,98; 95 % доверительный интервал 1,76–5,06). Маркеры отрицательного прогноза у онкологических больных с пневмонией, ассоциированной с COVID-19, были те же, что и в общей популяции: повышение уровней ферритина, С-реактивного белка, прокальцитонина, рецепторов ИЛ-2, -6, скорости оседания эритроцитов, протромбинового времени. Авторы обращают внимание онкологов на различия между некоторыми лабораторными показателями в сравниваемых группах, что может свидетельствовать о специфических иммунных и воспалительных реакциях у онкологических пациентов с COVID-19 [46].

Несмотря на четкие выводы, сделанные на основании анализа результатов достаточно представительных групп пациентов, необходимо проанализировать возможные риски (например, действие на тромбопоэз) нового показания для назначения иматиниба онкологическим пациентам с COVID-19. Это сравнительно более высокая смертность из-за вышеприведенных факторов риска, что требует критической оценки более длительного лечения, включая возможность продолжения специфической противоопухолевой терапии, детального анализа дополнительных факторов риска, в том числе развития лекарственной устойчивости при длительном применении иматиниба в минимальных терапевтических дозах.

Кроме этого, серьезная опасность может существовать в разнонаправленном дозозависимом побочном действии иматиниба на тромбопоэз (от тромбоцитопении до тромбоцитемии), такая же опасность существует и для фиброгенеза [47]. Для открытой дискуссии на заданную тему появились обобщенные данные о всевозможных рисках лечения пациентов с COVID-19,

в том числе с онкологической патологией. В лекционном материале И.В. Поддубной и соавт. приведены рекомендации для таких состояний, а также подходы к рациональному выбору схем продолженного противоопухолевого лечения на фоне иматиниба с учетом лекарственного взаимодействия, в котором информация изложена подробно, в чрезвычайно цельной и информативной форме [48].

Заключение

Атипичная COVID-19-ассоциированная пневмония с формированием интерстициального пневмофиброза возникает аутоиммунно под действием ОРДС с тирозинкиназным механизмом активации сигнальных путей и клеточного ответа. Прогрессирование процесса приводит к снижению сатурации кислорода в периферической крови с усилением локального тромбообразования в легких с возникновением плохо управляемой гипоксии, которая в тяжелых случаях считается причиной летального исхода. Однако результаты исследований Международного общества по изучению тромбозов и гемостаза (International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH) продемонстрировали развивающуюся коагулопатию при COVID-19 [27, 49–51].

В условиях «цитокинового шторма» с активацией макрофагального звена иммунитета и коагулопатии доказанными средствами патогенетической профилактики и терапии идиопатического легочного фиброза COVID-19 являются ингибиторы специфических тирозинкиназ [52].

Показательно, что экстренно развернутые клинические исследования с изучением фиброзных последствий COVID-19 используют в качестве средств лечения ингибиторы адресных тирозинкиназ. Среди них руксолитиниб (Ruxolitinib) (NCT04362137 2020-001662-11 RUXCOVID, $n = 402$; NCT04377620 RUXCOVID-DEVENT, $n = 500$; NCT04390217, $n = 120$); барицитиниб (Baricitinib) (CT04320277, $n = 60$; NCT04393051 BARICVID-19, $n = 126$); барицитиниб + равулицумаб (Baricitinib + Ravulizumab) ($n = 1167$); тофациитиниб (Tofacitinib) (NCT04415151 I-TOMIC, $n = 60$); тофациитиниб + гидроксихлорохин (Tofacitinib + Hydroxychloroquine) (NCT04390061 2020-002035-30, $n = 116$). В рамках 3 протоколов NCT04357613 (IMAGE-19), NCT04394416 ($n = 204$) и EudraCT: 2020-001236-10 ($n = 304$) изучается ингибитор протеинтирозинкиназ противоопухолевый цитостатик иматиниб. Протоколы NCT04357613 и NCT04356495, включающие пожилых пациентов, зарегистрированы на сайте клинических исследований Национального института здоровья США (<https://clinicaltrials.gov>). В исследовании NCT04346147 иматиниб сравнивают с гидроксихлорохином, лопинавиром/ритонавиром и барицитинибом.

Воздействие на пневмофиброз с помощью известных антифибротических и тромболитических препаратов позволяет лишь частично контролировать

процесс, в том числе у онкологических пациентов. Возможность апробации известного противоопухолевого таргетного ингибитора протеинтирозинкиназы иматиниба мезилата для коррекции COVID-19-ассоциированного пневмофиброза обоснована экспериментальными и клиническими данными о наличии

антифибротического эффекта и дозозависимого тромболитического действия у этого препарата. Имеющаяся в обзоре тематическая литература позволяет оценить степень риска развития серьезных осложнений на фоне нового лечения и избежать их или уменьшить влияние на общий терапевтический процесс.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Cobbaut M., Derua R., Döppler H. et al. Differential regulation of PKD isoforms in oxidative stress conditions through phosphorylation of a conserved tyr in the P+1 loop. *Sci Rep* 2017;7(1):887. DOI: 10.1038/s41598-017-00800-w.
- Letsiou E., Rizzo A.N., Sammani S. et al. Differential and opposing effects of imatinib on LPS- and ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;308(3):L259–69. DOI: 10.1152/ajplung.00323.2014.
- Li M., Abdollahi A., Gröne H.J. et al. Late treatment with imatinib mesylate ameliorates radiation-induced lung fibrosis in a mouse model. *Radiat Oncol* 2009;6(4):1–9. DOI: 10.1186/1748-717X-4-66.
- Vuorinen K., Gao F., Oury T.D. et al. Imatinib mesylate inhibits fibrogenesis in asbestos-induced interstitial pneumonia. *Exp Lung Res* 2007;33(7):357–73. DOI: 10.1080/01902140701634827.
- Wolf A.M., Wolf D., Rumpold H. et al. The kinase inhibitor imatinib mesylate inhibits TNF α production *in vitro* and prevents TNF-dependent acute hepatic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:13622–7. DOI: 10.1073/PNAS.0501758102.
- McGonagle D., Sharif K., O'Regan A.Ch. The Role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease. *Autoimmun Rev* 2020;19(6):102537. DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102537.
- Mehta P., McAuley D.F., Brown M. et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020;395(10229):1033–4. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30630-9.
- Karakike E., Giamarellos-Bourboulis E.J. Macrophage activation-like syndrome: a distinct entity leading to early death in sepsis. *Front Immunol* 2019;10:55. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00055.
- Berlin A.A., Lukacs N.W. Treatment of cockroach allergen asthma model with imatinib attenuates airway responses. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(1):35–9. DOI: 10.1164/rccm.200403-385OC.
- Baron F., Turhan A.G., Giron-Michel J. et al. Leukemic target susceptibility to natural killer cytotoxicity: relationship with BCR-ABL expression. *Blood* 2002;99:2107–13. DOI: 10.1182/blood.v99.6.2107.
- Nakamura Y., Yamashita M., Yamauchi K., Sawai T. Effects of imatinib mesylate on pulmonary allergic vasculitis in a murine model. *Int J Rheumatic Dis* 2013;16:455–62. DOI: 10.1111/1756-185X.12075.
- Paniagua R.T., Sharpe O., Ho P.P. et al. Selective tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate for the treatment of autoimmune arthritis. *J Clin Inv* 2006;116:2633–42. DOI: 10.1172/JCI28546.
- Успенская Ю.А., Комлева Ю.К., Горина Я.В. и др. Полифункциональность CD147 и новые возможности для диагностики и терапии. *Сибирское медицинское обозрение* 2018;(4):22–30. [Uspenskaya Yu.A., Komleva Yu.K., Gorina Ya.V. et al. CD147 polyfunctionality and new diagnostic and therapy opportunities. *Sibirskoye meditsinskoye obozrenie* = Siberian Medical Review 2018;(4):22–30. (In Russ.)]. DOI: 10.20333/2500136-2018-4-22-30.
- Liang L., Major T., Bocan T. Characterization of the promoter of human extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN). *Gene* 2002;282(1): 75–86. DOI: 10.1016/S0378-1119(01)00847-2.
- Yang H., Zou W., Chen B. Overexpression of CD147 in ovarian cancer is initiated by the hypoxic microenvironment. *Cell Biol Int* 2013;37(10):1139–42. DOI: 10.1002/cbin.10131.
- Huang C., Wang Y., Li X. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395:497–506. DOI: 10.1016/S0140-736(20)30183-5.
- Vaninov N. In the eye of the COVID-19 cytokine storm. *Nat Rev Immunol* 2020 [ahead of print]. DOI: 10.1038/s41577-020-0305-6.
- Magro C.J., Mulvey J., Berlin D. et al. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: a report of five cases. *Transl Res* 2020;220:1–13. DOI: 10.1016/j.trsl.2020.04.007.
- Thille A.W., Esteban A., Fernández-Segoviano P. et al. Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: a prospective cohort study of clinical autopsies. *Lancet Respir Med* 2013;1:395–401. DOI: 10.1016/S2213-2600(13)70053-5.
- Merad M., Martin J.C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol* 2020;20(6):355–62. DOI: 10.1038/s41577-020-0331-4.
- Siddiqi H.K., Mehra M.R. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: a clinical-therapeutic staging proposal. *J Heart Lung Transplant* 2020;39:405–7. DOI: 10.1016/j.healun.2020.03.012.
- Cardinal-Fernández P., Lorente J.A., Ballén-Barragán A., Matute-Bello G. Acute respiratory distress syndrome and diffuse alveolar damage. New insights on a complex relationship. *Ann Am Thorac Soc* 2017;14:844–50. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201609-728PS.
- Pittet J.F., Griffiths M.J., Geiser T. et al. TGF- β is a critical mediator of acute lung injury. *J Clin Invest* 2001;107:1537–44. DOI: 10.1172/JCI11963.
- Cao Ch., Leng Yu., Li Ch., Kufe D. Functional interaction between the c-Abl and Arg protein-tyrosine kinases in the oxidative stress response. *J Biol Chem* 2003;11;278(15):12961–7. DOI: 10.1074/jbc.M300058200.
- George P.M., Wells A.U., Jenkins R.G. Pulmonary fibrosis and COVID-19: the potential role for antifibrotic therapy. *Lancet Respir Med* 2020(8):807–15. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30225-3.
- Cordeiro C.R., Campos P., Carvalho L. et al. Consensus document for the diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Revista Portuguesa de Pneumologia* (English Edition) 2016;22(2):112–22. DOI: 10.1016/j.rppnen.2016.01.003.
- Marchandot B., Trimaille A., Curtiaud A. et al. Thromboprophylaxis: balancing evidence and experience during the COVID-19 pandemic. *J Thromb Thrombolysis* 2020;50(4):799–808. DOI: 10.1007/s11239-020-02231-3.
- Aman J., Peters M.J., Weenink C. et al. Reversal of vascular leak with imatinib. *Am*

- J Respir Crit Care Med 2013;188:1171–3. DOI: 10.1164/rccm.201301-0136LE.
29. Aman J., van Bezu J., Damanafshan A. et al. Effective treatment of edema and endothelial barrier dysfunction with imatinib. *Circulation* 2012;126:2728–38. DOI: 10.1161/circulationaha.112.134304.
 30. Chislock E.M., Pendergast A.M. Abl family kinases regulate endothelial barrier function *in vitro* and in mice. *PLoS One* 2013;8:e85231. DOI: 10.1371/journal.pone.0085231.
 31. Ciarcia R., Vitiello M.T., Galdiero M. et al. Imatinib treatment inhibit IL-6, IL-8, NF- κ B and AP-1 production and modulate intracellular calcium in CML patients. *J Cell Physiol* 2012;227:2798–803. DOI: 10.1002/jcp.23029.
 32. Шляхтиченко Т.Ю. Цитокиновый статус в патогенезе и лечении хронической миелоидной лейкемии. Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа 2015;(3):112–9. [Shlyakhtychenko T.Yu. The cytokine status in pathogenesis and treatment of chronic myeloid leukemia. *Gematologiya. Transfuziologiya. Vostochnaya Evropa* 2015;(3):112–9. (In Russ.)].
 33. Rhee C.K., Lee S.H., Yoon H.K. et al. Effect of nilotinib on bleomycin-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis in mice. *Respiration* 2011;82:273–87. DOI: 10.1159/000327719.
 34. Napier R.J., Norris B.A., Swimm A. et al. Low doses of imatinib induce myelopoiesis and enhance host anti-microbial immunity. *PLoS Pathogens* 2015;11(3):e1004770. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004770.
 35. Klok F.A., Kruij M.J.H.A., van der Meer N.J.M. et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res* 2020;191:145–7. DOI: 10.1016/j.thromres.2020.04.013.
 36. Poissy L., Goutay J., Caplan M. et al. Pulmonary embolism in patients with COVID-19: Awareness of an Increased Prevalence. *Circulation* 2020;142(2):184–6. DOI: 10.1161/circulationaha.120.047430.
 37. Zhang Y., Meng Xiao M., Zhang Sh. et al. Coagulopathy and antiphospholipid antibodies in patients with COVID-19. *N Engl J Med* 2020;382(17):e38. DOI: 10.1056/NEJMc2007575.
 38. Fogarty H., Townsend L., Cheallagh C.N. et al. COVID19 coagulopathy in Caucasian patients. *Br J Haematol* 2020;189(6): 1044–9. DOI: 10.1111/bjh.16749.
 39. Varga Z., Flammer A.J., Steiger P. et al. Electron microscopy of SARS-CoV-2: a challenging task – Authors’ reply. *Lancet* 2020;395(10238):e100. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31185-5.
 40. Paranjpe I., Fuster V., Lala A. et al. Association of treatment dose anticoagulation with in-hospital survival among hospitalized patients with COVID-19. *J Am Coll Cardiol* 2020;76(1):122–4. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.05.001.
 41. Grimminger F., Andreas Günther A., Vancheri C. The role of tyrosine kinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2015;45(5):1426–33. DOI: 10.1183/09031936.00149614.
 42. Gomer R.H., Lupher M.L.Jr. Investigational approaches to therapies for idiopathic pulmonary Fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19(6):737–45. DOI: 10.1517/13543784.2010.484018.
 43. Fraticelli P., Gabrielli B., Pomponio G. et al. Low-dose oral imatinib in the treatment of systemic sclerosis interstitial lung disease unresponsive to cyclophosphamide: a phase II pilot study. *Arthritis Res Ther* 2014;16(4):R144. DOI: 10.1186/ar4606.
 44. Spiera R.F., Gordon J.K., Mersten J.N. et al. Imatinib mesylate (Gleevec) in the treatment of diffuse cutaneous systemic sclerosis: results of a 1-year, phase IIa, single-arm, open-label clinical trial. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1003–9. DOI: 10.1136/ard.2010.1439741003.
 45. Yang K., Sheng Yu., Huang Ch. et al. Clinical characteristics, outcomes, and risk factors for mortality in patients with cancer and COVID-19 in Hubei, China: a multicentre, retrospective, cohort study. Published online May 29, 2020. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30310-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30310-7).
 46. Meng Yi., Lu W., Guo E. et al. Cancer history is an independent risk factor for mortality in hospitalized COVID-19 patients: a propensity score-matched analysis. *J Hematol Oncol* 2020;13:75. DOI: 10.1186/s13045-020-00907-0.
 47. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04356495. Treatments to Decrease the Risk of Hospitalization or Death in Elderly Outpatients With Symptomatic SARS-CoV-2 Infection (COVID-19) (COVERAGE). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04356495>.
 48. Поддубная И.В., Сычев Д.А., Абузарова Г.Р. и др. Особенности ведения онкологических пациентов во время пандемии коронавирусной инфекции COVID-19. Учебный модуль. Версия 2 от 30.04.2020. Современная онкология 2020;22(2):56–73. [Poddubnaya I.V., Sychev D.A., Abuzarova G.R. et al. Cancer patient management during the COVID-19 pandemic. Training module. Version 2 from 30.04.2020. *Sovremennaya onkologiya = Modern Oncology* 2020;22(2):56–73. (In Russ.)]. DOI: 10.26442/18151434.2020.2.200138.
 49. Marchandot B., Sattler L., Jesel L., Matsushita K. COVID-19 related coagulopathy: a distinct entity? *J Clin Med* 2020;9:1651–5. DOI: 10.3390/jcm9061651.
 50. Hunt B., Retter A., McClintock C. Practical guidance for the prevention of thrombosis and management of coagulopathy and disseminated intravascular coagulation of patients infected with COVID-19. Available at: <https://thrombosisuk.org/downloads/T&H%20and%20COVID.pdf> (accessed on 28 April 2020).
 51. Casini A., Alberio L., Angelillo-Scherer A. et al. Thromboprophylaxis and laboratory monitoring for in-hospital patients with COVID-19—a Swiss consensus statement by the Working Party Hemostasis. *Swiss Med Wkly* 2020;150:w20247. DOI: 10.4414/smw.2020.20247.
 52. Cordeiro C.R., Campos P., Carvalho L. et al. Consensus document for the diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: Joint Consensus of Sociedade Portuguesa de Pneumologia, Sociedade Portuguesa de Radiologia e Medicina Nuclear e Sociedade Portuguesa de Anatomia Patológica. *Rev Port Pneumol* 2016;22(2):112–22. DOI: 10.1016/j.rppnen.2016.01.003

Вклад авторов

И.Н. Михайлова: разработка концепции статьи, сбор и интерпретация данных, написание текста рукописи;
 Е.М. Трещалина: разработка дизайна статьи, сбор, анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи;
 И.Ж. Шубина: интерпретация данных и подготовка текста статьи;
 И.В. Манина: сбор и интерпретация данных;
 М.В. Киселевский: разработка дизайна статьи, анализ и интерпретация данных;
 А.Н. Лукашев: разработка дизайна статьи, сбор и интерпретация данных, внесение принципиальных изменений.

