ISSN: 2313-805X (PRINT)
ISSN: 2413-3787 (ONLINE)

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Иммунология злокачественных глиом

Жидкостная биопсия колоректального рака

Белок prame как прогностический фактор у больных увеальной меланомой

Мутация c.5161C>T гена BRCA1 у пациентов с онкологическими заболеваниями из Республики Башкортостан

ТОМ 8 № 4
2021

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).

Scopus В сентябре 2020 г. журнал принят в Scopus.

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

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

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, ознакомить с наиболее значимыми работами 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.

ТОМ 8 4 '21

ОСНОВАН В 2014 Г.

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

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

www.abvpress.ru

Прием статей:
онлайн на сайте
http://umo.abvpress.ru/jour
или по адресу
adv.mol.onc@ronc.ru

Выпускающий редактор **И.В. Пучкова**
Корректор **Р.В. Журавлева**
Дизайн **Е.В. Степанова**
Верстка **Ю.В. Перевиспа**

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. 2021. Том 8. № 4. 1–96.
Сдано в печать: 13.12.2021.
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2021.
Подписной индекс в каталоге «Пресса России» – 93562.
Отпечатано в типографии ООО «Медиаколор»
127273, Москва, Сигнальный проезд, 19.
Тираж 1000 экз. Бесплатно.

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).

Scopus В сентябре 2020 г. журнал принят в Scopus.

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

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

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, ознакомить с наиболее значимыми работами 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.

ТОМ 8 4 '21

ОСНОВАН В 2014 Г.

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

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

www.abvpress.ru

Прием статей:
онлайн на сайте
http://umo.abvpress.ru/jour
или по адресу
adv.mol.onc@ronc.ru

Выпускающий редактор **И.В. Пучкова**
Корректор **Р.В. Журавлева**
Дизайн **Е.В. Степанова**
Верстка **Ю.В. Перевиспа**

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. 2021. Том 8. № 4. 1–96.
Сдано в печать: 13.12.2021.
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2021.
Подписной индекс в каталоге «Пресса России» – 93562.
Отпечатано в типографии ООО «Медиаколор»
127273, Москва, Сигнальный проезд, 19.
Тираж 1000 экз. Бесплатно.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Кирсанов Кирилл Игоревич, *д.б.н., заведующий лабораторией канцерогенных веществ отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, доцент кафедры общей врачебной практики ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Москва, Россия)*

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

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

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

Сергеева Наталья Сергеевна, *д.б.н., профессор, руководитель лаборатории прогноза эффективности консервативного лечения Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «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)*

Щербаков Александр Михайлович, *старший научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией онкопротеомики отдела экспериментальной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)*

Юришич 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)*

Заридзе 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).

Scopus In September 2020 the journal was accepted into Scopus.

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.*

4 Vol. 8 '21

FOUNDED IN 2014

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 **I.V. Puchkova**
Proofreader **R.V. Zhuravleva**
Designer **E.V. Stepanova**
Maker-up **Y.V. Perevispa**

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 (ПИ No. ФС77-57560 dated 08 April 2014).

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

The editorial board is not responsible for advertising content.

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

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

Uspekhi molekulyarnoy onkologii. 2021. Vol. 8 No. 4. 1–96.

Submitted: 13.12.2021.

© PH "ABV-Press", 2021

Pressa Rossii catalogue index: 93562.

Printed at the Mediacolor LLC. 19, Signalnyy Proezd, Moscow, 127273.

1000 copies.

Free distribution.

EDITORIAL BOARD

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 Scientific Center of Roentgenoradiology 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 sity 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)*

Kirsanov Kirill I., *DSc, Head of the Laboratory of Carcinogenic Compounds, 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, Associate Professor of the Department of General Medical Practice of the Peoples' Friendship University of Russia (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)*

Shcherbakov Alexander M., *Senior Researcher, Acting Head of the Laboratory of Oncoproteomics of the Department of Experimental Biology 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 (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)*

Jurisic 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)*

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

К.А. Гаптулбарова, М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова, А.М. Певзнер, Л.В. Спирина, Н.В. Литвяков
Эффективность иммунотерапии при разных злокачественных новообразованиях: обзор литературы 8

С.А. Кулева, К.М. Борокшинова, А.Е. Друй
Иммунология и перспективы иммунотерапии злокачественных глиом: использование факторов гуморального иммунитета 21

И.Ф. Гареев, Ю.Г. Филиппов, О.А. Бейлерли, А.А. Суфианов, А.В. Тюрин, У.Ф. Мухаметов, Guang Yang, А.Т. Бейлерли
Механизм развития посттравматических глиом 29

Р.Н. Мустафин, Э.К. Хуснутдинова
Роль ретроэлементов в развитии наследственных опухолевых синдромов 42

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

И.В. Ботезату, В.Н. Кондратова, А.М. Строганова, С.Л. Дранко, А.В. Лихтенштейн
Жидкостная биопсия колоректального рака: новый подход к оценке аберрантного метилирования гена *SEPT9* 53

С.В. Саакян, А.Ю. Цыганков, А.Г. Амирян, М.Р. Хлгатян, Д.А. Хоченков, В.А. Мисюрин
Иммуногистохимический анализ экспрессии белка PRAME как прогностический фактор у больных увеальной меланомой 61

О.В. Ковалева, М.А. Рашидова, П.А. Подлесная, Д.В. Самойлова, В.В. Мочальникова, А.Н. Грачев
Прогностическая значимость комплексной оценки экспрессии Ki-67, фактора некроза опухоли α, CD20 и CD31 при немелкоклеточном раке легкого 67

Т.И. Кушнир, Н.Е. Арноцкая, И.А. Кудрявцев, А.А.Митрофанов, А.Х. Бекяшев, В.Г. Згода, В.Е. Шевченко
Изучение действия куркумина на эксцизионную репарацию ДНК в клетках U251 мультиформной глиобластомы 75

М.А. Бермишева, Г.Ф. Зиннатуллина, И.Р. Гилязова, Е.А. Иванова, Д.Д. Асадуллина, С.О. Потапов, А.Т. Мустафин, Р.Р. Ишемгулов, В.Н. Павлов, Ш.Х. Ганцев, Э.К. Хуснутдинова
Распространенность мутации c.5161C>T гена *BRCA1* у пациентов с онкологическими заболеваниями из Республики Башкортостан 84

Информация для авторов 94

REVIEWS

K.A. Gaptulbarova, M.M. Tsyganov, M.K. Ibragimova, A.M. Pevzner, L.V. Spirina, N.V. Litviakov
Efficiency in different immunotherapy of cancer: literature review 8

S.A. Kulyova, K.M. Borokshinova, A.E. Druy
Immunology and prospects of immunotherapy against malignant gliomas: humoral immunity 21