Authors' contributions

I.N. Mikhaylova: development of the concept of the article, data collection and interpretation, article writing;
H.M. Treshalina: development of the article design, collection, data analysis and interpretation, article writing;
I.Zh. Shubina: data interpretation, preparation of the article text;
I.V. Manina: data collection and interpretation;
M.V. Kiselevsky: development of the article design, data analysis and interpretation;
A.N. Lukashev: development of the article design, data collection and interpretation, introduction of fundamental changes.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.Н. Михайлова / I.N. Mikhaylova: <https://orcid.org/0000-0002-7659-6045>
Е.М. Трещалина / H.M. Treshalina: <https://orcid.org/0000-0002-3878-3958>
И.Ж. Шубина / I.Zh. Shubina: <https://orcid.org/0000-0002-9374-3158>
М.В. Киселевский / M.V. Kiselevsky: <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>
А.Н. Лукашев / A.N. Lukashev: <https://orcid.org/0000-0001-7365-0352>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 07.10.2020. **Принята к публикации:** 11.12.2020.

Article submitted: 07.10.2020. **Accepted for publication:** 11.12.2020.

Молекулярно-биологические подтипы рака молочной железы у носителей мутаций в гене *BRCA1*

Н.И. Поспехова, Д.А. Головина, М.Г. Филиппова, А.В. Семьянихина, С.Л. Дранко, А.М. Данишевич, А.М. Строганова

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

Контакты: Наталья Ивановна Поспехова prospekhova@mail.ru

Введение. По данным опубликованных исследований, *BRCA1*-ассоциированный рак молочной железы (РМЖ) наиболее часто относится к тройному негативному молекулярному подтипу (triple-negative breast cancer, TNBC). Данные о соотношении других молекулярных подтипов среди этой группы пациентов различаются у разных авторов.

Цель исследования — оценить частоту различных молекулярно-биологических подтипов опухолей в российской группе больных РМЖ с мутацией в гене *BRCA1*, находившихся на лечении в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в период с 2017 по 2020 г.

Материалы и методы. В исследование были отобраны пациенты с РМЖ с наличием мутации в гене *BRCA1* ($n = 209$), выявленной в результате ДНК-диагностики при скрининге больных РМЖ. Для выявления герминальной мутации использовали ДНК пациентов, выделенную из лимфоцитов периферической крови, анализ проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. При анализе первичной документации больных были учтены клиничко-морфологические данные: возраст постановки диагноза, стадия заболевания, результаты иммуногистохимического исследования (статус рецепторов эстрогена и прогестерона, HER2 и индекс пролиферации Ki-67). На основании оценки статуса рецепторов эстрогена и прогестерона, экспрессии HER2 и значения Ki-67 определена частота 5 молекулярных подтипов опухолей.

Результаты. Проведен анализ клинических и патоморфологических данных 209 пациентов с *BRCA1*-ассоциированным РМЖ. Возраст постановки диагноза варьировал в диапазоне 23–72 лет (медиана 40 лет; среднее значение $41,46 \pm 9,82$ года). РМЖ, ассоциированный с *BRCA1*, в 71,3 % случаев относился к TNBC, в 19,1 % — к люминальному В, HER2-отрицательному (LumB–). Другие подтипы опухолей встречались значительно реже: люминальный В, HER2-положительный (LumB+) — в 7,2 % случаев, люминальный А (LumA) — в 1,0 %, HER2-положительный (HER2+) — в 1,4 %. Проведена оценка встречаемости подтипов в разных возрастных подгруппах: 1-я — больные в возрасте 23–34 лет ($n = 53$); 2-я — 35–49 лет ($n = 111$); 3-я — 50–72 лет ($n = 45$). Частота TNBC составила 81,1 % в 1-й подгруппе, 73,9 % — во 2-й и 53,4 % — в 3-й; частота LumB– составила 15,1; 15,3 и 33,3 % соответственно. При использовании критерия Фишера показано, что различия в частотах между 1-й и 3-й, а также между 2-й и 3-й подгруппами статистически значимы ($p < 0,05$).

Заключение. Во всех возрастных подгруппах пациентов с РМЖ, имеющих герминальную мутацию в гене *BRCA1*, основным молекулярным подтипом является TNBC, частота встречаемости которого ниже в старшей возрастной подгруппе. Подтип LumB– также характерен для *BRCA1*-ассоциированных опухолей, особенно у женщин старшего возраста.

Ключевые слова: мутация *BRCA1*, молекулярно-биологический подтип опухоли, рак молочной железы, тройной негативный подтип

Для цитирования: Поспехова Н.И., Головина Д.А., Филиппова М.Г. и др. Молекулярно-биологические подтипы рака молочной железы у носителей мутаций в гене *BRCA1*. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(4):29–36.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-4-29-36



Molecular biological subtypes of breast cancer in *BRCA1* mutation carriers

N.I. Pospekhova, D.A. Golovina, M.G. Filippova, A.V. Semyanikhina, S.L. Dranko, A.M. Danishevich, A.M. Stroganova

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

Background. According to the literature, *BRCA1*-associated breast cancer (BC) most often belongs to the triple negative (TNBC) molecular subtype. The data on the contribution of other molecular subtypes to this group of patients differ among different studies.

The study objective is to evaluate the frequency of different tumor molecular subtypes in BC patients with *BRCA1* gene mutation treated in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology in the period from 2017 to 2020.

Materials and methods. The study included BC patients with a mutation in the *BRCA1* gene ($n = 209$) identified as a result *BRCA1* mutation screening of patients with BC. DNA diagnostics was carried out on blood samples of patients using the real-time polymerase chain reaction method. After analyzing the patients primary documentation clinical and morphological data were taken into account: the age of diagnosis, the stage of the disease, the results of immunohistochemical studies (estrogen receptor status, progesterone receptor status, HER2 expression, Ki-67 proliferation index). The assignment to the particular molecular tumour subtypes was performed according to estrogen receptor status, progesterone receptor status, HER2 status and Ki67 value.

Results. Clinical and pathomorphological data of 209 patients with *BRCA1*-associated BC were analyzed. The age at diagnosis ranged from 23 to 72 years, the median age was 40 years, the mean age was 41.46 ± 9.82 years. BC associated with *BRCA1* was found to be TNBC

in 71.3 % and luminal B, HER2 negative (LumB–) in 19.1 % of the cases. Other tumour subtypes were much less common: luminal B, HER2 positive (LumB+) in 7.2 %, luminal A (LumA) in 1 % and HER2-positive (HER2+) in 1.4 % of the cases. The frequency of subtypes was estimated in different age groups (1st – patients 23–34 (n = 53), 2nd – 35–49 (n = 111), and 3rd – 50–72 (n = 45) years old). TNBC frequency was 81.1 % in the 1st group, 73.9 % in the 2nd and 53.4 % in the 3rd group; LumB– frequency was 15.1, 15.3 and 33.3 % respectively. Using the Fisher test it was shown that the differences in frequencies were statistically significant between groups 1st and 3rd, as well as between groups 2nd and 3rd (p < 0.05).

Conclusion. TNBC was the main molecular subtype in all age groups of BC patients with BRCA1 germinal mutation, TNBC frequency was lower in the older age group. LumB– subtype was also common in BRCA1-associated tumors especially in older women.

Key words: BRCA1 mutation, molecular tumor subtype, breast cancer, triple negative subtype

For citation: Pospekhova N.I., Golovina D.A., Filippova M.G. et al. Molecular biological subtypes of breast cancer in BRCA1 mutation carriers. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2020;7(4):29–36. (In Russ.).

Введение

Около 5–10 % случаев рака молочной железы (РМЖ) относится к наследственным формам, наиболее часто обусловленным мутациями в гене *BRCA1*. Опухоли, возникающие у носителей мутации в этом гене, обладают характерными клинико-морфологическими характеристиками. В многочисленных исследованиях показано, что в большинстве случаев такие опухоли не имеют рецепторов эстрогена (РЭ) и прогестерона (РП) и не экспрессируют белок HER2, т.е. демонстрируют тройной негативный фенотип (triple-negative breast cancer, TNBC) [1–4]. В настоящее время РМЖ классифицируют по 5 основным молекулярным подтипам, которые предоставляют прогностическую и предиктивную информацию [5, 6]:

- люминальный A (LumA);
- люминальный B, HER2-отрицательный (LumB–);
- люминальный B, HER2-положительный (LumB+);
- HER2-положительный, не люминальный (HER2+);
- TNBC.

Цель исследования — оценить частоту различных молекулярно-биологических подтипов опухолей молочной железы среди российских пациентов с РМЖ, имеющих герминальную мутацию в гене *BRCA1*.

Материалы и методы

В настоящем исследовании ретроспективно проанализированы данные 209 пациентов, находившихся на лечении в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в период с 2017 по 2020 г. с диагнозом РМЖ.

Исследуемая группа больных была сформирована на основании молекулярно-генетического анализа по определению наличия герминальной мутации в *BRCA1* при скрининге пациентов с РМЖ. ДНК-диагностику мутаций проводили с использованием лимфоцитов периферической крови пациентов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с применением набора реагентов «ОнкоГенетика BRCA» (ДНК-технология, Россия). Набор «ОнкоГенетика BRCA» предназначен для определения повторяющихся в российской популяции мутаций в гене *BRCA1* (85delAG, 2080delA, 3875del4, 3819del5, 4153delA, 5382insC, C61G) и *BRCA2* (6174delT); наименование мутаций по номенклатуре HGVS (Human Genome

Variation Society): *BRCA1* — c.66_67delAG, c.1961delA, c.3700_3704delGTAAA, c.3755_3758delTGTC, c.035delA, c.5266dupC, p.C61G; *BRCA2* — c.5946delT.

В исследование были включены 169 больных с мутацией c.5266dupC (5382insC), 34 больных с мутацией p.C61G (C61G) и 6 пациентов с другими повторяющимися мутациями (в 3 случаях — c.66_67delAG (185delAG), в 2 — c.4035delA (4153delA), в 1 — c.3700_3704delGTAAA (3819del5)).

Клинические и морфологические данные. Проведен анализ первичной документации больных. Учитывали возраст пациента на момент постановки диагноза РМЖ, стадию заболевания и результаты иммуногистохимического исследования (статусы РЭ и РП, индекс пролиферации Ki-67, экспрессию HER2). В случае неопределенного уровня экспрессии HER2 (2+) учитывали результаты флуоресцентной гибридизации *in situ*.

Молекулярные подтипы РМЖ были определены в соответствии с классификацией, представленной в Клинических рекомендациях «Рак молочной железы» Минздрава России 2018 г. [7].

Молекулярно-биологический подтип:

- 1) LumA:
 - статус РЭ положительный;
 - HER2-отрицательный статус;
 - уровень Ki-67 низкий (<20 %);
 - уровень РП высокий (>20 %);
- 2) LumB–:
 - статус РЭ положительный;
 - HER2-отрицательный статус;
 - наличие одного из следующих факторов: уровень Ki-67 высокий (>30 %); уровень РП низкий (<20 %);
- 3) LumB+:
 - статус РЭ положительный;
 - HER2-положительный статус;
 - уровень Ki-67 любой;
 - уровень РП любой;
- 4) HER2+:
 - HER2-положительный статус;
 - статусы РЭ и РП отрицательные;
- 5) TNBC:
 - отрицательные статусы РЭ, РП, HER2.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения «Медицинская статистика» (<https://medstatistic.ru/calculators>). Для сравнения возраста в подгруппах применяли двусторонний непараметрический тест Манна–Уитни. Сравнение частот в разных подгруппах выполняли с помощью критерия Фишера.

Результаты

В исследованной группе 209 больных РМЖ с герминальной мутацией в гене *BRCA1* возраст постановки диагноза варьировал от 23 до 72 лет (медиана 40 лет; среднее значение 41,46 (стандартное отклонение 9,82) года) (табл. 1). В 49,5 % случаев диагностировали II стадию РМЖ, в 30,8 % – III, в 17,3 % – I, в 2,4 % – IV. Эти характеристики также были оценены отдельно у пациентов с 2 частыми мутациями с.5266dupC и p.C61G (см. табл. 1); статистически значимых различий между этими 2 подгруппами не отмечено ($p > 0,05$).

Таблица 1. Клинические характеристики больных

Table 1. Patient clinical characteristics

Характеристика Characteristic	Всего Total	Мутация с.5266dupC с.5266dupC mutation	Мутация p.C61G p.C61G mutation
Всего пациентов Total number of patients	209	169	34
Возраст постановки диагноза, лет Age at diagnosis, years	23–72	23–67	26–72
Медиана возраста постановки диагноза (среднее значение $\pm$ стан- дартное отклоне- ние), лет Median age at diagnosis (mean $\pm$ standard deviation), years	40 (41,46 $\pm$ 9,82)	40 (41,48 $\pm$ 9,36)	39 (41,72 $\pm$ 11,03)
Число пациентов в возрасте, n (%): Number of patients aged, n (%):			
23–34 лет 23–34 years	53 (25,4)	40 (23,7)	11 (32,4)
35–49 лет 35–49 years	111 (53,1)	96 (56,8)	14 (41,2)
50–72 лет 50–72 years	45 (21,5)	33 (19,5)	9 (26,5)
Стадия, n (%): Stage, n (%):			
I	36 (17,3)	30 (17,8)	6 (17,6)
II	103 (49,5)	81 (47,9)	20 (58,9)
III	64 (30,8)	54 (31,2)	8 (23,5)
IV	5 (2,4)	4 (2,4)	–
нет данных no data	1		

Статусы РЭ, РП, HER2 были оценены во всех случаях. Опухоли, ассоциированные с *BRCA1*-мутацией, в 72,7 % случаев характеризовались отсутствием РЭ, в 77,5 % случаев – отсутствием РП, подавляющее большинство случаев (91,4 %) не экспрессировали HER2 (табл. 2).