I.F. Gareev, Yu.G. Filippov, O.A. Beylerli, A.A. Sufianov, A.V. Tyurin, U.F. Mukhametov, Guang Yang, A.T. Beylerli
The mechanism of development of post-traumatic gliomas 29

R.N. Mustafin, E.K. Khusnutdinova
The role of retroelements in the development of hereditary tumor syndromes 42

EXPERIMENTAL REPORTS

I.V. Botezatu, V.N. Kondratova, A.M. Stroganova, S.L. Dranko, A.V. Lichtenstein
Liquid biopsy of colorectal cancer: A new approach to evaluation of aberrant methylation of the *SEPT9* gene 53

S.V. Saakyan, A.Yu. Tsygankov, A.G. Amiryan, M.R. Khlgatyan, D.A. Khochenkov, V.A. Misyurin
Immunohistochemical analysis of prame expression as a prognostic factor in uveal melanoma patients 61

O.V. Kovaleva, M.A. Rashidova, P.A. Podlesnaya, D.V. Samoilova, V.V. Mochalnikova, A.N. Gratchev
Prognostic value of complex assessment of Ki-67, tumor necrosis factor α, CD20 and CD31 expression in non-small cell lung cancer 67

T.I. Kushnir, N.E. Arnotskaya, I.A. Kudryavtsev, A.A. Mitrofanov, A.K. Bekyashev, V.G. Zgoda, V.E. Shevchenko
Study of the effect of curcumin on excision DNA repair in U251 glioblastoma multiforme cells 75

M.A. Bermisheva, G.F. Zinnatullina, I.R. Gilyazova, E.A. Ivanova, D.D. Asadullina, S.O. Potapov, A.T. Mustafin, R.R. Ishemgulov, V.N. Pavlov, Sh.K. Gantcev, E.K. Khusnutdinova
Prevalence of *BRCA1* c.5161C>T mutation in cancer patients from Bashkortostan 84

Information for authors 94

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-8-20

CC BY

Эффективность иммунотерапии при разных злокачественных новообразованиях: обзор литературы

К.А. Гаптулбарова[1, 2], М.М. Цыганов[1], М.К. Ибрагимова[1, 2], А.М. Певзнер[1, 2], Л.В. Спирина[1], Н.В. Литвяков[1]

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

[2]ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»; Россия, 634050 Томск, пр-т Ленина, 36

Контакты: Матвей Михайлович Цыганов *TsyganovMM@yandex.ru*

Известно, что иммунная система играет одну из основных ролей в развитии онкологии. Это подтверждается и тем, что пациенты с врожденным или приобретенным иммунодефицитом имеют более высокие риски развития рака. На сегодняшний день выделяют несколько видов иммунотерапии, каждый из которых имеет свой механизм действия. В этом обзоре представлены данные клинических исследований основных вариантов лечения, в основе которых лежат механизмы иммунотерапии, такие как клеточная иммунотерапия, применение антител и цитокинов, комбинированная иммунотерапия (с использованием чекпойнт-ингибиторов). Приведенные сведения свидетельствуют о положительной тенденции этого способа лечения у больных с онкологическими заболеваниями.

Ключевые слова: иммунотерапия, клеточная иммунотерапия, цитокины, ингибиторы контрольных точек, прогноз, эффективность лечения

Для цитирования: Гаптулбарова К.А., Цыганов М.М., Ибрагимова М.К. и др. Эффективность иммунотерапии при разных злокачественных новообразованиях: обзор литературы. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(4):8–20. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-8-20.

Efficiency in different immunotherapy of cancer: literature review

K.A. Gaptulbarova[1, 2], M.M. Tsyganov[1], M.K. Ibragimova[1, 2], A.M. Pevzner[1, 2], L.V. Spirina[1], N.V. Litviakov[1]

[1]Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; 5 Kooperativny Ln., Tomsk 634009, Russia;

[2] National Research Tomsk State University; 36 prospect Lenina, Tomsk 634050, Russia

Contacts: Matvey Mikhailovich Tsyganov *TsyganovMM@yandex.ru*

It is known that the immune system plays one of the main roles in the development of oncology. This is confirmed by the fact that patients with congenital or acquired immunodeficiency have a higher risk of developing cancer. To date, there are several types of immunotherapy, each of which has its own mechanism of action. This review presents data from clinical studies of the main treatment options using immunotherapy mechanisms, such as cellular immunotherapy, the use of antibodies and cytokines, and combination immunotherapy (using checkpoint inhibitors). These data indicate a positive trend of this method of treatment in patients with cancer.

Key words: immunotherapy, cellular immunotherapy, cytokines, checkpoint inhibitors, prognosis, treatment efficacy

For citation: Gaptulbarova K.A., Tsyganov M.M., Ibragimova M.K. et al. Efficiency in different immunotherapy of cancer: literature review. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2021;8(4):8–20. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-8-20.

ВВЕДЕНИЕ

Довольно давно известно, что иммунная система человека может играть большую роль в развитии опухолей. Было установлено, что пациенты с врожденным или приобретенным иммунодефицитом имеют более высокие риски развития рака. Несмотря на это,

системный иммунодефицит как причина развития опухолей – довольно редкое явление. В среднем в мире регистрируется 1 случай данного заболевания на 100 тыс. человек [1].

Впервые случаи, когда опухолевые образования подвергались полной или частичной регрессии после инфекционных заболеваний, были описаны в конце XVII – начале XVIII в. в Египте, но попытки лечения рака непосредственно путем стимуляции иммунной системы начались только во 2-й половине XVIII в. Более 135 лет назад немецкие врачи W. Busch и F. Fehleisen независимо друг от друга заметили регрессию опухолей после инфекционного заболевания рожи. После этого, в 1868 г., W. Busch впервые намеренно инфицировал рожистым воспалением больного раком и зарегистрировал уменьшение размера новообразований [2]. В 1882 г. F. Fehleisen идентифицировал *Streptococcus pyogenes* как возбудителя рожи [3]. Следующие попытки стимуляции иммунной системы человека для лечения онкологических заболеваний в 1891 г. осуществил американский хирург W.B. Coley [4]. Он также был убежден, что наличие тяжелой инфекции может вызывать регрессию опухоли. Проведенные им эксперименты показали, что привитые онкологическому больному инактивированные бактерии не вызывали инфекционное заболевание, но развивались все признаки воспаления, организм начинал бороться, и опухоль исчезала. Интересно, что в экспериментах *in vitro* бактериальные штаммы никак не воздействовали на опухолевые клетки. Исходя из этого был сделан важный вывод, что инфекция не воздействует на новообразование, а активирует иммунитет пациента, что проводит к регрессии опухолевого узла [5]. L.J. Old одним из первых применил на мышиной модели вакцину BCG (Bacillus Calmette-Guerin), которая является ослабленным штаммом *Mycobacterium bovis* [6]. Дальнейшее клиническое использование данной вакцины при лечении больных раком мочевого пузыря показало весьма обнадеживающие результаты [7].