Таблица 2. Иммуногистохимические данные опухолей

Table 2. Immunohistochemical tumor data

Характеристика Characteristic	n (%)
Статус рецепторов эстрогена: Estrogen receptor status:	
положительный positive	57 (27,3)
отрицательный negative	152 (72,7)
Статус рецепторов прогестерона: Progesterone receptor status:	
положительный positive	47 (22,5)
отрицательный negative	162 (77,5)
Уровень Ki-67: Ki-67 level:	
<20 %	8 (3,9)
≥ 20 %	197 (96,1)
нет данных no data	4
Статус HER2: HER2 status:	
отрицательный negative	191 (91,4)
положительный positive	18 (8,6)

На основании данных статусов РЭ, РП, HER2 и уровня Ki-67 был определен молекулярно-биологический подтип каждой опухоли. Большинство случаев (149 (71,3 %) из 209) представляли собой TNBC, к LumB– относились 40 (19,1 %) опухолей, к LumB+ – 15 (7,2 %), люминальный A и HER2+ встречались в 2 (1,0 %) и 3 (1,4 %) случаях соответственно (табл. 3). Частота встречаемости разных подтипов при 2 повторяющихся мутациях с.5266dupC и p.C61G имела такое же распределение без статистически значимых различий ($p > 0,05$) (см. табл. 3).

Учитывали возраст пациентов на момент постановки диагноза (диапазон, медиана, среднее значение) для каждого молекулярного подтипа (табл. 4). Несмотря на то что для TNBC средние и медианные значения возраста были ниже (40,36 и 39 лет) по сравнению с LumB– (44,33 и 43,5 года) и LumB+ (44,33 и 42 года), различия были статистически незначимы ($p > 0,05$). При объединении люминальных подтипов в одну подгруппу (LumB–, LumB+ и LumA) среднее значение и медиана возраста постановки диагноза составили

Таблица 3. Частота молекулярно-биологических подтипов опухолей в выборках больных раком молочной железы, n (%)

Table 3. Frequency of tumor molecular subtypes in breast cancer patients, n (%)

Молекулярный подтип Molecular subtype	Всего (n = 209) Total (n = 209)	Мутация с.5266dupC (n = 169) с.5266dupC mutation (n = 169)	Мутация p.C61G (n = 34) p.C61G mutation (n = 34)
TNBC	149 (71,3)	120 (71)	24 (70,6)
LumA	2 (1)	2 (1,2)	—
LumB+	15 (7,2)	13 (7,7)	2 (5,9)
LumB—	40 (19,1)	32 (18,9)	7 (20,6)
HER2+	3 (1,4)	2 (1,2)	1 (2,9)

Примечание. Здесь, в табл. 4, 5 и на рисунке: TNBC — тройной негативный молекулярный подтип рака молочной железы; LumA — люминальный A подтип; LumB+ — люминальный B, HER2-положительный подтип; LumB— — люминальный B, HER2-отрицательный подтип; HER2+ — HER2-положительный, не люминальный подтип.

Note. Here, in the tables 4, 5 and on the figure: TNBC — triple-negative breast cancer; LumA — luminal A subtype; LumB+ — luminal B, HER2-positive subtype; LumB— — luminal B, HER2-negative subtype; HER2+ — HER2-positive, non-luminal subtype.

Таблица 4. Клинические характеристики выборки для разных молекулярных подтипов рака молочной железы

Table 4. Clinical characteristics of the sample of different molecular subtypes of breast cancer

Молекулярный подтип Molecular subtype	Возраст постановки диагноза, лет Age at diagnosis, years	Медиана возраста постановки диагноза (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение), лет Median age at diagnosis (mean $\pm$ standard deviation), years	I стадия, n (%) Stage I, n (%)	II стадия, n (%) Stage II, n (%)	III стадия, n (%) Stage III, n (%)	IV стадия, n (%) Stage IV, n (%)	Нет данных, n No data, n
TNBC (n = 149)	23–72	39 (40,36 $\pm$ 9,5)	30 (20,1)	74 (49,7)	40 (26,8)	5 (3,4)	—
LumA (n = 2)	37, 61	49 (49 $\pm$ 17)	0	2	0	0	—
LumB+ (n = 15)	29–60	42 (44,33 $\pm$ 9,34)	2 (13,3)	6 (40,0)	7 (46,7)	0	—
LumB— (n = 40)	27–63	43,5 (44,33 $\pm$ 10,58)	3 (7,7)	20 (51,3)	16 (41,0)	0	1
HER2+ (n = 3)	32–45	38 (38,3 $\pm$ 6,5)	1	1	1	0	—
Все люминальные (n = 57) All luminal (n = 57)	27–63	42 (44,49 $\pm$ 10,28)	5 (8,8)	28 (49,1)	23 (40,4)	0	1

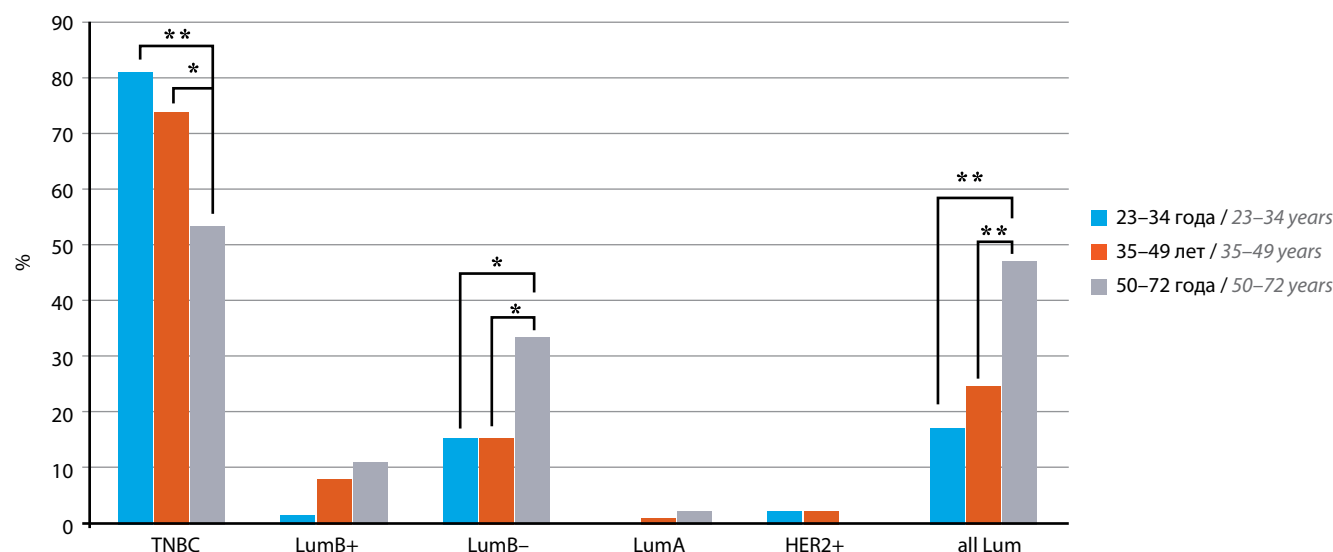
Таблица 5. Частота подтипов опухолей в разных возрастных группах больных, n (%)

Table 5. Frequencies of tumor subtypes in different patient age groups, n (%)

Молекулярный подтип Molecular subtype	23–34 года (n = 53) 23–34 years (n = 53)	35–49 лет (n = 111) 35–49 years (n = 111)	50–72 года (n = 45) 50–72 years (n = 45)
TNBC	43 (81,1)	82 (73,9)	24 (53,4)
LumB+	1 (1,9)	9 (8,1)	5 (11,1)
LumB—	8 (15,1)	17 (15,3)	15 (33,3)
LumA	0	1 (0,9)	1 (2,2)
HER2+	1 (1,9)	2 (1,8)	0
Все люминальные All luminal	9 (17)	27 (24,3)	21 (46,6)

44,49 и 42 года соответственно. При сравнении TNBC с этой подгруппой статистически значимых различий также не отмечено ($p > 0,05$) (см. табл. 4). Доля случаев

РМЖ, диагностированного на I стадии, среди подтипа TNBC была выше (20,1 %), чем при люминальных опухолях (8,8 %), и ниже для III стадии (26,8 и 40,4 %



Частота разных подтипов опухолей в 3 возрастных подгруппах больных. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. all Lum — объединенная группа люминальных подтипов
Frequency of different tumor subtypes in the three patient age groups. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. all Lum — combined group of luminal subtypes

соответственно), однако различия статистически незначимы ($p > 0,05$).

В то же время исследуемая группа больных РМЖ была разделена на 3 возрастных подгруппы: 1-я — больные в возрасте 23–34 лет; 2-я — 35–49 лет; 3-я — 50 лет и старше (50–72). Для каждой возрастной подгруппы были определены количество и частоты молекулярных подтипов опухолей (табл. 5, см. рисунок).

Частота TNBC была наибольшей в 1-й возрастной подгруппе и наименьшей в 3-й, обратную закономерность наблюдали для опухолей LumB–. Различия в частотах статистически значимы (для TNBC: 1-я и 3-я подгруппы $F = 0,0076$, 1 % уровень значимости; 2-я и 3-я подгруппы $F = 0,023$, 5 % уровень значимости; для LumB–: 1-я и 3-я подгруппы $F = 0,054$, 5 % уровень значимости; 2-я и 3-я подгруппы $F = 0,017$, 5 % уровень значимости). Частота подтипа LumB+ также увеличивалась в старших возрастных группах, однако различия статистически незначимы ($p > 0,05$). Для группы, включающей все люминальные подтипы (LumB–, LumB+ и LumA), различия в частотах среди возрастных когорт также статистически значимы (1-я и 3-я подгруппы $F = 0,002$, 1 % уровень значимости; 2-я и 3-я подгруппы $F = 0,0077$; 1 % уровень значимости) (см. рисунок).

Обсуждение

В группе больных РМЖ с наследственной мутацией в гене *BRCA1* были рассмотрены клинические данные пациентов и морфологические характеристики опухолей. Исследованные параметры (возраст постановки диагноза, статусы РЭ, РП и HER2) характерны для *BRCA1*-ассоциированного РМЖ и не отличаются для пациентов с 2 разными мутациями (с.5266dupC и р.С61G). Медиана и среднее значение возраста постановки диагноза составили 40 и 41,46 года соответственно, что аналогично данным других работ. Так,

в масштабном исследовании N. Mavaddat и соавт., включившем 3797 носителей мутации в гене *BRCA1*, медиана возраста постановки диагноза также составила 40 лет [8], в работе D. Atchley и соавт. ($n = 56$) — 42 (25–71) года [2], в работе R. El Tannouri и соавт. ($n = 91$) — 43 (22–69) года [3].

Количество опухолей с отрицательным статусом РЭ при носительстве *BRCA1*-мутации значительно выше, чем в общей группе больных РМЖ, и варьирует в диапазоне 67–88 % [2–4, 8–12]. Полученный нами показатель 72,7 % соответствует данным других работ. Отрицательный статус РП также ассоциирован с мутацией в *BRCA1*. В нашей группе 77,5 % опухолей имели отрицательный статус РП, что согласуется с результатами других исследований [2–4, 8, 10–12]. Преобладание опухолей с отрицательным статусом HER2 (87,6 %) также согласуется с данными литературы [2–4, 8, 10–12].

На основании имеющихся данных иммуногистохимического исследования дифференцировали образцы опухолей исследуемой группы по 5 молекулярным подтипам. Как и ожидалось, для *BRCA1*-ассоциированных опухолей преобладающее количество образцов относилось к TNBC (149 (71,3 %) из 209 опухолей). Вторым по частоте подтипом был LumB– (40 (19,1 %) опухолей). На долю других подтипов приходится менее 10 %. Распределение молекулярных подтипов опухолей в подгруппах с повторяющимися мутациями с.5266dupC и р.С61G аналогично. Частота TNBC в исследованной нами группе коррелирует с данными литературы. Так, в шведском исследовании с участием больных с *BRCA1*-мутацией частота TNBC составила 65 % [13], в работе S. Talhouet и соавт. — 68 % [14], среди японских пациентов — 77,6 % [15]. Похожие значения характерны и для российских пациентов. В работе А.О. Иванцова частота TNBC составила 80 %, но группа была невелика — 15 больных [16]. По данным

Е.М. Бит-Сава, этот показатель был ниже — 56,6 %, однако исследованная группа включала, помимо пациентов с мутацией в гене *BRCA1*, носителей мутаций в генах *CHEK2* и *BLM* [17].

Вторым по частоте подтипом в нашей работе был LumB— (19,1 %), а опухоли LumA встретились только в 2 (1,0 %) случаях. Эти результаты сходятся с данными ряда работ. J. Huzno и соавт. отнесли к подтипу LumB— 27 % опухолей, к LumA — 7 % [12]. В работе I. Sønderstrup и соавт. с подтипом LumB— были 21 % опухолей, LumA— 9 % [13]. В то же время в некоторых исследованиях частоты люминальных подтипов отличаются. Так, R. Naqе и соавт. определили подтип LumA в 20,7 % (25 из 121) случаев. Подобное различие, по-видимому, связано с использованием другой методики классификации: авторы работы относили к подтипу LumA опухоли с РЭ+ и/или РП+/HER2— без учета значения Ki-67. Таким образом, опухоли с высоким уровнем Ki-67, которые в нашем случае классифицировались как LumB—, в этой работе были LumA. Подтверждением этого объяснения является тот факт, что к подтипу LumB— авторы отнесли только 1 опухоль [11]. Последний, молекулярный подтип HER2+ (не люминальный) редко встречается среди *BRCA1*-носителей. Мы обнаружили только 3 (1,4 %) таких случая. В исследовании J. Huzno и соавт. не обнаружили ни одного из 76 случаев [12], I. Sønderstrup и соавт. сообщили о 6 % образцов HER2+ [13]. Таким образом, хотя TNBC превалирует у носителей мутации в гене *BRCA1*, значительная доля опухолей (в нашей группе 27,3 %) имеет иной, люминальный фенотип.

Исследуя частоту молекулярных подтипов РМЖ в разных возрастных подгруппах, мы выявили, что доля TNBC отрицательно коррелирует с возрастом постановки диагноза и, наоборот — для люминальных подтипов. Несмотря на то что медиана и средние значения возраста постановки диагноза статистически значимо не отличались для разных подтипов, наблюдались статистически значимые различия частоты их встречаемости между 1-й и 3-й, а также 2-й и 3-й возрастными подгруппами. В литературе мы не нашли аналогичных результатов анализа данных. Однако количественная оценка РЭ-положительных и РЭ-отрицательных опухолей (коррелирующая с частотой соответствующих молекулярных подтипов) в зависимости от возраста постановки диагноза имеется в ряде исследований. N. Tung и соавт. и W. Foulkes и соавт. сообщили о более высокой распространенности РЭ-положительных опухолей среди носителей *BRCA1*, у которых РМЖ был диагностирован в возрасте старше 50 лет [18, 19]. Аналогичные данные представлены в исследовании консорциума CIMBA: доля РЭ-положительных и РП-положительных опухолей возрастала с увеличением возраста постановки диагноза РМЖ среди носителей мутации в гене *BRCA1* [20].

Факторы, лежащие в основе патогенеза различных подтипов опухолей молочной железы, до сих пор пол-

ностью не изучены. N. Tung и соавт. показали, что потеря гетерозиготности с потерей аллеля *BRCA1* «дикого» типа происходит с одинаковой частотой (80 %) в РЭ-положительных и РЭ-отрицательных *BRCA1*-ассоциированных опухолях. По предположению авторов, РЭ-положительные опухоли у носителей *BRCA1* могут быть гетерогенной группой, в некоторых случаях — развивающейся в результате полной потери функции *BRCA1*, а в других — с одним интактным аллелем [21].

В недавних крупномасштабных исследованиях с помощью GWAS (Genome-Wide Association Studies, полногеномный поиск ассоциаций) идентифицировали ряд общих аллелей предрасположенности к РМЖ, которые преимущественно связаны либо с РЭ-положительным, либо с РЭ-отрицательным статусом опухоли. Ассоциации аллельных генетических вариантов (SNP) с РЭ-отрицательным и РЭ-положительным фенотипом для носителей мутации аналогичны определяемым в общей популяции [22], т. е. SNP, связанные с риском развития РЭ-отрицательной опухоли, также могут определять риск развития именно РЭ-отрицательной опухоли для носителей мутаций в *BRCA1*, предполагая, что общие механизмы лежат в основе фенотипа опухолей как у носителей мутации, так и у населения в целом. A. Mulligan и соавт. продемонстрировали различия в ассоциациях генетических модификаторов с риском развития РЭ-положительного и РЭ-отрицательного РМЖ у носителей мутаций *BRCA1* и *BRCA2*. Были показаны значительные различия в отношении шансов у носителей *BRCA1* для 2 SNP: *FGFR2* SNP (rs2981582) и *SLC4A7/NEK10* SNP (rs4973768) продемонстрировали наиболее сильную ассоциацию с РЭ-положительным РМЖ. Для РЭ-отрицательного РМЖ только rs2046210, локализованный на 6q25.1, показал статистически значимые ассоциации [20].

В то же время вклад генетических модификаторов в формирование различных фенотипов РМЖ не может объяснить показанное нами изменение доли TNBC в разных возрастных подгруппах. Предположение о том, что РЭ-положительные опухоли у больных старшего возраста не связаны с дефицитом функции *BRCA1* и являются «спорадическими», не подтверждается при геномном профилировании таких опухолей, которое выявило полную потерю *BRCA1* [23]. Фенотипическое разнообразие РМЖ у носителей мутаций в гене *BRCA1* может объясняться вкладом генетических вариантов, модифицирующих риск развития различных подтипов опухолей, возрастных физиологических изменений, а также факторов окружающей среды.

Заключение

Рак молочной железы у носителей мутаций в гене *BRCA1* значительно отличается от спорадических новообразований по своим клинико-биологическим характеристикам. Наличие герминальной патогенной мутации в генотипе пациенток с РМЖ ассоциировано

с подтипами TNBC и LumB—. Частоты встречаемости молекулярных подтипов варьируют в разных возрастных подгруппах больных. Люминальные подтипы

опухолей чаще определяют на момент манифестации заболевания у пациенток, относящихся к старшей возрастной подгруппе.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lakhani S., Van De Vijver M., Jacquemier J. et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *J Clin Oncol* 2002;20:2310–8. DOI: 10.1200/JCO.2002.09.023.
- Atchley D., Albarracin C., Lopez A. et al. Clinical and pathologic characteristics of patients with *BRCA*-positive and *BRCA*-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(26):4282–8. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.6231.
- El Tannouri R., Albuissou E., Jonveaux P., Luporsi E. Clinical and pathologic characteristics of breast cancer patients carrying the c.3481_3491del11 mutation. *Familial Cancer* 2019;18(1):1–8. DOI: 10.1007/s10689-018-0079-1.
- Musolino A., Michiara M., Bella M. et al. Molecular profile and clinical variables in *BRCA1*-positive breast cancers: a population-based study. *Tumori* 2005;91(6):505–12.
- Nielsen T., Jensen M., Burugu S. et al. High-risk premenopausal luminal A breast cancer patients derive no benefit from adjuvant cyclophosphamide-based chemotherapy: results from the DBCG77B clinical trial. *Clin Cancer Res* 2017;23:946–53. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1278.
- Sorlie T., Perou C., Tibshirani R. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869–74. DOI: 10.1073/pnas.191367098.
- http://www.oncology.ru/association/clinical-guidelines/2018/rak_molochnoy_zhelezy_pr2018.pdf.
- Mavaddat N., Barrowdale D., Andrulis I. et al. Pathology of breast and ovarian cancers among *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of *BRCA1/2* (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21(1):134–47. DOI: 10.1158/1055-9965.
- Eerola H., Heikkilä P., Tamminen A. et al. Histopathological features of breast tumours in *BRCA1*, *BRCA2* and mutation negative breast cancer families. *Breast Cancer Res* 2005;7(1):R93–100. DOI: 10.1186/bcr953.
- Comen E., Davids M., Kirchoff T. et al. Relative contributions of *BRCA1* and *BRCA2* mutations to “triple-negative” breast cancer in Ashkenazi women. *Breast Cancer Res Treat* 2011;129(1):185–90. DOI: 10.1007/s10549-011-1433-2.
- Haque R., Jiaxiao M., Telford C. et al. Survival outcomes in *BRCA1* or *BRCA2* mutation carriers and the influence of triple-negative breast cancer subtype. *Perm J* 2018;22:17–197. DOI: 10.7812/TPP/17-197.
- Husznó J., Kolosza Z. Molecular characteristics of breast cancer according to clinicopathological factors. *Mol Clin Oncol* 2019;11(2):192–200. DOI: 10.3892/mco.2019.1869.
- Sønderstrup I., Jensen M., Ejlersen D. et al. Subtypes in *BRCA*-mutated breast cancer. *Hum Pathol* 2019;84:192–201. DOI: 10.1016/j.humpath.2018.10.005.
- Talhouet S., Peron J., Vuilleumier A. et al. Clinical outcome of breast cancer in carriers of *BRCA1* and *BRCA2* mutations according to molecular subtypes. *Sci Rep* 2020;10(1):7073. DOI: 10.1038/s41598-020-63759-1.
- Yoshida R., Watanabe C., Yokoyama S. et al. Analysis of clinical characteristics of breast cancer patients with the Japanese founder mutation *BRCA1* L63X. *Oncotarget* 2019;10(35):3276–84. DOI: 10.18632/oncotarget.26852.
- Иванцов А.О. Клинические и морфологические особенности *BRCA1*-ассоциированных опухолей человека. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 2019. 50 с. [Ivantsov A.O. Clinical and morphological features of *BRCA1*-associated tumors in humans. Author's abstract dis. ... Doctor of Medical Sciences. Saint-Petersburg, 2019. 50 p. (In Russ.)].
- Бит-Сава Е.М. Молекулярно-биологическое обоснование лечения *BRCA1/CHEK2/BLM*-ассоциированного и sporadic рака молочной железы. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 2014. 48 с. [Bit-Sava E.M. Molecular and biological justification for treatment of *BRCA1/CHEK2/BLM*-associated and sporadic breast cancer. Author's abstract dis. ... Doctor of Medical Sciences. Saint-Petersburg, 2014. 48 p. (In Russ.)].
- Tung N., Wang Y., Collins L. et al. Estrogen receptor positive breast cancers in *BRCA1* mutation carriers: clinical risk factors and pathologic features. *Breast Cancer Res* 2010;12:R12. DOI: 10.1186/bcr2478.
- Foulkes W., Metcalfe K., Sun P. et al. Estrogen receptor status in *BRCA1*- and *BRCA2*-related breast cancer: the influence of age, grade, and histological type. *Clin Cancer Res* 2004;10:2029–34. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-03-1061.
- Mulligan A., Couch F., Barrowdale D. et al. Common breast cancer susceptibility alleles are associated with tumour subtypes in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of *BRCA1/2*. *Breast Cancer Res* 2011;13(6):R110. DOI: 10.1186/bcr3052.
- Tung N., Miron A., Schnitt S. et al. Prevalence and predictors of loss of wild type *BRCA1* in estrogen receptor positive and negative *BRCA1*-associated breast cancers. *Breast Cancer Res* 2010;12:R95. DOI: 10.1186/bcr2776.
- Milne R., Antoniou A. Genetic modifiers of cancer risk for *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. *Ann Oncol* 2011;22(Suppl 1):i11–7. DOI: 10.1093/annonc/mdq660.
- Lips E., Debipersad R., Scheerman C. et al. *BRCA1*-mutated estrogen receptor-positive breast cancer shows BRCAness, suggesting sensitivity to drugs targeting homologous recombination deficiency. *Clin Cancer Res* 2017;23(5):1236–41. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0198.

Вклад авторов

Н.И. Поспехова: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;
 Д.А. Головина: обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа;
 М.Г. Филиппова: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи;
 А.В. Семьянихина: анализ научной работы, получение данных для анализа;
 С.Л. Дранко, А.М. Данишевич: получение данных для анализа;
 А.М. Строганова: анализ научной работы, редактирование черновика рукописи.

Authors' contributions

N.I. Pospekhova: development of research design, review of publications on the topic of the article, writing the manuscript;
 D.A. Golovina: review of publications on the topic of the article, obtaining data for analysis;
 M.G. Filippova: development of research design, review of publications on the topic of the article;
 A.V. Semyanikhina: analysis of the article, obtaining data for analysis;
 S.L. Dranko, A.M. Danishevich: obtaining data for analysis;
 A.M. Stroganova: analysis of the article, correction of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.И. Поспехова / N.I. Pospekhova: <https://orcid.org/0000-0001-5255-5065>
 М.Г. Филиппова / M.G. Filippova: <https://orcid.org/0000-0002-1883-2214>
 А.В. Семьянихина / A.V. Semyanikhina: <https://orcid.org/0000-0001-8783-8874>
 С.Л. Дранко / S.L. Dranko: <https://orcid.org/0000-0003-3315-0817>
 А.М. Данишевич / A.M. Danishevich: <https://orcid.org/0000-0002-3573-8342>
 А.М. Строганова / A.M. Stroganova: <https://orcid.org/0000-0002-7297-5240>

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.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

Исследование цитостатических и цитотоксических свойств модифицированных пептидных ингибиторов CDK4/6, функциональных аналогов p16INK4a (90-97)

В.К. Боженко, Т.М. Кулинич, Е.А. Кудинова, А.В. Иванов, А.М. Шишкин, В.А. Солодкий

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Профсоюзная, 86

Контакты: Владимир Константинович Боженко vbojenko@mail.ru

Введение. Использование методов математического моделирования для поиска биологически активных молекул — перспективное направление современной науки. Применение численных алгоритмов для оптимизации пептидных последовательностей и методов молекулярной динамики позволило получить модифицированные пептидные последовательности, являющиеся функциональными аналогами последовательности естественного ингибитора циклиновой киназы 4/6 — p16INK4a.

Цель исследования — определение биологических свойств пептидных последовательностей, ингибиторов CDK4/6, полученных с помощью методов математического моделирования.

Материалы и методы. Исследования проведены в условиях *in vitro* на линиях опухолевых клеток (MCF-7, A549, SKOV-3, HCT116). Методом проточной цитофлуориметрии были определены уровень апоптоза, распределение клеток по фазам клеточного цикла, изменение экспрессии белка Bcl-2, изменение уровня фосфорилированного pRb при воздействии на клетки исследуемых пептидных последовательностей. С помощью биосенсорной технологии RTCA iCELLigence проведена оценка динамики пролиферации клеточных популяций.

Результаты. Пептидные последовательности, полученные с помощью методов математического моделирования, при воздействии на активно пролиферирующие клетки вызывают снижение уровня фосфорилированного pRb, снижение экспрессии Bcl-2, которые являются молекулярными «мишенями» комплекса циклинзависимая киназа 4/6—циклин D, и изменение уровней pRb и Bcl-2 может свидетельствовать об ингибировании образования комплекса. Как следствие, наблюдались снижение пролиферативной активности и увеличение уровня апоптоза в клетках. Эффективность пептидных последовательностей зависела от молекулярной структуры, типа клеточной линии, на которую происходит воздействие. Показано, что 2 исследованные модифицированные пептидные последовательности оказывают на опухолевые клетки антипролиферативный и проапоптотический эффекты в большей степени, чем исходная последовательность p16INK4a (90-97).

Заключение. Использование методов математического моделирования для поиска и разработки функционально активных молекул позволило создать пептидные последовательности, обладающие более выраженными свойствами ингибиторов циклиновых киназ, чем естественный ингибитор CDK4/6 — p16INK4a.

Ключевые слова: ингибитор циклиновых киназ, интернализуемые пептиды, циклин, метод математического моделирования

Для цитирования: Боженко В.К., Кулинич Т.М., Кудинова Е.А. и др. Исследование цитостатических и цитотоксических свойств модифицированных пептидных ингибиторов CDK4/6, функциональных аналогов p16INK4a (90-97). Успехи молекулярной онкологии 2020; 7(4):37–45.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-4-37-45



Study of cytostatic and cytotoxic characteristics of modified peptide CDK4/6 inhibitors — functional analogs of p16INK4a (90-97)

V.K. Bozhenko, T.M. Kulinich, E.A. Kudinova, A.V. Ivanov, A.M. Shishkin, V.A. Solodkiy

Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Ministry of Health of Russia; 86 Profsouznaya St., Moscow 117997, Russia

Background. Application of mathematical modeling for search for biologically active molecules is currently a promising scientific approach. Application of numerical algorithms for optimization of peptide sequences and molecular dynamics allowed to obtain modified peptide sequences that are functional analogs of the sequence of natural inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6 p16INK4a.

The study objective is to establish biological characteristics of peptide sequences of CDK 4/6 inhibitors obtained using mathematical modeling.

Materials and methods. The studies were performed *in vitro* using tumor cell lines (MCF-7, A549, SKOV-3, HCT116). Apoptosis level, cell distribution per cell cycle stages, changes in Bcl-2 expression, changes in the level of phosphorylated pRb under the effect of the studied molecules were investigated using flow cytometry. Proliferation dynamics of cell populations were studied using RTCA iCELLigence biosensor technology.

Results. Peptide sequences obtained using mathematical modeling decrease the level of phosphorylated pRb, Bcl-2 expression when applied to actively proliferating cells. These proteins serve as molecular targets for the cyclin-dependent kinase 4/6—cyclin D complex, and changes in pRb and Bcl-2 levels might indicate inhibition of complex formation. Consequently, decreased proliferative activity and increased apoptosis were observed. Effectiveness of the peptide sequences depended on their molecular structure and type of the used cell line. Two (2) of the studied modified peptide sequences have higher antiproliferative and proapoptotic effect on tumor cells than native p16INK4a (90-97) sequence.

Conclusion. Application of mathematical modeling for search and development of functionally active molecules allowed to create peptide sequences with stronger cyclin-dependent kinase inhibitor effect than p16INK4a, the native inhibitor CDK4/6.

Key words: cyclin dependent kinase inhibitor, internalized peptides (cell-penetrating peptides, CPP), cyclin, mathematical modeling method

For citation: Bozhenko V.K., Kulinich T.M., Kudinova E.A. et al. Study of cytostatic and cytotoxic characteristics of modified peptide CDK4/6 inhibitors – functional analogs of p16INK4a (90–97). *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2020;7(4):37–45. (In Russ.).

Введение

Циклинзависимые киназы (cyclin-dependent kinases, CDKs) образуют семейство гетеродимерных киназ, играющих центральную роль в регуляции клеточного цикла, транскрипции и других важных биологических процессах, включая ангиогенез, протеолиз, гемопоэз, сперматогенез, репарацию повреждений ДНК, сплайсинг, регуляцию транскрипции и т. д. [1]. Первые описания CDKs характеризовали их как направленные регуляторы роста и деления клеток, контролеры прохождения клеточного цикла через последовательное фосфорилирование субстратов [2, 3]. Однако CDKs экспрессируются и обнаруживаются на всем протяжении клеточного цикла, они неактивны в мономерной форме, но, связываясь с белками семейства циклинов, образуют функционально активные гетеродимерные комплексы [4, 5]. В то же время циклины, «партнеры» CDKs, имеют разный концентрационный уровень в различных фазах клеточного цикла, т. е. пространственно-временные профили активности комплексов CDK–циклин, регулируются именно циклинами [6]. Изменение уровней экспрессии и деградации циклинов, а также их структурные и молекулярные особенности обеспечивают способность и своевременное взаимодействие с CDKs и тем самым определяют упорядоченное формирование различных последовательных комплексов CDK–циклин на протяжении клеточного цикла.

Важную функцию регуляторов процессов пролиферации несут ингибиторы циклиновых киназ (CKIs). В настоящее время описано большое количество так называемых структурных CKIs. Наиболее изученными CKIs являются белки 2 семейств – INK4 и CIP/KIP, при взаимодействии CKIs с CDKs происходят конформационные трансформации последних, что препятствует образованию комплексов CDK–циклин [7]. Дисрегуляция циклиновых комплексов отмечается при многих типах онкологических заболеваний, что приводит к нарушению координации клеточного цикла и процессов пролиферации, способствует бесконтрольному клеточному росту [8]. Фактически вместе с мутациями в протоонкогенах мутации, приводящие к гиперактивации CDKs, наиболее часто обнаруживаются в геноме опухолей. Такие мутации обеспечивают клеткам преимущество в росте, а мутации генов-супрессоров опухоли или генов, ответственных за прохождение контрольных точек (checkpoint), приводят к отсутствию контроля пролиферации [2, 9].