На основании этого также стали предполагать, что вирусные инфекции могут оказывать иммуностимулирующее действие и, как следствие, влиять на лечение опухоли. В 1904 г. G. Dock описал клинический случай: у пациентки с острым лейкозом наблюдалась временная ремиссия после перенесенной инфекции гриппа [8]. Далее сообщалось о многих других случаях, когда спонтанные ремиссии и регрессии опухолей происходили в условиях естественно приобретенных вирусных инфекций [9, 10]. Таким образом, были найдены достаточно веские аргументы в пользу стимуляции иммунной системы онкологических больных с целью улучшения результатов лечения, вплоть до полной регрессии опухоли.

За последние несколько десятилетий был достигнут огромный прогресс в понимании того, как опухолевые клетки взаимодействует с иммунной системой [11]. Несомненным преимуществом иммунотерапии является ее универсальность, поскольку она работает даже в тех случаях, когда неэффективны другие виды лечения. При этом иммунопрепараты могут усиливать основную терапию, существенно повышая шансы на объективный ответ на лечение. В отличие от химиотерапии, в ходе которой применяются препараты, воздействующие на многие клетки организма, иммунотерапия представляет собой некий аналог таргетной терапии, когда у препарата есть определенная мишень. В связи с этим реже возникают побочные эффекты. И, наконец, иммунотерапия позволяет стимулировать врожденный иммунитет организма, что обеспечивает долгосрочный эффект и помогает снизить риск развития рецидива.

ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОТЕРАПИИ

На сегодняшний день условно выделяют несколько видов иммунотерапии, каждый из которых имеет определенный механизм действия. Иммунотерапия опухолей может быть разделена на активную, пассивную или гибридную (одновременно активную и пассивную). Активная иммунотерапия стимулирует иммунную систему пациента на атаку опухолевых клеток путем воздействия на опухолевые антигены, а пассивная усиливает существующие противоопухолевые реакции и предполагает использование моноклональных антител, лимфоцитов, цитокинов и т.д. [12]. В зависимости от способа воздействия иммунотерапию разделяют на клеточную, комбинированную, иммунотерапию антителами и цитокинами.

Клеточная иммунотерапия. Одним из типов клеточной иммунотерапии является иммунотерапия дендритными клетками (ДК), которые представляют собой антигенпрезентирующие клетки (АПК) [13, 14]. Такое лечение запускает противоопухолевые реакции посредством переноса опухолевых антигенов в лимфатические узлы, что активирует их, заставляя атаковать опухолевые клетки с помощью активированных Т-клеток [15]. Презентация антигенов в лимфатических узлах происходит благодаря главному комплексу гистосовместимости (major histocompatibility complex, ГКГ) через рецептор Т-клеток [16]. Однако антигенных комплексных взаимодействий посредством рецептора Т-клеток не хватает для активации этих клеток. Поэтому необходимы другие костимулирующие сигналы, такие как CD80, CD86 и CD28 [17]. После активации несколькими сигналами Т-клетки, особенно CD8+-Т-клетки, играющие основную роль в противоопухолевом иммунном ответе, активируются и начинают размножаться. В результате активированные эффекторные Т-клетки выходят из лимфатических узлов и, взаимодействуя с рецепторами Т-клеток, PD-1 (рецептор программируемой клеточной гибели 1, programmed cell death 1) и PD-L1 (лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1, programmed death-ligand 1), влияют на первичную опухоль [17].

Для того чтобы индуцировать ДК, можно провести вакцинацию аутологичными лизатами опухолей или короткими пептидами [18]. В некоторых случаях возможно применение дополнительных высокоиммуногенных

веществ для усиления иммунного и противоопухолевого ответа [19]. Еще один способ активации заключается в выделении ДК из крови пациента и индукции их вне организма с последующим введением полученной «вакцины» в организм пациента.

Одним из активаторов ДК может быть лучевая терапия, после воздействия которой на первичный опухолевый узел умирающие опухолевые клетки начинают активно экспрессировать ассоциированные с повреждениями молекулярные паттерны (damage-associated molecular pattern, DAMP), кальретикулин, аденозинтрифосфат, белок HMGB1, ИНФ 1-го типа, нуклеиновые кислоты, аннексин A1 и т.д. [15]. В результате облученные клетки опухоли высвобождают большое количество опухолевых антигенов. Далее АПК, такие как ДК и фагоцитарные клетки, взаимодействуют с появившимися антигенами опухоли, а затем мигрируют в лимфатические узлы.

В последние годы в клиническую практику внедряются новые методы адаптивной клеточной терапии с использованием Т-клеток, которые наделяются специфической активностью посредством модификации химерными антигенными рецепторами (chimeric antigen receptor T cells, CAR-T cells) [20], в результате чего индуцируется иммунный ответ против опухолевых клеток. Данный вид клеточной иммунотерапии носит название CAR-T-терапии (CAR-T cell therapy). Химерные антигенные рецепторы наделяют Т-клетки антигенспецифическим распознаванием, повышенной активацией и пролиферацией независимо от главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) [21]. Как и в случае клеточной иммунотерапии ДК, процесс получения модифицированных CAR-T-клеток предполагает забор Т-клеток из крови пациента. Затем проводится процесс включения в Т-клетки гена, кодирующего специфические рецепторы антигена, и осуществляется продукция CAR на поверхности клеток. Заключительным этапом является культивирование и введение аутологичных CAR-T-клеток обратно в организм больного.

Большинство исследований в данной области посвящены раку крови. Первыми одобренными модифицированными CAR-T-клетками являются клетки, нацеленные на антиген CD19, присутствующий при остром лимфобластном лейкозе, диффузной В-крупноклеточной лимфоме и др. [22]. В настоящее время существуют CAR-T-клетки, содержащие 2 костимулирующие молекулы, такие как CD28+ и CD134+ (OX40) или CD28+ и CD137+ (4–1BB), которые связаны с повышенной продукцией цитокинов и литической активностью по отношению к опухоли [21, 23]. Несмотря на успехи применения данной стратегии при гемобластозах, нацеливание CAR-T-клеток на солидные опухоли является более сложным процессом в связи с особенностями гистопатологической структуры, высокой внутриопухолевой гетерогенностью, дефицитом специфических антигенов, иммуносупрессивной средой солидных новообразований. Кроме того, целевые антигены гематологических злокачественных новообразований, как правило, однотипны, а антигены, экспрессируемые на солидных опухолях, гетерогенны и различаются не только у опухолей разного гистологического варианта, но и у метастазов и первичного опухолевого узла [21]. Еще одним существенным недостатком CAR-T-терапии является то, что используются аутологичные клетки и препараты CAR-T-лимфоцитов могут применяться только у их донора – больного раком. Это резко увеличивает стоимость такой терапии.