Структура и молекулярные механизмы регуляции CDKs достаточно хорошо изучены и описаны в настоящее время, являются научной основой для поиска и разработки лекарственных препаратов – ингибиторов CDKs. Однако большинство CDKs представляют собой трудно уязвимую терапевтическую мишень в силу своих структурных особенностей [10, 11]. Ранее нами была разработана стратегия, объединяющая методы компьютерного моделирования, белкового докинга и молекулярной динамики, направленная на поиск биологически активных пептидных конструкций, в частности ингибиторов CDK4/6 [12, 13].

С помощью методов математического моделирования нам удалось минимизировать исходную функциональную последовательность из ингибитора комплекса CDK4/6–циклин D–p16INK4a. Поисковый анализ оптимальной пептидной последовательности выполняли с помощью программной реализации модели полноатомной молекулярной динамики в неявном и явном растворителях, интеграции разработанных моделей в единую гетерогенную вычислительную систему, проведение численных расчетов – с использованием разработанной гетерогенной вычислительной системы для оптимизации пептидных последовательностей на основе белка p16INK4a. Далее с помощью метода нормальных мод был проведен анализ комплекса p16INK4a–CDK6–циклин D, что позволило найти его собственные частоты и, используя эти значения при анализе комплексомодифицированной последовательности CDK6–циклин D, рассчитать свободную энергию связи (док-баллы) для каждой из анализируемых последовательностей (всего проанализировано 40 вариантов). На основании проведенных расчетов выбраны 4 пептидные последовательности с наиболее высокими значениями энергии взаимодействия с CDK6. Данные последовательности были синтезированы, и результаты экспериментов по изучению их эффектов представлены в настоящей статье.

Цель исследования – определение биологических свойств пептидных последовательностей, ингибиторов CDK4/6, полученных с помощью методов математического моделирования.

Материалы и методы

Объектом исследования явились 4 пептидных последовательности (F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2),

потенциальные ингибиторы образования комплекса CDK4/6–циклин D, полученные с помощью методов математического моделирования. Сравнение биологических свойств проведено с пептидом, функциональным фрагментом p16INK4a (90-97) [14, 15]. Для обеспечения внутриклеточного транспорта все исследуемые последовательности включали CPP (cell-penetrating peptide) – Antennapedia (Antp).

Исследование проводили *in vitro* на культивируемых клетках линий опухолей человека: MCF-7 (рак молочной железы), A549 (аденокарцинома легкого), SKOV-3 (рак яичника) и HCT116 (аденокарцинома толстой кишки). Клетки культивировали в стандартных условиях: 37 °C, 5 % CO₂, среда DMEM (ПанЭко), содержащая 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (ПанЭко), 50 мкг/мл гентамицина и 2 мМ L-глутамина. Пересев клеток осуществляли таким образом, чтобы на момент добавления к среде исследуемых пептидных последовательностей конфлюэнтность составляла 40–50 %.

Анализ выполняли на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Для определения уровня апоптоза и некроза использовали набор AnnexinV-FITC Kit – Apoptosis Detection Kit (Beckman Coulter, Inc, Франция). В качестве методов оценки эффективности модифицированных последовательностей с помощью моноклональных антител было проведено определение уровня белка Bcl-2 (Anti Human Bcl-2) (Caltag Laboratories, США) и уровня гипофосфорилированного pRb (Mouse anti-Rb (pS780); Becton, Dickinson and Company, США). Фиксацию и окраску образцов проводили в соответствии с указаниями инструкций к антителам.

Для анализа фаз клеточного цикла выполняли предварительную синхронизацию культур методом обедненной культуральной среды (24 ч 1 % ЭТС) [16], в образцах оценивали процентное распределение клеток в фазах клеточного цикла по содержанию ДНК, окраске фиксированных образцов раствором пропидия йодида. Анализ ДНК-гистограмм проводили с помощью программы ModFit 3.0.

Динамику пролиферации клеточных популяций оценивали с помощью биосенсорной технологии RTCA iCELLigence (ACEA Biosciences) по изменению показателя «клеточный индекс». Принцип метода основан на измерении клеточного сопротивления электродами, располагающимися на дне лунки планшета. В присутствии клеток они присоединяются к сенсорной поверхности электрода и действуют как изолятор, что приводит к изменению локального ионного окружения на границе раствора/электрода и увеличению сопротивления. Таким образом, чем больше клеток располагается на электроде, тем сильнее меняется сопротивление этого электрода. Основным показателем, который оценивали методом RTCA iCELLigence, является клеточный индекс (КИ), рассчитываемый по формуле:

$$\text{КИ} = \frac{(\text{импеданс в определенный момент времени } n) - (\text{импеданс в отсутствие клеток})}{(\text{номинальное значение импеданса})}.$$

Значения импеданса зависят от количества адгезированных клеток, их размера и формы, а также от силы адгезии к субстрату.

Анализ и статистическую обработку результатов проводили с помощью функций пакетов анализа Microsoft Excel 2016 и Statistic 10. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Исследование проапоптотической активности. Показано, что пептидные последовательности p16INK4a-Antp, F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2 увеличивают уровень апоптоза в культурах пролиферирующих клеток. При внесении контрольной последовательности p16INK4a-Antp в концентрации 10 мкМ и инкубации в течение 24 ч увеличение уровня апоптоза наблюдалось в пределах $5 \pm 1,6$ %, при концентрации 40 мкМ уровень апоптоза возрастал до $34 \pm 7,4$ %. Исследуемые пептидные последовательности в концентрациях 10 и 40 мкМ вызывали увеличение уровня апоптоза в культурах опухолевых клеток, однако уровень апоптоза зависел как от структуры пептидной последовательности, так и от типа клеточной линии. На рис. 1 представлены диаграммы изменения уровня апоптоза в культурах HCT116 и MCF-7 относительно контрольного значения – апоптоза, индуцированного внесением последовательности p16INK4a-Antp. Наибольший проапоптотический эффект на исследуемые клетки оказывали последовательности F26K-1 и F26K-2. Так, при инкубации клеток линии HCT116 с последовательностью F26K-2 (10 мкМ) уровень апоптоза более чем в 4 раза выше, чем при инкубации с исходной последовательностью p16INK4a-Antp (10 мкМ) (см. рис. 1а).

При исследовании уровня апоптоза клеток линии MCF-7 (см. рис. 1б) показана большая их чувствительность к воздействию естественного ингибитора CDK4/6 (p16INK4a-Antp), уровень апоптоза при инкубации в течение 24 ч с p16INK4a-Antp в концентрации 10 мкМ составил $24 \pm 2,9$ %, что статистически значимо выше, чем при воздействии p16INK4a-Antp в той же дозе на клетки HCT116 ($5 \pm 1,6$ %). Искусственные ингибиторы CDK4/6 (F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2) в концентрации 10 мкМ оказывали меньший проапоптотический эффект, чем p16INK4a-Antp. Более высокий уровень апоптоза наблюдался только при воздействии последовательностей F26K-1 и F26K-2 в концентрации 40 мкМ. Апоптоз, индуцируемый последовательностями W26K-1, W26K-2, в обеих исследуемых концентрациях был ниже, чем при воздействии последовательности естественного ингибитора CDK4/6.

Таким образом, для культур HCT116 и MCF-7 было получено, что пептидная последовательность

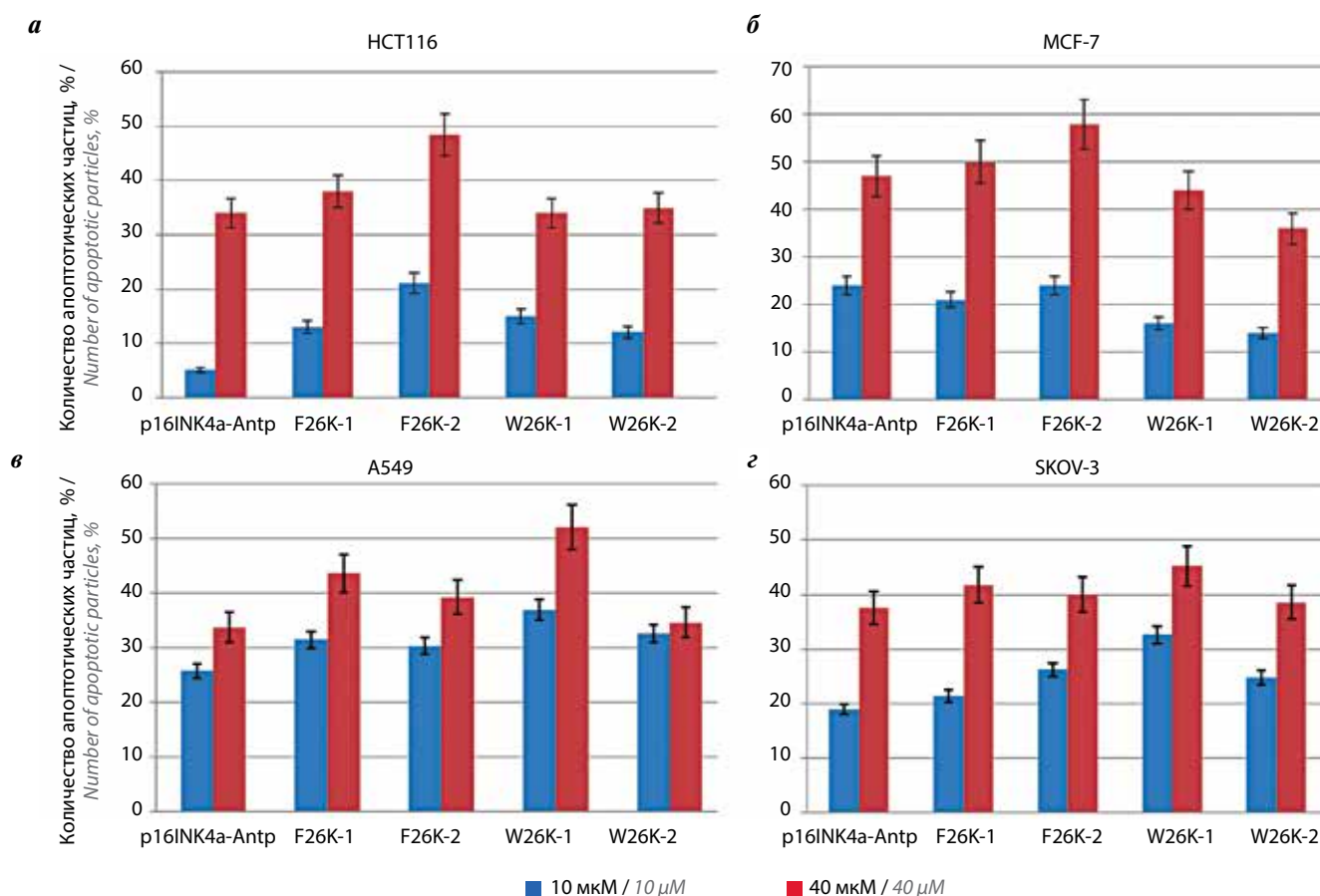


Рис. 1. Сравнение уровней апоптоза в культурах клеток HCT116 (а), MCF-7 (б), A549 (в) и SKOV-3 (г) при инкубации с естественным ингибитором CDK4/6 (p16INK4a-Antp) и пептидными последовательностями, полученными с помощью методов математического моделирования (F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2), искусственными ингибиторами CDK4/6, в концентрациях 10 и 40 мкМ. Время инкубации 24 ч

Fig. 1. Comparison of apoptosis levels in cultures of HCT116 (a), MCF-7 (б), A549 (в) and SKOV-3 (г) cells incubated with native CDK4/6 inhibitor CDK4/6 (p16INK4a-Antp) and artificial CDK 4/6 inhibitors — peptide sequences obtained using mathematical modeling (F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2); concentrations were 10 and 40 μM. Duration of incubation was 24 hours

F26K-2 (H-Phe-Leu-Asp-Ala-Ile-Leu-Leu-Ile-Ahx) обладает наиболее выраженным проапоптотическим действием по сравнению с естественным ингибитором CDK4/6—циклин D (p16INK4a-Antp) и другими исследованными последовательностями.

При исследовании проапоптотического эффекта пептидных последовательностей на культуры A549 и SKOV-3 показано, что в отношении данных культур наибольшую эффективность оказывают последовательности F26K-1 и W26K-1 (см. рис. 1в, г). Так, для культуры A549 при концентрации последовательностей 40 мкМ и времени инкубации 24 ч уровень апоптоза имел значения $43,5 \pm 4,8$ и $52,1 \pm 5,7$ % соответственно для последовательностей F26K-1 и W26K-1; при воздействии на клетки p16INK4a-Antp уровень апоптоза составил $33,8 \pm 8,4$ %. Уровень апоптоза клеток линии SKOV-3 повышался до $41,8 \pm 6,2$ % при 24-часовой инкубации с F26K-1 (40 мкМ) и до $45,2 \pm 8,9$ % при воздействии W26K-1 (40 мкМ); количество апоптотических частиц в образцах, инкубированных в течение 24 ч с контрольной последовательностью p16INK4a-Antp (40 мкМ), составило $37,6 \pm 5$ %.

Исследование цитостатического эффекта. Анализ цитостатической активности исследуемых ингибиторов CDK4/6 проводили на предварительно синхронизированных в G_0 -фазе клетках, исследуемые пептиды вносили в культуральную среду одновременно со снятием блока синхронизации. Изменения пролиферативной активности клеток оценивали методом проточной цитометрии и с помощью системы RTCA iCELLigence. Оценка ДНК-гистограмм распределения клеток по фазам клеточного цикла, полученных с помощью метода проточной цитофлуориметрии, показала, что исследуемые последовательности, ингибиторы CDK4/6, способны снижать пролиферативную активность делящихся клеток (см. таблицу, рис. 2а, б).