Иммунотерапия антителами. Препараты, содержащие моноклональные антитела, довольно широко применяются в современной онкологии. Каждое антитело имеет конкретную мишень на опухолевой клетке [24]. При этом гибель этой клетки может быть обусловлена несколькими механизмами: прямым действием антитела (посредством блокады рецептора или агонистической активности, индукции апоптоза, доставки лекарственного средства или цитотоксического агента); иммуноопосредованным механизмом уничтожения опухолевых клеток (комплемент-зависимая цитотоксичность (complement dependent cytotoxicity), антителозависимая клеточная цитотоксичность (antibody-dependent cellular cytotoxicity) и регуляция функции Т-клеток; специфическое воздействие антител на сосудистую сеть опухоли и строму [25].

Прямое действие на опухолевые клетки проявляется в связывании антитела с рецептором, находящимся на поверхности опухолевой клетки. В результате этого его активация приводит к апоптозу. Также может происходить ингибирование рецептора, что приводит к блокированию димеризации, активации киназы, передаче сигналов и т.п. В конечном счете это вызывает гибель клеток.

Комплемент-зависимая цитотоксичность является механизмом лизиса клеток-мишеней посредством связывания антитела с клеткой и активации системы комплемента с формированием мембраноатакующего комплекса. При этом механизм действия антителозависимой клеточной цитотоксичности заключается в активизации антителом Т-клеток, опосредованной перекрестной презентации антигена ДК и подавлении рецепторов, ингибирующих Т-клетки, например CTLA-4 (Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4) и PD-1 [25]. Кроме того, возможно действие моноклональных антител через NK-клетки (natural killer cells). В этом случае антитела образуются в области антигенсвязывающего фрагмента (antigen-binding fragment, Fab) и области Fc (fragment crystallizable region, Fc region), которые распознаются клетками иммунной системы через поверхностные рецепторы Fc. NK-клетки встречают покрытые антителами клетки, Fc-области последних взаимодействуют с их Fc-рецепторами, высвобождая перфорин и гранзим B, чтобы уничтожить опухолевую клетку [26, 27].

Иммунотерапия цитокинами. Цитокины могут продуцировать практически все клетки организма, но наиболее широкий их спектр вырабатывают иммунокомпетентные клетки [28]. Цитокины имеют большой функциональный интерфейс и контролируют все

основные клеточные процессы: пролиферацию, дифференцировку, эффекторные функции и выживание лейкоцитов. Это своего рода язык межклеточного общения [29–31]. В последние годы ряд цитокинов, включая интерлейкин 2 (ИЛ-2), ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-21, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (colony stimulating factor 2) и интерферон α (ИНФα), показали высокую противоопухолевую эффективность [31, 32]. Интерферон продемонстрировал высокую результативность у больных волосатоклеточным лейкозом, саркомой Капоши, ассоциированной с синдромом приобретенного иммунного дефицита, фолликулярной лимфомой, хроническим миелоидным лейкозом и злокачественной меланомой. Ранее для лечения рака почки активно использовали ИНФ [33]. Интерлейкин 2 применяют при лечении злокачественной меланомы и почечно-клеточного рака [34].

Стимуляция иммунной системы ИНФ 1-го типа (ИНФα и ИНФβ) осуществляется через рецепторы IFNAR1 и IFNAR2 [35], которые передают сигналы через связанные с ними тирозинкиназные проводящие пути Tyk2 и JAK1 с последующим инициированием множественных каскадов фосфорилирования STAT1 и STAT2 (транскрипционных факторов) [36, 37]. Возбуждение молекул ГКГ в опухолевых клетках обеспечивает созревание ДК [38]. Происходит активация цитотоксических Т-лимфоцитов, NK-клеток и макрофагов [39]. Кроме того, IFN 1-го типа оказывают дополнительное цитостатическое и апоптотическое действие на опухолевые клетки, а также антиангиогенное действие на новообразование сосудов опухоли [28]. В частности, было показано, что применение IFNα-2b в дополнение к тремелимумабу (моноклональное антитело против CTLA-4) увеличивает частоту объективного ответа у больных меланомой IV стадии). Частота полных и частичных регрессий составляет 24 % (9 из 37 пациентов) [40]. Аналогичный результат был продемонстрирован для пациентов с колоректальным раком: применение ИНФα в комбинации с иммуногенной вакциной p53-SLP показало наличие хорошего ответа на проводимое лечение [41].

Система ИЛ-2 действует также через тирозинкиназные проводящие пути JAK1 и JAK3 и активаторы транскрипции (STAT) [42]. Интерлейкин выступает фактором роста Т-клеток во время инициации иммунного ответа и играет решающую роль в прекращении клеточных ответов для поддержания собственной толерантности [43, 44].

Комбинированная иммунотерапия: ингибиторы контрольных точек иммунного ответа (чекпойнт-ингибиторы). Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, также известные как чекпойнт-ингибиторы (checkpoint inhibitors),– группа современных иммуноонкологических препаратов, механизм действия которых направлен на блокирование ключевых точек иммунитета, в частности, на антиген цитотоксического CTLA-4 и PD-1, а также его лиганды (PD-L1 и PD-L2) [45, 46]. Было установлено, что комбинация различных иммунотерапевтических средств, таких как ингибиторы PD-1 и CTLA-4, может усиливать противоопухолевый ответ [47]. Разработка ингибиторов контрольных точек иммунного ответа была впервые рассмотрена J.P. Allison и соавт. [48]. Они описали критическую функцию CTLA-4 как негативного регулятора активации Т-клеток [49].

Рецептор CTLA-4 (CD152) представляет собой мембранный белок, имеющий сходную структуру с CD28 (костимуляторным рецептором на поверхности Т-клеток), и служит ключевым элементом в процессе активации эффекторных Т-лимфоцитов. CTLA-4 подавляет дальнейшую активацию цитотоксических Т-клеток, конкурируя со стимулирующим лигандом CD28 за лигирование с CD80 и CD86 на АПК, предотвращая 2-й сигнал, необходимый для активации Т-клеток [48]. Помимо подавления доставки 2-го сигнала с помощью АПК в последние годы были открыты дополнительные механизмы CTLA-4. Т-регуляторные клетки конститутивно экспрессируют CTLA-4 и могут напрямую удалять стимулирующие лиганды CD80 и CD86 с поверхности активированных АПК посредством трансэндоцитоза. Было также показано, что CTLA-4 способствует подвижности Т-клеток, препятствуя образованию микрокластеров. Это приводит к сокращению времени пребывания АПК-Т-клеток и может индуцировать опосредованную индоламин-2,3-диоксигеназой (indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO) иммуносупрессию [49, 50]. Кроме того, CTLA-4 ведет к подавлению нижестоящих путей PI3K (фосфоинозитид-3-киназа)/Akt (α серин/треониновая протеинкиназа), циклина D3, CDK4/CDK6 и NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), изменяя дифференцировку Т-клеток [49, 51, 52]. Антагонистические антитела к CTLA-4, включая ипилимумаб, заставляют CD80 и CD86 предпочтительно связываться с CD28, глобально повышая активацию Т-клеток.

Моноклональные антитела к PD-1/PD-L1 также используются в современной иммунотерапии солидных опухолей. Рецептор PD-1 (CD279) – мембранный белок, представляющий собой один из коингибирующих рецепторов и экспрессирующийся на поверхности антиген-стимулированных Т-клеток [53]. Впервые их обнаружили Y. Ishida и T. Honjo и соавт. из Киотского университета в начале 1990-х годов [54]. Доклинические данные, которые были получены в последующие годы, установили центральную роль PD-1/PD-L1 в подавлении опосредованных Т-клетками иммунных ответов. Аналогично CTLA-4 экспрессия гена PD-1 увеличивается в активированных Т-клетках. Однако в отличие от CTLA-4 действие PD-1 направлено на опухолевое микроокружение и способствует снижению Т-клеточного эффекторного ответа [55]. В дополнение к своему взаимодействию с PD-1 PD-L1 также имеет сродство и к CD80, который, в свою очередь, участвует в активации Т-лимфоцитов за счет взаимодействия с CD28 [54, 56]. PD-L2 также

связывает PD-1 и экспрессируется исключительно на АПК, тогда как *PD-L1* может экспрессироваться опухолевыми, эпителиальными клетками, ДК, макрофагами и фибробластами, а также истощенными Т-клетками. Когда PD-1 лигируется с PD-L1 или PD-L2, нижестоящая передача сигналов и активация TCR (Т-клеточного рецептора) подавляются. Экспрессия PD-L1 повышается в условиях присутствия ИНФγ, вероятно, происходящего из инфильтрирующих опухоль эффекторных Т-клеток.

В настоящее время основными современными препаратами с механизмом ингибирования контрольных точек иммунного ответа являются анти-PD-1-препараты (ниволумаб [57] и пембролизумаб [58–60]), анти-PD-L1-препараты (атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб [61, 62]) и анти-CTLA-4-препараты (ипилимумаб и тремелимумаб [63]).

Широко исследуемым иммунопрепаратом является атезолизумаб (тецентрик), который представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, блокирующее путь запрограммированной клеточной гибели, ингибирующее связывание PD-L1 с PD-1 и при этом восстанавливающее опухолеспецифический Т-клеточный иммунитет [64]. Из 112 пациенток, включенных в исследование, 19 получали атезолизумаб в качестве терапии 1-й линии (1-я группа), а 93 пациенткам его назначили после по меньшей мере 2 линий предшествующей химиотерапии (2-я группа). В результате было показано, что 1- и 2-летняя общая выживаемость больных 1-й группы составила соответственно 63 и 47 %, а 2-й группы – 37 и 18 % соответственно. Важно отметить, что у пациенток с объективным ответом на лечение медиана выживаемости без прогрессирования составила 21,1 мес [64]. Другое исследование показало лучшие результаты лечения у больных, получавших комбинированное лечение ниволумабом и ипилимумабом, по сравнению с больными, которым проводили монотерапию ипилимумабом. Тем не менее медиана выживаемости без прогрессирования в 1-й группе составила всего 4,4 мес [65].

Важно отметить, что у некоторых пациентов наблюдается резистентность к ингибиторам контрольных точек иммунного ответа. В этом случае частоту ответа на лечение можно повысить с помощью комбинированного применения чекпойнт-ингибиторов и противоопухолевой терапии (например, стимулировать инфильтрацию Т-клеток в опухоли). Кроме того, показано, что такие методы лечения, как лучевая терапия, иммуногенная химиотерапия, использование препаратов, направленных на сосудистую сеть, и другие могут улучшить эффективность иммунопрепаратов [66].

Клинические исследования иммунотерапии злокачественных новообразований. В обзоре были рассмотрены исследования, описывающие применение иммунотерапии при лечении различных злокачественных новообразований.

В таблице обобщены данные 26 исследований влияния иммунотерапии на результаты лечения и исход злокачественных новообразований различных локализаций за период с 1995 по 2019 г., полученные за последние 25 лет (см. таблицу). Полученные данные сильно варьируют.

Независимо от локализации опухоли и применяемой иммунотерапии частота пациентов с полной регрессией опухоли составила 7,4 %, с частичной регрессией – 21,4 %. Всего исследованы 4385 пациентов. В 7 работах были оценены показатели выживаемости без прогрессирования у больных с наличием объективного ответа. Медиана выживаемости без прогрессирования данных пациентов составила 14,5 мес, а всех обследованных пациентов во всех работах составила всего 10,4 мес. В 9 исследованиях была изучена эффективность иммунотерапии у больных с метастатической меланомой. В основном при лечении применялись цитокины, в 3 случаях – ингибиторы контрольных точек. Частота объективного ответа у таких пациентов составила 10,8 %. Выживаемость без прогрессирования изменялась в пределах 3–77,3 мес (медиана 22,9 мес). Полная и частичная регрессия у больных с метастатическим почечноклеточным раком наблюдалась в 13,7 % случаев (медиана выживаемости – 20,5 мес).

Важно отметить, что иммунотерапия не обладает выраженной цитотоксической активностью по отношению к нормальным клеткам органов и тканей (печени, легких, почек, мышечной ткани и др.), что, в свою очередь, снижает уровень риска развития побочных эффектов от проводимого лечения [92]. Тем не менее в некоторых случаях обратной стороной такой эффективной терапии является риск возникновения опасных для жизни нежелательных явлений, в первую очередь гиперцитокинемии опухоли (цитокинового шторма) [93, 94].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунотерапия различных видов рака в настоящее время становится самостоятельным видом терапии. В отличие от стандартных тактик лечения применение иммунотерапии и ее комбинации с другими (иммунными или стандартными) методами является ведущим направлением и лучшим вариантом и позволяет увеличить эффективность терапии онкологических больных. Нет ничего более мощного и целевого, чем антигенспецифический иммунитет.