Данный эффект выражается в снижении количества клеток в фазах клеточного цикла S и G_2 /M, причем наибольшие различия обнаружены между значениями S-фазы опытных образцов и контрольных образцов после 6 ч снятия блока синхронизации и инкубации опытных образцов с исследуемыми последовательностями. В образцах негативного контроля (без воздействия исследуемых последовательностей)

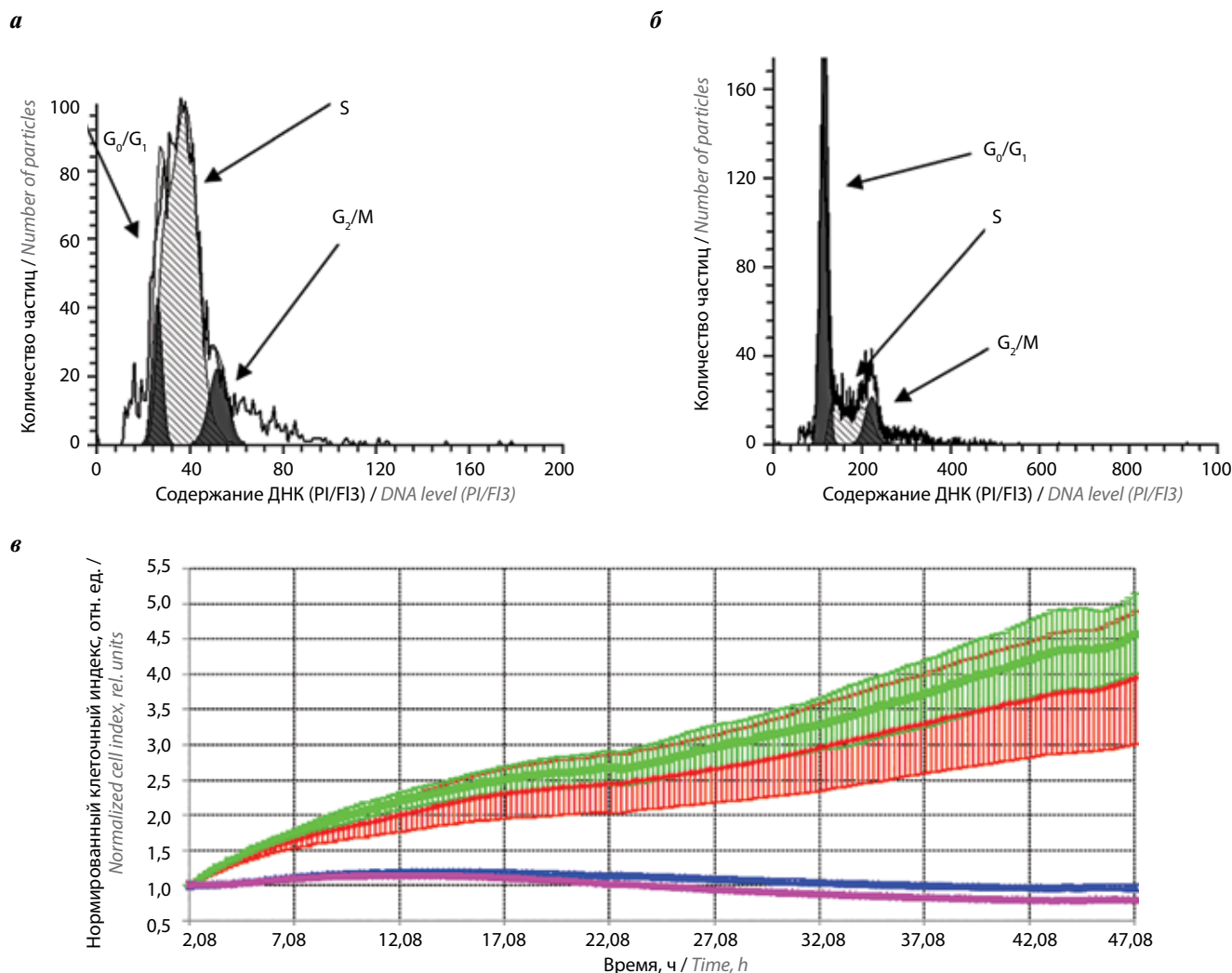


Рис. 2. Изменение пролиферативной активности клеток культур MCF-7 и A549 при воздействии исследуемых пептидных ингибиторов CDK4/6: а – гистограмма распределения клеток по фазам клеточного цикла в контрольных образцах линии MCF-7 через 6 ч после снятия блока синхронизации (G_0/G_1 –10,52 %; G_2/M – 10,84 %; S-фаза – 78,63 %); б – гистограмма распределения клеток по фазам клеточного цикла в образцах линии MCF-7 при воздействии пептидной последовательности F26K-2 в концентрации 40 мкМ через 6 ч после снятия блока синхронизации (G_0/G_1 –71,97 %; G_2/M – 8,76 %; S-фаза – 19,27 %); в – изменение нормированного клеточного индекса, определяемого с помощью биосенсорной технологии RTCA iCELLigence. По оси ординат – показатель «клеточный индекс», определяемый на основе непрерывного измерения импеданса в ячейке с клеточной культурой A549. Красная кривая соответствует интактной культуре (негативный контроль), зеленая – культуре с добавлением CPP (cell-penetrating peptide) – Antennapedia – интернализуемого вектора (10 мкМ), синяя – последовательность F26K-2 (10 мкМ), сиреневая – W26K-2 (10 мкМ)

Fig. 2. Changes in proliferative activity of MCF-7 and A549 cell cultures under the effect of the studied peptide CDK 4/6 inhibitors: а – histogram of cell distribution per cell cycle stages in the control samples of MCF-7 line 6 hours after synchronization block removal (G_0/G_1 –10.52 %; G_2/M – 10.84 %; S-phase – 78.63 %); б – histogram of cell distribution per cell cycle stages in the MCF-7 cell line under the effect of 40 μM of F26K-2 6 hours after synchronization block removal (G_0/G_1 –71.97 %; G_2/M – 8.76 %; S-phase – 19.27 %); в – changes in normalized cell index determined using RTCA iCELLigence biosensor technology. Y-axis – cell index determined using continuous impedance measurement in a well with A549 cell culture. Red line shows intact culture (negative control), green – culture with CPP (cell-penetrating peptide) – Antennapedia – internalization vector (10 μM), blue – F26K-2 sequence (10 μM), purple – W26K-2 (10 μM)

в интервале от 0 до 6 ч после снятия блока синхронизации был отмечен рост количества клеток в S-фазе от $4,6 \pm 3$ % в нулевой точке до $71,3 \pm 6,5$ % через 6 ч, после чего наступало снижение уровня S-фазы (см. таблицу).

При добавлении исследуемых пептидных последовательностей в концентрации 40 мкМ средний уровень S-фазы после 6 ч инкубации составил $19,2 \pm 4$ %, причем достоверных различий между значениями для разных последовательностей и исследуемых

клеточных культур не отмечено. При исследовании воздействия концентрации 10 мкМ с помощью метода проточной цитометрии значимых различий между негативным контролем и опытными образцами не получено.

Анализ распределения популяций по фазам клеточного цикла показал, что внесение в культуральную среду исследуемых последовательностей приводит к задержке «входа» клеток в S-фазу. Если в образцах негативного контроля (не подвергшихся воздействию

Средние значения количества клеток в S-фазе клеточного цикла в зависимости от времени инкубации в культурах HCT116, MCF-7, A549, SKOV-3 при воздействии пептидных последовательностей, ингибиторов CDK6, в концентрации 40 мкМ, %

Mean cell numbers in the S-phase depending on incubation time in HCT116, MCF-7, A549, SKOV-3 cell lines under the effect of 40 μM of peptide sequences – CDK6 inhibitors, %

Клеточная культура Cell line	Пептидная последовательность, концентрация, мкМ Peptide sequence concentration, μM	Время инкубации, ч Incubation time, h						
		0	2	4	6	8	10	12
HCT116	Негативный контроль Negative control	5,2	17,8	36,1	62,8	42,1	38,1	29,4
	p16INK4a, 40	2,6	3,2	10,6	21,5	39,5	33,1	16,05
	F26K-1, 40	4,8	4,2	8,4	19,7	34,2	26,2	14,05
	F26K-2, 40	5,3	2,8	9,1	24,7	43,5	31,6	16,9
	W26K-1, 40	1,9	5,6	10,5	25	40,2	31,6	17,75
	W26K-2, 40	3,1	3,1	11,2	22,4	42,6	35,9	16,8
MCF-7	Негативный контроль Negative control	5,6	16,2	42,1	78,6	54,1	28,1	40,3
	p16INK4a, 40	3,7	6,5	12,6	17,5	32,4	32,5	12,05
	F26K-1, 40	4,2	4,8	15,8	16	21,6	28,4	15,9
	F26K-2, 40	6,9	5,6	12,3	19,3	30,2	32,2	15,8
	W26K-1, 40	3,3	3,9	11,4	18,3	26,4	27,4	12,35
	W26K-2, 40	4,8	6,1	12,2	16,4	32,8	26,4	14,3
A549	Негативный контроль Negative control	2,4	9,7	32,9	71,2	43,2	25,7	32,5
	p16INK4a, 40	3,7	6,1	13,8	21,5	32,6	33,6	17,65
	F26K-1, 40	6,1	7,2	10,6	16,3	21,6	28,9	13,45
	F26K-2, 40	4,2	5,3	14,3	19,4	29,5	29	16,85
	W26K-1, 40	6,4	6,6	13,5	21,3	31,4	35,1	17,4
	W26K-2, 40	3,1	5,7	14,6	23,2	29,7	31,5	18,9
SKOV-3	Негативный контроль Negative control	4,3	14,2	32,5	72,5	45,1	35,6	35,4
	p16INK4a, 40	4,6	3,9	13,6	19,5	32,7	36,1	16,55
	F26K-1, 40	7,2	3,6	12,1	18,3	33,4	35	15,2
	F26K-2, 40	5,4	5,1	12,9	16,2	41,5	38,4	14,55
	W26K-1, 40	6,6	3,8	10,4	21,2	42,2	41,9	15,8
	W26K-2, 40	5,3	4,3	13,7	16,9	39,4	32,1	15,3

исследуемых последовательностей) доля клеток в S-фазе начинает возрастать сразу после снятия блока синхронизации и увеличивается с $4,4 \pm 1,4$ % в нулевой точке до $14,5 \pm 3,5$ % через 2 ч, то в опытных образцах с пептидными ингибиторами CDK6 доля популяции клеток в S-фазе возрастает только через 8 ч после исключения синхронизирующего фактора. Таким образом, определена задержка на уровне первой рестрикционной точки, переход G_1 –S. В исследова-

ниях изменений распределения клеток по фазам клеточного цикла, проведенных методом проточной цитометрии, не выявлено значимых различий между воздействием пептидных последовательностей.

С помощью биосенсорной технологии RTCA iCELLigence было показано достоверное различие в пролиферативной активности клеток, подвергшихся воздействию исследуемых ингибиторов CDK6. На рис. 2в представлен пример графика изменения

нормированного клеточного индекса, определяемого с помощью биосенсорной технологии RTCA iCELLigence. Показано, что последовательности F26K-2, W26K-2 в концентрации 10 мкМ способны вызывать угнетение пролиферации, выражающееся в отсутствии роста показателя клеточного индекса, данный эффект был

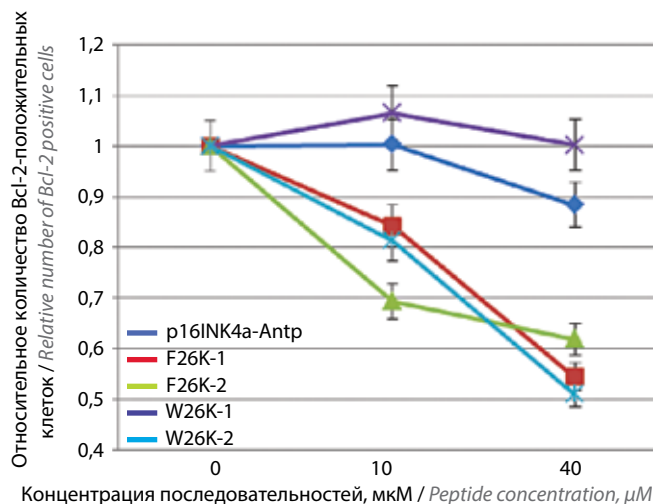


Рис. 3. Изменение относительного уровня экспрессии белка Bcl-2 в клетках линии HCT116 при инкубации с последовательностями p16INK4a-Antp, F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2. За «1» принято значение уровня Bcl-2 в образцах негативного контроля, не подвергшихся воздействию исследуемых пептидных последовательностей — ингибиторов CDK4/6. Время инкубации 24 ч

Fig. 3. Changes in relative expression level of Bcl-2 in HCT116 cell line after incubation with p16INK4a-Antp, F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2 sequences. Level of Bcl-2 in negative control samples without treatment with the studied peptide sequences — CDK4/6 inhibitors are denoted as 1. Incubation time was 24 h

продемонстрирован для всех исследуемых клеточных культур. Последовательности F26K-1 и W26K-1 также оказывали цитостатический эффект, выражающийся в снижении клеточного индекса, однако при концентрации 10 мкМ эффект был слабее и происходило незначительное увеличение клеточного индекса (от 1,5 до 1,8). При концентрации 40 мкМ последовательности F26K-1 и W26K-1 оказывали стойкий цитостатический эффект.

Оценка специфической эффективности пептидных ингибиторов CDK6. Исследование специфической эффективности пептидных ингибиторов CDK6 включало определение уровня белка Bcl-2 и уровня фосфорилированного pRb в клетках HCT116. Культура HCT116 была выбрана на основании ранее проведенных собственных исследований и данных литературы, показывающих, что пролиферация клеток HCT116 эффективно блокируется ингибиторами CDKs, в том числе p16INK4a [17, 18]. Методом проточной цитофлуориметрии была проведена оценка изменения уровня белка Bcl-2 в клетках линии HCT116. Показано, что последовательности F26K-1, F26K-2, W26K-2 способны ингибировать экспрессию белка Bcl-2, достоверно снижая уровень Bcl-2 более чем на 20 % (рис. 3). Для последовательностей p16INK4a-Antp и W26K-1 в концентрациях 10 и 40 мкМ не получено достоверных различий в уровне Bcl-2 по сравнению с негативным контролем.

Результаты проведенного исследования изменения уровня фосфорилированного pRb при воздействии на клетки HCT116 пептидных ингибиторов CDK4/6 показали, что все исследуемые последовательности

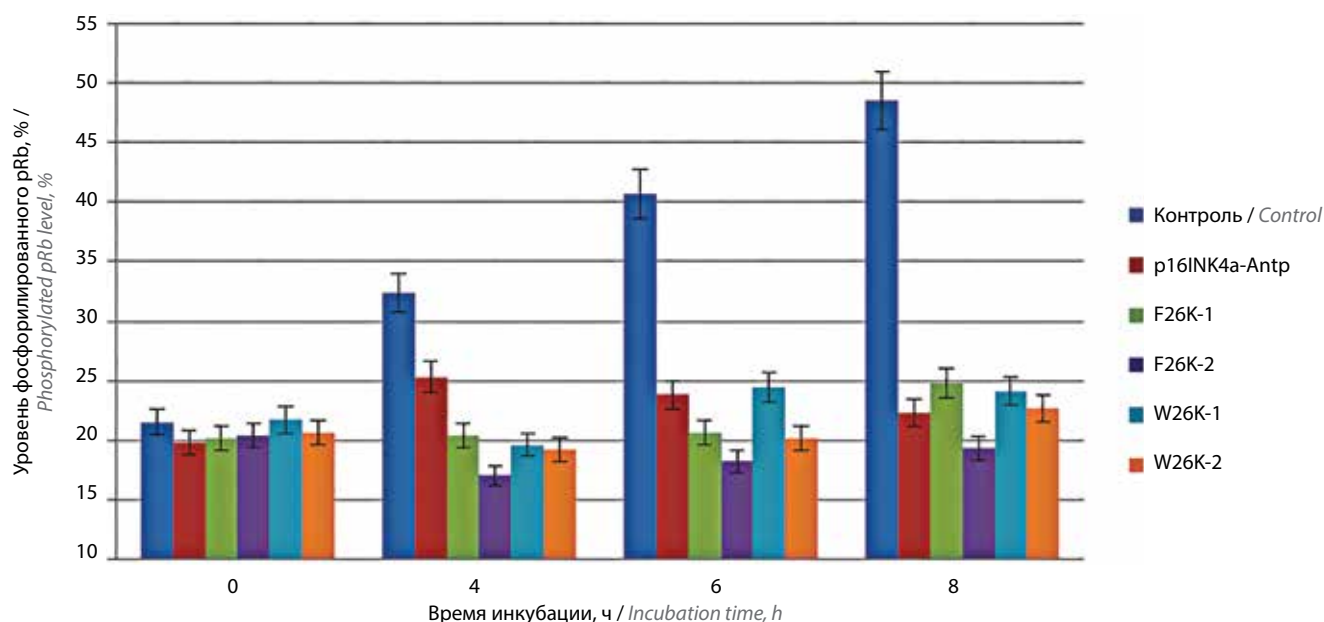


Рис. 4. Оценка изменений уровня фосфорилированного pRb в клетках линии HCT116 при воздействии пептидных последовательностей p16INK4a-Antp, F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2 в концентрациях 40 мкМ. Анализ проведен через 4, 6 и 8 ч после снятия блока синхронизации

Fig. 4. Evaluation of the changes in phosphorylated pRb levels in HCT116 cell line under the effect of 40 μM of p16INK4a-Antp, F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2 peptides. Analysis was performed 4, 6 and 8 h after synchronization block removal

(p16INK4a-Antp, F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2) ингибируют процессы фосфорилирования pRb. Уровень фосфорилированного pRb в клетках негативного контроля достоверно возрастал после снятия блока синхронизации и увеличивался с $21,5 \pm 4,2$ % в нулевой точке до $48,5 \pm 7,2$ % после 8 ч инкубации. В образцах с пептидными последовательностями показано отсутствие достоверных изменений уровня pRb в течение 8 ч инкубации, уровень фосфорилированного pRb в опытных образцах составил $20,6 \pm 2,6$ % (рис. 4).