Использование различных механизмов, связанных с модификацией иммунного ответа, имеет отражение в существующих подходах к лекарственной терапии, долгое время существовавших изолированно и принятых в качестве дополнительных противоопухолевых средств для отдельных видов опухолей. В настоящее время, данные подходы становятся самостоятельным направлением лечения новообразований различных локализаций, а иммунопрепараты – препаратами выбора. Продолжительное время (до распространения

Клинические исследования эффективности иммунотерапии

Clinical trials assessing the efficacy of immunotherapy

Источ-ник Reference	Год издания Year	Локализация опухоли Tumor location	Препарат (вакцина) Drug/vaccine	Объективный ответ на лечение Objective response to treatment		Общее число пациентов, абс. Total number of patients, abs.	Медиана выживаемости без прогрессирования у пациентов с ПР и ЧР на лечение / у всех пациентов, мес Median progression-free survival in patients with CR and PR to treatment / in all patients, months
				ПР, абс. (%) CR, abs. (%)	ЧР, абс. (%) PR, abs. (%)		
[67]	1995	Метастатический почечно-клеточный рак Metastatic renal cell carcinoma	Интерлейкин 2 Interleukin 2	32 (14,0)	–	225	19,0/–
[68]	1998	Метастатическая меланома Metastatic melanoma	Интерлейкин 2 Interleukin 2	12 (6,6)	15 (8,2)	182	10,6/77,3
		Рак почки Kidney cancer	Интерлейкин 2 Interleukin 2	21 (9,3)	22 (9,7)	227	14,3/70,8
[69]	1998	Метастатическая глиобластома Metastatic glioblastoma	Лимфокин-активированные клетки + рекомбинантный интерлейкин 2 Lymphokine-activated cells + recombinant interleukin 2	–	–	13	–/9,3
[70]	1999	Метастатическая меланома Metastatic melanoma	Интерлейкин 2 Interleukin 2	17 (6,0)	26 (10,0)	270	–/30,0
[71]	2000	Метастатический рак пищевода Metastatic esophageal cancer	Мононуклеарные клетки периферической крови Peripheral blood mononuclear cells	1 (9,0)/	3 (27,2)	11	14,5/–
[72]	2001	Метастатический рак мочевого пузыря Metastatic bladder cancer	Аутологичные дендритные клетки пациентов, активированные антигеном MAGE-A3 MAGE-A3-activated autologous dendritic cells	1 (3,6)	2 (7,1)	28	2,0/6,5
[73]	2003	Метастатический колоректальный рак Metastatic colorectal cancer	Фторурацил/лейковорин + низкая доза бевацизумаба Fluorouracil/leucovorin + low dose of bevacizumab	14 (40)	–	35	–/9,0
			Фторурацил/лейковорин + высокая доза бевацизумаба Fluorouracil/leucovorin + high dose of bevacizumab	8 (24)	–	33	–/7,2

Продолжение таблицы
Continuation of table

Источ-ник Reference	Год издания Year	Локализация опухоли Tumor location	Препарат (вакцина) Drug/vaccine	Объективный ответ на лечение Objective response to treatment		Общее число пациентов, абс. Total number of patients, abs.	Медиана выживаемости без прогрессирования у пациентов с ПР и ЧР на лечение / у всех пациентов, мес Median progression-free survival in patients with CR and PR to treatment / in all patients, months
[74]	2004	Метастатический колоректальный рак Metastatic colorectal cancer	Болюсный 5-фторурацил и лейковорин + бевацизумаб Pole 5-fluorouracil and leucovorin + bevacizumab	15 (3,7)	165 (41,0)	402	–/10,6
[75]	2007	Метастатическая меланома Metastatic melanoma	Интерлейкин 21 Interleukin 21	–	1 (3,4)	29	–/3,0
[76]	2007	Метастатический колоректальный рак Metastatic colorectal cancer	Оксалиплатин, фторурацил и лейковорин + бевацизумаб Oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin + bevacizumab	5 (1,7)	60 (21,0)	286	–/7,3
			Монотерапия бевацизумабом Bevacizumab monotherapy	2 (0,7)/	19 (7,9)	243	–/2,7
[77]	2007	Метастатический рак желудка Metastatic gastric cancer	Лапатиниб Lapatinib	–	5 (10,9)	46	–/2,0
[78]	2009	Метастатический рак желудка Metastatic gastric cancer	Панитумумаб + оксалиплатин/бевацизумаб Panitumumab + oxaliplatin/bevacizumab	–	190 (46,0)	413	–/10,0
			Оксалиплатин/бевацизумаб Oxaliplatin/bevacizumab	2 (0,5)	194 (47,0)	410	–/11,4
			Панитумумаб + иринотекан/бевацизумаб Panitumumab + irinotecan/bevacizumab	–	49 (43,0)	115	–/10,1
			Иринотекан/бевацизумаб Irinotecan/bevacizumab	–	46 (40,0)	115	–/11,7
[79]	2012	Метастатическая меланома Metastatic melanoma	Интерлейкин 21 Interleukin 21	–	9 (22,5)	40	–/5,3
[80]	2016	Немелкоклеточный рак легкого IIIB–IV Stage IIIB-IV non-small-cell lung cancer	Ниволумаб Nivolumab	4 (8,0)/	8 (15,0)	52	–/3,6

Продолжение таблицы
Continuation of table

Источ-ник Reference	Год издания Year	Локализация опухоли Tumor location	Препарат (вакцина) Drug/vaccine	Объективный ответ на лечение Objective response to treatment		Общее число пациентов, абс. Total number of patients, abs.	Медиана выживаемости без прогрессирования у пациентов с ПР и ЧР на лечение / у всех пациентов, мес Median progression-free survival in patients with CR and PR to treatment / in all patients, months
[81]	2016	Метастатическая меланома Metastatic melanoma	Ипилимумаб Ipilimumab	–	–	475	–/48,3
[82]	2017	Метастатическая меланома Metastatic melanoma	Интерлейкин 2 Interleukin 2	19 (8,0)	24 (10,0)	237	88,9/–
[83]	2017	Метастатический трижды негативный рак молочной железы Metastatic triple-negative breast cancer	Ниволумаб Nivolumab	13 (26)	13 (26)	50	–/9,0
[84]	2017	Метастатический почечно-клеточный рак Metastatic renal cell carcinoma	Ниволумаб + ипилимумаб (в дозе 3 мг/кг и 1 мг/кг) Nivolumab + ipilimumab (3 mg/kg and 1 mg/kg, respectively)	5 (10,6)	14 (29,7)	47	–/7,7
			Ниволумаб+ипилимумаб (в дозе 1 мг/кг и 3 мг/кг) Nivolumab + ipilimumab (1 mg/kg and 3 mg/kg, respectively)	–	19 (40,4)	47	–/9,4
[85]	2017	Рак кишечника Colon cancer	Адоптивная клеточная иммуно-терапия активированными лимфоцитами Adoptive cellular immunotherapy with activated lymphocytes	–	–	13	–/–
		Рак желудка Gastric cancer		–	–	2	–/–
		Рак поджелудочной железы Pancreatic cancer		–	1 (4,8)	4	–/7
		Рак пищевода Esophageal cancer		–	–	2	–/–
[86]	2017	Метастатический почечно-клеточный рак Metastatic renal cell carcinoma чно-клеточный рак	Ниволумаб Nivolumab	–	31 (20,0)	153	–/28,1

Окончание таблицы
End of table

Источ-ник Reference	Год издания Year	Локализация опухоли Tumor location	Препарат (вакцина) Drug/vaccine	Объективный ответ на лечение Objective response to treatment		Общее число пациентов, абс. Total number of patients, abs.	Медиана выживаемости без прогрессирования у пациентов с ПР и ЧР на лечение / у всех пациентов, мес Median progression-free survival in patients with CR and PR to treatment / in all patients, months
[87]	2017	Метастатическая меланома Metastatic melanoma	Ниволумаб Nivolumab	–	–	452	–/12,0
			Ипилимумаб Nivolumab	–	–	453	–/12,0
[88]	2018	Метастатический трижды негативный рак молочной железы Metastatic triple-negative breast cancer	Пембролизумаб Pembrolizumab	3 (3,6)	16 (19)	84	–/2,1
[89]	2019	Метастатическая меланома Metastatic melanoma	Интерлейкин 2 Interleukin 2	4 (10,0)	5 (12,5)	40	12,0–48,0/12,0–24,0
		Почечно-клеточный рак Renal cell carcinoma		2 (11,8)	2 (11,8)	17	24,0/24,0
[90]	2019	Метастатический почечно-клеточный рак Metastatic renal cell carcinoma чно-клеточный рак	Облученная вакцина против аутологичных опухолевых клеток + CpG-B и ГМ-КСФ + CpG-B и ИНФα Vaccination with irradiated autologous tumor cells + CpG-B and GM–CSF + CpG-B and IFN-α	2 (13,3)	1 (6,7)	15	6,8/144,0
[91]	2019	Метастатическая меланома Metastatic melanoma	Ниволумаб Nivolumab	2 (1,9)	32 (29,9)	107	–/22,9
		Метастатический почечно-клеточный рак Metastatic renal cell carcinoma чно-клеточный рак	Ниволумаб Nivolumab	1 (2,9)	9 (26,5)	34	–/12,9
		Немелкоклеточный рак легкого Non-small-cell lung carcinoma	Ниволумаб Nivolumab	–	22 (17,1)	129	–/19,1

Примечание. *ПР – полная регрессия; ЧР – частичная регрессия; CpG-B – олигодезоксинуклеотид CpG класса B; ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; ИНФα – интерферон α.*
Note. *Complete regression; PR – partial regression; CpG-B – class B of CpG oligodeoxynucleotide; GM–CSF – granulocyte-macrophage colony stimulating factor; INF α – interferon α.*

таргетной терапии) иммунотерапия цитокинами была перспективным методом лечения диссеминированного рака почки. Клеточная иммунотерапия широко применяется при гематологических онкологических заболеваниях. Иммунотерапия антителами, трансформированная в дальнейшем в терапию чекпойнт-ингибиторами, в настоящее время занимает отдельную нишу. Можно предположить, что с учетом универсальности действия данных препаратов они могут быть использованы для лечения опухолей различного происхождения.

Однако применение современных подходов иммунотерапии без определения молекулярных маркеров, предсказывающих их эффективность, не позволяет существенно повысить показатели общей, безметастатической и безрецидивной выживаемости. Представленные разнородные данные ряда исследований служат тому доказательством: общее число объективных ответов на лечение не превышает 40 %. В настоящее время ведется поиск предиктивных маркеров иммунотерапии, их связи с видом лечения, а также методов исследования и алгоритмов оценки уровня эффективности терапии.

Для решения данной проблемы необходимы широкомасштабные молекулярно-генетические и иммуногистохимические исследования. Такие междисциплинарные исследования позволят не только расширить фундаментальные представления об иммунной системе, но и сформировать подходы к персонализированному назначению иммунотерапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Oiseth S.J., Aziz M.S. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. J Cancer Metastasis Treat 2017;3(10):250–61. DOI: 10.20517/2394-4722.2017.41.
2. Busch W. Aus der Sitzung der medicinischen Section vom 13 November 1867. Berl Klin Wochenschr 1868;5:137.
3. Fehleisen F. Ueber die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Übertragbarkeit auf den Menschen. Dtsch Med Wochenschr. 1882;8(31):553–4.
4. Coley W.B. II. Contribution to the knowledge of sarcoma. Annals of surgery 1891;14(3):199.
5. Пронько Д. Прицел на раковые мишени. Наука и инновации 2017;3(169):29–31. [Pron'ko D. Aiming at cancer targets. Science and innovation = Nauka i innovacii 2017;3(169):29–31. (In Russ.)].
6. Old L.J., Clarke D.A.,Benacerraf B. Effect of Bacillus Calmette-Guerin infection on transplanted tumours in the mouse. Nature 1959;184(4682):291–2. DOI: 10.1038/184291a0.
7. Morales A., Eidinger D., Bruce A. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. J Urol 1976;116(2):180–2. DOI: 10.1016/S0022-5347(17)58737-6.
8. Dock G. The influence of complicating diseases upon leukaemia. The American J Med Sci (1827–1924) 1904;127(4):563.
9. Kelly E., Russell S.J. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. Mol Ther 2007;15(4):651–9. DOI: 10.1038/sj.mt.6300108.
10. Ring C.J. Cytolytic viruses as potential anti-cancer agents. J Gen Virol 2002;83(3):491–502. DOI: https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-3-491.
11. Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. J Clin Invest 2015;125(9):3335–7. DOI: 10.1172/JCI83871.
12. Korneev K.V., Atretkhany K.-S.N., Drutskaya M.S. et al. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. Cytokine 2017;89(1):127–35. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.01.021.
13. Kranz L.M., Diken M., Haas H., et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. Nature 2016;534(7607):396–401. DOI: 10.1038/nature18300.
14. Riddell S.R. Progress in cancer vaccines by enhanced self-presentation. Procof Natl Acad Sci USA 2001;98(16):8933–5. DOI: 10.1073/pnas.171326398.
15. Kroemer G., Galluzzi L., Kepp O., Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. Annu Rev Immunol 2013;31(1):51–72. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-100008.
16. Apetoh L., Ghiringhelli F., Tesniere A. et al. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. Immunol Rev2007;220(1):47–59. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00573.x.
17. Tabi Z., Spary L.K., Coleman S. et al. Resistance of CD45RA− T cells to apoptosis and functional impairment, and activation of tumor-antigen specific T Cells during radiation therapy of prostate cancer. J Immunol 2010;185(2):1330–9. DOI: 10.4049/jimmunol.1000488.
18. Hirayama M., Nishimura Y. The present status and future prospects of peptide-based cancer vaccines. International immunology 2016;28(7):319–28. DOI: 10.1093/intimm/dxw027.
19. Dastmalchi F., Karachi A., Mitchell D., Rahman M. Dendritic Cell therapy eLS 2018;1(1):1–27. DOI: 10.1002/9780470015902.a0024243.
20. Jensen T.I., Axelgaard E., Bak R.O. Therapeutic gene editing in haematological disorders with CRISPR/Cas9. British J Haematol 2019;185(5):821–35. DOI: 10.1111/bjh.15851.
21. Киселевский М.В., Чикилева И.О., Ситдикова С.М. и др. Перспективы применения генетически модифицированных лимфоцитов с химерным Т-клеточным рецептором (CAR-T-клеток) для терапии солидных опухолей. Иммунология 2019;40(4):48–55. [Kiselevskij M.V., Chikileva I.O., Sitdikova S.M. et al. Prospects for the use of genetically modified lymphocytes with a chimeric T-cell receptor (CART cells) for the therapy of solid tumors. Immunologija = Immunology 2019;40(4):48–55. (In Russ.)]. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-14006.
22. Schultz L., Mackall C. Driving CAR T cell translation forward. Sci Transl Med 2019;11(481):eaaw2127. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaw2127.
23. Maus M.V., Haas A.R., Beatty G.L. et al. T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans. Cancer Immunol Res 2013;1(1):26–31. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0006.
24. Ryman J.T., Meibohm B. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol 2017;6(9):576–88. DOI: 10.1002/psp4.12224.
25. Scott A.M., Wolchok J.D., Old L.J. Antibody therapy of cancer. Nat Rev Cancer 2012;12(4):278–87. DOI: 10.1038/nrc3236.
26. Weiner L.M., Surana R., Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. Nat Rev Immunol 2010;10(5):317–27. DOI: 10.1038/nri2744.
27. Seidel U.J.E., Schlegel P., Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. Frontiers in immunology 2013;4(76):1–8. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00076.