Результаты изменений экспрессии Bcl-2 и pRb, увеличение уровня апоптоза и замедление процессов пролиферации, индуцируемые внесением в культуральную среду исследуемых пептидных последовательностей — ингибиторов образования комплекса CDK4/6—циклин D, могут свидетельствовать о их направленном воздействии на активность CDKs.

Обсуждение

Таким образом, в ходе проведенных исследований показано, что исследованные пептидные последовательности (F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2), полученные с помощью методов математического моделирования, ингибируют мишень комплекса CDK4/6—циклин D—pRb и, как следствие, оказывают цитостатический эффект на пролиферирующие клетки. Полученные результаты позволяют утверждать, что дан-

ные последовательности обладают специфическими свойствами исходной биологической последовательности — функционального фрагмента p16INK4a — и являются эффективными ингибиторами CDK4/6 [19, 20]. Полученные результаты также показали, что эффективность искусственных ингибиторов CDKs во многом зависит от структуры пептидной последовательности, а также от типа исследуемой клеточной линии и имеет четкую концентрационную зависимость. При сравнении проапоптотических и цитостатических свойств установлено, что W26K-1 является наиболее слабой последовательностью, остальные пептиды (F26K-1, F26K-2, W26K-2) по эффективности превосходят естественный ингибитор CDK4/6 — функциональный фрагмент p16INK4a.

Заключение

Показана перспективность использования методов математического моделирования для поиска и разработки функционально активных пептидных молекул. Полученные модифицированные пептидные последовательности (8 аминокислот) не только обладают свойствами CKIs, но и превосходят по эффективности естественный ингибитор p16INK4a, что позволяет рассматривать их как потенциальные кандидаты при разработке таргетных противоопухолевых препаратов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ding L., Cao J., Lin W. et al. The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer. *Int J Mol Sci* 2020;21(6):1960. DOI: 10.3390/ijms21061960.
- Ермак А.В., Ефременко Е.С. Циклины и циклинзависимые киназы. Роль в развитии опухолевых заболеваний. Новое слово в науке и практике: гипотезы и апробация результатов исследований. Сборник материалов XXX Международной научно-практической конференции. Под общ. ред. С.С. Чернова. 2017. [Ermak A.V., Efremenko E.S. Cyclins and cyclin-dependent kinases. Role in development of tumors. Advances in science and practical applications: hypotheses and approbation of research results. Proceedings of the XXX international scientific and practical conference. General ed. S.S. Chernov, 2017. (In Russ.)].
- Asghar U., Witkiewicz A.K., Turner N.C., Knudsen E.S. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14(2):130–46. DOI: 10.1038/nrd44504.
- Chung M., Liu C., Yang H.W. et al. Transient hysteresis in CDK4/6 activity underlies passage of the restriction point in G1. *Mol Cell* 2019;76(4):562–73.e4. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.08.020.
- Kernan J., Bonacci T., Emanuele M.J. Who guards the guardian? Mechanisms that restrain APC/C during the cell cycle. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018;1865(12):1924–33. DOI: 10.1016/j.bbamer.2018.09.011.
- Palou R., Malik A., Palou G. et al. G1 cyclin driven DNA replication. *Cell Cycle* 2015;14(24):3842–50. DOI: 10.1080/15384101.2015.1070995.
- Cuomo M.E., Platt G.M., Pearl L.H., Mittnacht S. Cyclin-cyclin-dependent kinase regulatory response is linked to substrate recognition. *J Biol Chem* 2011;286(11):9713–25. DOI: 10.1074/jbc.M110.173872.
- Galbraith M.D., Bender H., Espinosa J.M. Therapeutic targeting of transcriptional cyclin-dependent kinases. *Transcription* 2019;10(2):118–36. DOI: 10.1080/21541264.2018.1539615.
- Goel S., DeCristo M.J., Watt A.C. et al. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature* 2017;548(7668):471–5. DOI: 10.1038/nature23465.
- Martin M.P., Endicott J.A., Noble M.E.M. Structure-based discovery of cyclin-dependent protein kinase inhibitors. *Essays Biochem* 2017;61(5):439–52. DOI: 10.1042/EBC20170040.
- Li Z., Ivanov A.A., Su R. et al. The OncoPPI network of cancer-focused protein-protein interactions to inform biological insights and therapeutic strategies. *Nat Commun* 2017;8:14356. DOI: 10.1038/ncomms14356.
- Kazennov A., Alekseenko A., Bozhenko V. et al. Evaluation of CDK6 and p16/INK4a-derived peptides interaction. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Computat Mol Sci* 2013;3:53.
- Bozhenko V.K., Kulinich T.M., Kudina E.A. New targeted anti CDK4. *J Clin Oncol* 2013;31:e13545.
- Кулинич Т.М., Боженко В.К. Исследование особенности активации апоптоза пептидом — ингибитором циклиновых киназ MM-D37K в клетках линии аденокарциномы толстой кишки HT29. Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии 2015;15(3):3. [Kulinich T.M., Bozhenko V.K. Investigation of apoptosis activation by MM-D37K cyclin kinase inhibitor peptide in colon adenocarcinoma HT29 cells.

- Vestnik Rossiyskogo nauchnogo tsentra rentgenoradiologii = Bulletin of the Russian Scientific Center of Roentgenoradiology 2015;15(3):3. (In Russ.)).
15. Кулинич Т.М., Харченко В.П., Филясова Е.И. и др. Цитостатические и цитотоксические свойства химерных пептидов, содержащих циклинингибирующие фрагменты. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2008;145(1):43–7. [Kulinich T.M., Kharchenko V.P., Filyasova E.I. et al. Cytostatic and cytotoxic properties of chimeric peptides containing cyclin-inhibiting fragments. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2008;145(1):43–7. (In Russ.)].
 16. Боженко В.К., Шрамова Е.И., Кулинич Т.М. и др. Синхронизация клеточных культур (лекция). Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии 2018;18(2):4. [Bozhenko V.K., Shramova E.I., Kulinich T.M. et al. Synchronization of cell cultures (lecture). Vestnik Rossiyskogo nauchnogo tsentra rentgenoradiologii = Bulletin of the Russian Scientific Center of Roentgenoradiology 2018;18(2):4. (In Russ.)].
 17. Le François B.G., Maroun J.A., Birnboim H.C. Expression of thymidylate synthase in human cells is an early G1 event regulated by CDK4 and p16INK4a but not E2F. Br J Cancer 2007;97(9):1242–50. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604020.
 18. Кулинич Т.М. Исследование антипролиферативной активности интернализуемых пептидов, содержащих фрагменты ингибиторов циклиновых киназ p16INK4A и p21CIP/KIP. Дис. ... канд. мед. наук. ГУ «Российский онкологический научный центр РАМН». М., 2006. [Kulinich T.M. Study of the antiproliferative activity of internalized peptides containing fragments of cyclin kinase inhibitors p16INK4a and p21CIP/KIP. Diss. ... candidate of medical sciences. Russian cancer research center of the Russian Academy of Medical Sciences. Moscow, 2006. (In Russ.)].
 19. Ohtani N., Yamakoshi K., Takahashi A., Hara E. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. J Med Invest 2004;51(3–4):146–53. DOI: 10.2152/jmi.51.146.
 20. Кулинич Т.М., Шишкин А.М., Иванов А.В. и др. Исследование противоопухолевых свойств пептидных последовательностей, ингибиторов взаимодействия циклина D1 и циклин-зависимых киназ 4/6. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(S):38–40. [Kulinich T.M., Shishkin A.M., Ivanov A.V. et al. Investigation of antitumor properties of peptide sequences, inhibitors of interaction between cyclin D1 and cyclin-dependent kinases 4/6. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(S):38–40. (In Russ.)].

Вклад авторов

В.К. Боженко: разработка дизайна исследования, анализ результатов;
Т.М. Кулинич: проведение экспериментальных исследований, обработка полученных результатов, написание текста рукописи;
Е.А. Кудинова: анализ научной литературы по теме статьи, редактирование текста рукописи;
А.В. Иванов, А.М. Шишкин: проведение экспериментальных исследований, обработка полученных результатов;
В.А. Солодкий: разработка дизайна исследования, анализ результатов, редактирование текста рукописи.

Authors' contributions

V.K. Bozhenko: developing the research design, analysis of results;
T.M. Kulinich: experimental research, processing the results, article writing;
E.A. Kudina: analysis of scientific literature on the topic of the article, article editing;
A.V. Ivanov, A.M. Shishkin: experimental research, processing the results;
V.A. Solodkiy: developing the research design, analysis of results, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.К. Боженко / V.K. Bozhenko: <https://orcid.org/0000-0001-8351-8152>
Т.М. Кулинич / T.M. Kulinich: <https://orcid.org/0000-0003-2331-5753>
Е.А. Кудинова / E.A. Kudina: <https://orcid.org/0000-0002-5530-0591>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00068/20).
Financing. The study was performed with the support of the Russian Foundation for Basic Research (project No. 20-015-00068/20).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России. Протокол № 2 от 28.02.2020.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Ministry of Health of Russia. Protocol No. 2 dated 28.02.2020.

Статья поступила: 09.10.2020. Принята к публикации: 14.12.2020.

Article submitted: 09.10.2020. Accepted for publication: 14.12.2020.

Влияние экспрессии CRABP1 на пролиферацию и чувствительность к ретиноевой кислоте клеток рака молочной железы различного происхождения

А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, М.Е. Аксельрод, С.А. Галецкий, Е.М. Чевкина

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

Контакты: Андрей Викторович Комельков komelkov@gmail.com

Введение. Ретиноевая кислота (РК) за счет модуляции транскрипции ряда ретиноид-респонсивных генов участвует в регуляции процессов дифференцировки и пролиферации. Механизмы действия белков-шаперонов, связывающих РК, CRABP1 и CRABP2 (Cellular Retinoic Acid Proteins-1 и -2), в реализации активности РК, а также их участие в опухолевой прогрессии до сих пор полностью неясны. Последние данные свидетельствуют о том, что функциональные различия между белками CRABP в отношении малигнизации клеток рака молочной железы (РМЖ) могут быть связаны с чувствительностью опухолевых клеток к РК и с разным рецепторным статусом опухоли.

Материалы и методы. Кодирующую последовательность CRABP1 гиперэкспрессировали в клетках РМЖ с отсутствием эндогенной экспрессии данного белка, разным уровнем РК-чувствительности и рецепторным статусом — линии SKBR3 (РК-чувствительные, ER(-)/HER2(+)) и MDA-MB-231 (РК-резистентные, трижды негативный статус). Оценивали рост производных CRABP1(+) и контрольных сублиний клеток в стандартных условиях культивирования и в присутствии различных концентраций РК.

Результаты. Исследовано влияние экспрессии CRABP1 в чувствительных и резистентных к РК клетках РМЖ с различным рецепторным статусом на динамику пролиферации и чувствительность клеток к РК. Показано, что экспрессия CRABP1 в чувствительных к РК клетках SKBR3 стимулирует пролиферацию клеток в отсутствие РК и снижает антипролиферативный эффект РК, в то время как в резистентных клетках MDA-MB-231 экспрессия CRABP1 не влияет на исследуемые характеристики.

Заключение. CRABP1 стимулирует пролиферативную активность и снижает чувствительность к РК HER2(+)-клеток РМЖ, но не оказывает аналогичного действия на высокоагрессивные трижды негативные клетки, резистентные к действию РК.

Ключевые слова: ретиноевая кислота, ATRA, CRABP1, пролиферация, рак молочной железы

Для цитирования: Еникеев А.Д., Комельков А.В., Аксельрод М.Е. и др. Влияние экспрессии CRABP1 на пролиферацию и чувствительность к ретиноевой кислоте клеток рака молочной железы различного происхождения. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(4):46–50.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-4-46-50



Effect of CRABP1 expression on the proliferation and the sensitivity to retinoic acid of breast cancer cells of different origin

A.D. Enikeev, A.V. Komelkov, M.E. Axelrod, S.A. Galetsky, E.M. Tchekina

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

Background. Retinoic acid (RA), by modulation of the transcription of a number of retinoid-responsive genes, is involved in the regulation of cell differentiation and proliferation. The mechanisms by which the RA-binding proteins, molecular chaperones CRABP1 and CRABP2 (Cellular Retinoic Acid Proteins-1 and -2), participate in the realization of RA activity, as well as their precise role in tumor progression are still not fully understood. Recent data indicate that functional differences of CRABP proteins with respect to malignization of breast cancer cells could be determined by different sensitivity of tumor cells to RA and with the receptor status of the tumor.

Materials and methods. The CRABP1 coding sequence was overexpressed in breast cancer cells without endogenous expression of this protein, with different levels of RA sensitivity and receptor status — SKBR3 (RA-sensitive, ER(-)/HER2(+)) cells and MDA-MB-231 (RA-resistant, triple negative status). The growth of CRABP1(+) derivatives and control cells was evaluated under standard culture conditions and in the presence of various concentrations of RA.

Results. The effect of CRABP1 expression in RA-sensitive and RA-resistant breast cancer cells with different receptor status on the growth rate and sensitivity of cells to RA was studied. The expression of CRABP1 in RA-sensitive SKBR3 cells enhances proliferation in the absence of RA and decreases the antiproliferative effect of RA, while in RA-resistant triple-negative MDA-MB-231 cells, the expression of CRABP1 does not affect the studied characteristics.

Conclusion. CRABP1 stimulates growth and suppresses the RA-sensitivity of HER2(+) RA-sensitive cells, but does not have a similar effect on highly aggressive triple-negative RA-resistant cells.

Key words: retinoic acid, ATRA, CRABP1, proliferation, breast cancer

For citation: Enikeev A. D., Komelkov A. V., Axelrod M. E. et al. Effect of CRABP1 expression on the proliferation and the sensitivity to retinoic acid of breast cancer cells of different origin. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2020;7(4):46–50. (In Russ.).

Введение

К природным ретиноидам относят различные изомеры ретиноевой кислоты (РК), включая наиболее активную и представленную в клетке форму — полностью трансретиноевую кислоту (All Trans Retinoic Acid, ATRA). Природные и синтетические ретиноиды — перспективные противоопухолевые соединения, некоторые из которых с разной степенью успешности применяются при терапии злокачественных опухолей [1, 2]. Основной функцией РК является транскрипционная регуляция РК-респонсивных генов посредством активации транскрипционных факторов — рецепторов РК RAR/RXR — в ядре, куда ее доставляют представители семейства липидсвязывающих белков, прежде всего белки CRABP [3, 4]. Несмотря на высокую гомологию, белки CRABP1 и CRABP2 выполняют, по-видимому, различную роль [5, 6], однако точное значение этих белков, особенно CRABP1, как в отношении проведения ретиноевого сигналинга, так и в контексте опухолевой прогрессии до сих пор мало понятно. Противоречивые результаты по этому вопросу связаны, по-видимому, с различиями в происхождении и молекулярно-генетических характеристиках клеток, а также с разными экспериментальными моделями. Данные последних лет свидетельствуют о том, что белки CRABP могут оказывать различное и даже противоположное действие на клетки рака молочной железы (РМЖ) в зависимости от их рецепторного статуса. Так, экспрессия CRABP1, в отличие от CRABP2, в ER(–), но не в ER(+)-клетках РМЖ ассоциирована с высокой степенью злокачественности опухолей и меньшей выживаемостью пациентов. Согласно данным другой работы экспрессия CRABP2 в ER(–)-клетках стимулирует их инвазивную и метастатическую активность, в то время как в ER(+)-клетках экспрессия этого белка оказывает противоположный эффект.

Влияние CRABP1 на уровень злокачественности клеток РМЖ с различным рецепторным статусом ранее не исследовалось. Также ранее не изучалось влияние этого белка на чувствительность клеток РМЖ к РК.

В данной работе мы исследовали эффект экзогенной экспрессии CRABP1 в отношении указанных характеристик в клетках РМЖ, характеризующихся, с одной стороны, отсутствием эндогенной экспрессии данного белка, с другой — обладающих разными статусами ER и разными исходными уровнями чувствительности к РК. Ранее при исследовании чувствительности к РК 10 клеточных линий РМЖ мы не обнаружили ER(+)-клеток с отсутствием продукции CRABP1, поэтому в качестве модели были выбраны клетки ER(–)/HER2(+) и клетки линии трижды негативного РМЖ.

Материалы и методы

Линии клеток и обработка ATRA. Клетки РМЖ SKBR3 и MDA-MB-231 культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. При культивировании линии MDA-MB-231 6×10^4 клеток высаживали в 60-миллиметровые чашки, для линии SKBR3 использовали 30-миллиметровые чашки и высаживали по 15×10^4 клеток. Через 24 ч меняли стандартную среду на среду с добавлением ATRA (Sigma, США) в концентрации 10, 50 и 100 мкМ при использовании линии MDA-MB-231 и 0,01, 0,1 и 1 мкМ при использовании линии SKBR3. После 120 ч культивирования (в стандартных условиях и в присутствии ATRA) оценивали количество живых клеток (при смешивании суспензии клеток с трипановым синим в соотношении 1:1) методом прямого подсчета в камере Горяева.

Получение клеток с гиперэкспрессией CRABP1. Для получения клеток с гиперэкспрессией CRABP1 использовали ретровирусный вектор pLXSN со встроенной кодирующей последовательностью [7]. Трансдукцию проводили методом ретровирусной инфекции по описанной ранее методике [7]. Псевдоретровирусные частицы собирали в течение 3 дней и добавляли к клеткам в количестве 2×10^4 (MDA-MB-231) и 15×10^4 (SKBR3). Селекцию проводили на генетине в концентрации 1000 мг/мл (MDA-MB-231) и 500 мг/мл (SKBR3) в течение 7–10 дней.

Иммуноблоттинг. Клетки лизировали в буфере RIPA, содержащем ингибиторы протеаз и фосфатаз. Для проведения электрофореза в 10 % полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия (SDS-PAGE), использовали 15 мкг белка. Анализ выполняли по описанной ранее методике [7] с использованием антител к CRABP1 (Sigma, США) и β -актину (Abcam).

Статистический анализ. Результаты 3 независимых повторов представлены в виде среднего арифметического с указанием стандартного отклонения ($M \pm SD$). Различие показателей считали статистически значимым при $p < 0,05$. Сравнение 2 групп проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни, для сравнения 3 и более групп применяли двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с пост-тестом Тьюки для попарных сравнений. Все расчеты выполняли и графики строили с использованием программы GraphPad 8.3 (GraphPad Software, США).

Результаты

Ранее мы показали, что клетки РМЖ отличаются большой вариабельностью в отношении чувствительности к РК [8]. Среди исследованных клеточных линий оказались как резистентные и высокочувствительные

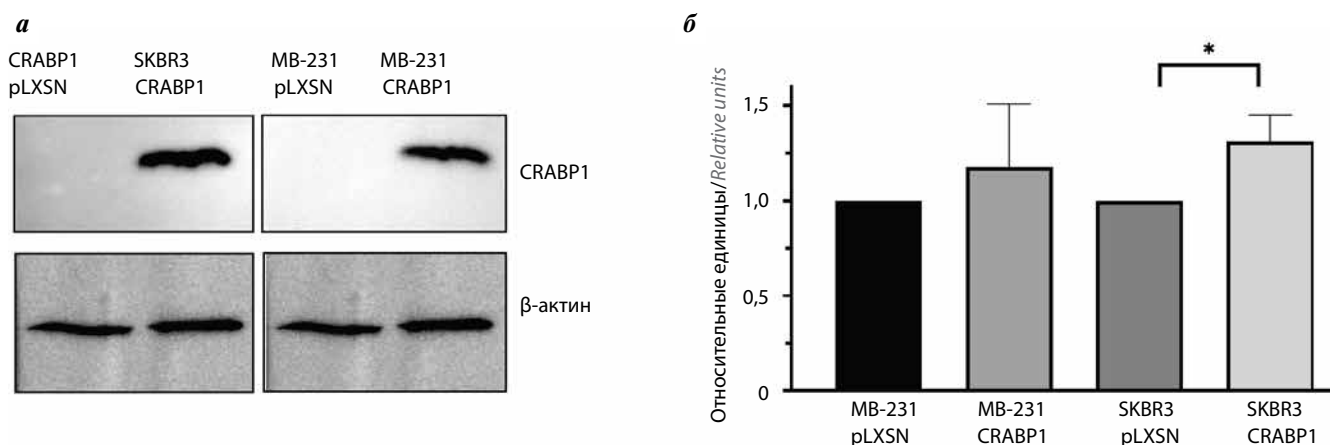


Рис. 1. Влияние экспрессии *CRABP1* на пролиферацию клеток рака молочной железы в культуре: а — анализ белка *CRABP1* в производных клетках *SKBR3* и *MDA-MB-231* с экзогенной экспрессией *CRABP1* и контрольных клетках; б — сравнение пролиферации клеток *SKBR3* и *MDA-MB-231* с гиперэкспрессией *CRABP1* и контрольных клеток. Статистическую значимость различий в количестве живых клеток по результатам 3 независимых экспериментов рассчитывали с помощью критерия Манна–Уитни отдельно для линий клеток *MDA-MB-231* и *SKBR3*, сравнение проводили для каждой пары клеточных сублиний (контроль («пустой» вектор) vs клетки *CRABP1*(+)). Для наглядности сравнения пролиферации *CRABP1*-зависимых изменений в разных линиях рака молочной железы на графике представлены относительные значения изменения пролиферации, за единицу в каждом случае принята пролиферация контрольной сублинии с экспрессией «пустого» вектора. *Статистическая достоверность различий между группами

Fig. 1. Effect of *CRABP1* expression on breast cancer cells growth in culture: а — analysis of *CRABP1* protein in *SKBR3* and *MDA-MB-231* derivative cells with exogenous expression of *CRABP1* and corresponding control cells; б — proliferation of *SKBR3* and *MDA-MB-231* cells with hyperexpression of *CRABP1* in comparison with control cells. The statistical significance of the differences in the number of living cells according to the results of three independent experiments was calculated using the Mann–Whitney test separately for the cell lines *MDA-MB-231* and *SKBR3*, the comparison was carried out for each pair of derivative sublines (control («empty» vector) vs *CRABP1* cells(+)). For clarity of comparison of the proliferation of *CRABP1*-dependent changes in two breast cancer lines, the graph shows the relative values of the change in proliferation, the unit in each case is the proliferation of the control cells expressing the «empty» vector. *Statistical significance of the group differences

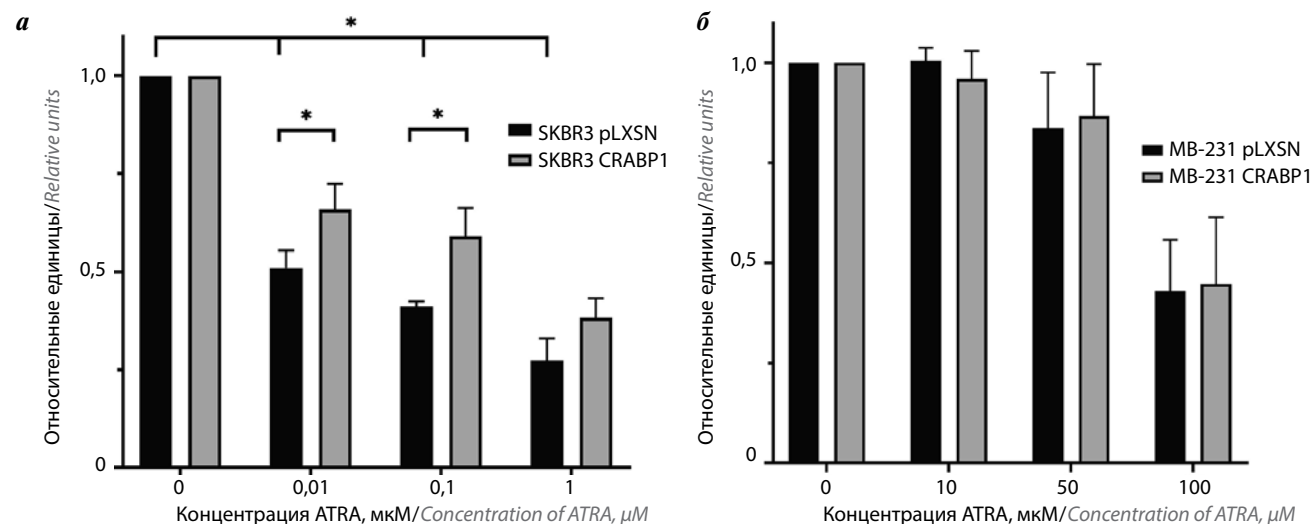


Рис. 2. Сравнение пролиферации клеток *SKBR3* (а) и *MDA-MB-231* (б) с гиперэкспрессией *CRABP1* или «пустого» вектора при инкубации с *ATRA* в различных концентрациях. Статистическую значимость различий в количестве живых клеток по результатам 3 независимых экспериментов для каждой концентрации *ATRA* рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с дальнейшим посттестом Тьюки для проведения попарных сравнений. Для наглядности на графике представлены относительные значения изменения пролиферации, за единицу в каждом случае принята пролиферация каждой из полученных сублиний при нулевой концентрации *ATRA*. *Статистическая достоверность различий между группами

Fig. 2. Comparison of proliferation of *SKBR3* (а) and *MDA-MB-231* (б) cells overexpressing *CRABP1* or «empty» vector in the presence of different concentrations of *ATRA*. The statistical significance of differences in the number of living cells according to the results of three independent experiments for each concentration of *ATRA* were calculated using two-way ANOVA followed by Tukey's post-test for pairwise comparisons. For clarity the graph represents the relative values of the change in proliferation, normalized in each case using the value of proliferation of each derivative subline (expressing *CRABP1* or «empty» vector) without *ATRA* treatment. *Statistical significance of the group differences

к РК, так и линии с промежуточным уровнем чувствительности. Столь же различной оказалась и экспрессия *CRABP1* в этих линиях, варьируя от полного отсутствия до высокого уровня продукции белков. Для ана-

лиза были выбраны клетки РМЖ с отсутствием эндогенной экспрессии *CRABP1*, характеризующиеся разной чувствительностью к РК и разным рецепторным статусом — *SKBR3* (РК-чувствительные, ER(–)/HER2(+))

и MDA-MB-231 (РК-резистентные клетки трижды негативного РМЖ). Анализ экзогенной экспрессии (рис. 1а) показал высокий уровень продукции CRABP1 в полученных производных обеих линий по сравнению с контрольными клетками.

Сравнение количества живых клеток в стандартных условиях культивирования показало, что экспрессия CRABP1 значительно стимулирует динамику пролиферации клеток SKBR3, но не влияет на пролиферацию клеток MDA-MB-231 (рис. 1б).

При инкубации с ATRA контрольные клетки SKBR3 pLXSN подтвердили показанную ранее чувствительность к РК — значимое снижение пролиферации наблюдалось уже при минимальной концентрации ATRA, равной 0,01 мкМ (рис. 2а). Экзогенная экспрессия CRABP1 в этих клетках снизила эффект РК: CRABP1(+)-клетки продемонстрировали лучшую динамику пролиферации, т. е. количество живых клеток было значительно выше в линиях, экспрессиру-

ющих CRABP1 по сравнению с контролем. При высокой (для чувствительных клеток) концентрации ATRA (1 мкМ и больше) различия теряли статистическую значимость по причине массовой гибели как CRABP1(+), так и контрольных клеток.

Экспрессия CRABP1 в линии MDA-MB-231 не влияла на рост клеток в присутствии ATRA (рис. 2б). Полученные результаты согласуются с данными наших предыдущих исследований об опухолепротормотной роли CRABP1 в ряде злокачественных опухолей [7, 9], а также с данными исследований о связи этого белка с плохим прогнозом при РМЖ [10].

Заключение

Впервые показано, что белок CRABP1 стимулирует пролиферацию чувствительных к РК клеток РМЖ и снижает их чувствительность к действию РК, но не влияет на эти характеристики в резистентных к РК клетках с трижды негативным рецепторным статусом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Schenk T., Stengel S., Zelent A. Unlocking the potential of retinoic acid in anticancer therapy. *Br J Cancer* 2014;111(11): 2039–45. DOI: 10.1038/bjc.2014.412.
2. Connolly R.M., Nguyen N.K., Sukumar S. Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment. *Clin Cancer Res* 2013;19(7):1651–959. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3175.
3. Vreeland A.C., Levi L., Zhang W. et al. Cellular retinoic acid-binding protein 2 inhibits tumor growth by two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 2013;289(49):34065–73. DOI: 10.1074/jbc.M114.604041.
4. Dong D., Ruuska S.E., Levinthal D.J., Noy N. Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J Biol Chem* 1999;274(34):23695–8. DOI: 10.1074/jbc.274.34.23695.
5. Еникеев А.Д., Комельков А.В., Зборовская И.Б. и др. Неканоническая активность ретиноевой кислоты в отношении активации протеинкиназ в трансформированных клетках различного происхождения. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(4):127–30. [Enikeev A.D., Komelkov A.V., Zborovskaya I.B. et al. Non-canonical activity of retinoic acid in relation to the activation of protein kinases in transformed cells of different origin. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):127–30. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805x-2018-5-4-127-130.
6. Tchekina E.M. Retinoic acid binding proteins and cancer: similarity or polarity? *Cancer Ther Oncol Int J* 2017;8(2):555733. DOI: 10.19080/ctoij.2017.08.555733.
7. Kainov Y., Favorskaya I., Delektor-skaya V. et al. CRABP1 provides high malignancy of transformed mesenchymal cells and contributes to the pathogenesis of mesenchymal and neuroendocrine tumors. *Cell Cycle* 2014;13(10):1530–39. DOI: 10.4161/cc.28475.
8. Еникеев А.Д., Комельков А.В., Аксельрод М.Е. и др. Влияние экспрессии CRABP1 на рост и чувствительность к ретиноевой кислоте клеток РМЖ различного происхождения. *Биохимия* 2020. В печати. [Enikeev A.D., Komelkov A.V., Axelrod M.E. et al. CRABP1 and CRABP2 protein levels do not correlate with the sensitivity of breast cancer cells to retinoic acid, but correlate with each other, with CRABP2 being an upstream regulator of CRABP1 production. *Biochemistry* 2020. In press. (In Russ.)].
9. Favorskaya I., Kainov Y., Chemeris G. et al. Expression and clinical significance of CRABP1 and CRABP2 in non-small cell lung cancer. *Tumor Biol* 2014;35(10): 10295–300. DOI: 10.1007/s13277-014-2348-4.
10. Liu R.Z., Garcia E., Glubrecht D.D. et al. CRABP1 is associated with a poor prognosis in breast cancer: adding to the complexity of breast cancer cell response to retinoic acid. *Mol Cancer* 2015;14(1):129. DOI: 10.1186/s12943-015-0380-7.

Вклад авторов

А.Д. Еникеев: получение данных, анализ полученных данных;
А.В. Комельков: статистический анализ;
М.Е. Аксельрод: обзор публикаций по теме статьи;
С.А. Галеецкий: получение данных;
Е.М. Чевкина: разработка дизайна исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions

A.D. Enikeev: obtaining data, analysis;
A.V. Komelkov: statistical analysis;
M.E. Axelrod: reviewing of publications of the article's theme;
S.A. Galetsky: obtaining data;
E.M. Tchevkina: developing the research design, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.Д. Еникеев / A.D. Enikeev: <https://orcid.org/0000-0002-7628-8616>
А.В. Комельков / A.V. Komelkov: <https://orcid.org/0000-0003-0766-163X>
М.Е. Аксельрод / M.E. Axelrod: <https://orcid.org/0000-0003-2778-7870>
С.А. Галецкий / S.A. Galetsky: <https://orcid.org/0000-0003-0350-8056>
Е.М. Чевкина / E.M. Tchevkina: <https://orcid.org/0000-0001-8837-7969>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-015-00027А).

Financing. The study was performed with the support of the Russian Foundation for Basic Research (project No. 19-015-00027A).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

This article does not describe any research involving humans or animals as subjects.

Статья поступила: 23.11.2020. **Принята к публикации:** 17.12.2020.

Article submitted: 23.11.2020. **Accepted for publication:** 17.12.2020.