28. Lee S., Margolin K., Cytokines in cancer immunotherapy. Cancers 2011;3(4):3856–93. DOI: 10.3390/cancers3043856.
29. Goldstein D., Laszlo J. The role of interferon in cancer therapy: a current perspective. CA Cancer J Clin 1988;38(5):258–77. DOI: 10.3322/canjclin.38.5.258.
30. Nicholas C., Lesinski G.B. Immunomodulatory cytokines as therapeutic agents for melanoma. Immunotherapy 2011;3(5):673–90. DOI: 10.2217/imt.11.45.
31. Ardolino M., Hsu J., Raulet D.H. Cytokine treatment in cancer immunotherapy. Oncotarget 2015;6(23):19346–7. DOI: 10.18632/oncotarget.5095.
32. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Nat Rev Cancer 2004;4(1):11–22. DOI: 10.1038/nrc1252.
33. Dunn G.P., Koebel C.M., Schreiber R.D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nat Rev Immunol 2006;6(11):836–48. DOI: 10.1038/nri1961.
34. Coventry B.J., Ashdown M.L. The 20th anniversary of interleukin-2 therapy: bimodal role explaining longstanding random induction of complete clinical responses. Cancer Manag Res 2012;4(1):215–21. DOI: 10.2147/CMAR.S33979.
35. Constantinescu S.N., Croze E., Wang C. et al. Role of interferon alpha/beta receptor chain 1 in the structure and transmembrane signaling of the interferon alpha/beta receptor complex. Proceedings of the Nat Acad Sci 1994;91(20):9602–6. DOI: 10.1073/pnas.91.20.9602.
36. Katze M., He Y., Gale M. Viruses and interferon: a fight for supremacy. Nat Rev Immunol 2002;2(1):675–87. DOI: 10.1038/nri888.
37. Müller L., Aigner P., Stoiber D. Type I interferons and natural killer cell regulation in cancer. Front Immunol 2017;8(304):1– 11. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00304. eCollection 2017.
38. Trepiakas R., Pedersen A.E., Met Ö., Svane I.M. Addition of interferon-alpha to a standard maturation cocktail induces CD38 up-regulation and increases dendritic cell function. Vaccine 2009;27(16):2213–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.02.015.
39. Siegal F.P., Kadowaki N., Shodell M. et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. Science 1999;284(5421):1835–7. DOI: 10.1126/science.284.5421.1835.
40. Tarhini A.A., Cherian J., Moschos S.J. et al. Safety and efficacy of combination immunotherapy with interferon alfa-2b and tremelimumab in patients with stage IV melanoma. J Clin Oncol 2012;30(3):322–8. DOI: 10.1200/JCO.2011.37.5394.
41. Zeestraten E.C., Speetjens F.M., Welters M.J. et al. Addition of interferon α to the p53 SLP vaccine results in increased production of interferon γ in vaccinated colorectal cancer patients: a phase I/II clinical trial. Int J Cancer 2013;132(7):1581–91. DOI: 10.1002/ijc.27819.
42. Wang X., Rickert M., Garcia K.C. Structure of the quaternary complex of Interleukin-2 with Its α, β, and γ receptors. Science 2005;310(5751):1159–63. DOI: 10.1126/science.1117893.
43. Boyman O., Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. Nat Rev Immunol 2012;12(3):180–90. DOI: 10.1038/nri3156.
44. Waldmann T.A. Cytokines in cancer immunotherapy. Cold Spring Harb Perspect Biol 2018;10(12):a028472. DOI: 10.1101/cshperspect.a028472.
45. Lazer D., Pentland A.S., Adamic L. et al. Life in the network: the coming age of computational social science. Science 2009;323(5915):721–3. DOI: 10.1126/science.1167742.
46. Chen D.S., Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity 2013;39(1):1–10. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
47. Ott P.A., Hodi F.S., Kaufman H.L. et al. Combination immunotherapy: a road map. J Immunother Cancer 2017;5(1):1–15. DOI: 10.1186/s40425-017-0218-5.
48. Krummel M.F., Allison J.P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. J Exp Med 1995;182(2):459–65. DOI: 10.1084/jem.182.2.459.
49. Wilky B.A., Immune checkpoint inhibitors: the linchpins of modern immunotherapy. Immunol Rev 2019;290(1):6–23. DOI: 10.1111/imr.12766.
50. Schneider H., Smith X., Liu H. et al. CTLA-4 disrupts ZAP70 microcluster formation with reduced T cell/APC dwell times and calcium mobilization. Eur J Immunol 2008;38(1):40–7. DOI: 10.1002/eji.200737423.
51. Kubsch S., Graulich E., Knop J., Steinbrink K. Suppressor activity of anergic T cells induced by IL-10-treated human dendritic cells: association with IL-2- and CTLA-4-dependent G1 arrest of the cell cycle regulated by p27Kip1. Eur J Immunol 2003;33(7):198897. DOI: 10.1002/eji.200323600.
52. Olsson C., Riebeck K., Dohlsten M., Michaëlsson E. CTLA-4 ligation suppresses CD28-induced NF-κB and AP-1 activity in mouse T cell blasts. J Biol Chem 1999;274(20):14400–5. DOI: 10.1074/jbc.274.20.14400.
53. Ishida Y., Agata Y., Shibahara K., Honjo T., Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J 1992;11(11):3887–95. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x.
54. Okazaki T., Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. Int Immunol 2007;19(7):813–24. DOI: 10.1093/intimm/dxm057.
55. Riella L.V., Paterson A.M., Sharpe A.H., Chandraker A. Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response. Am J Transplant 2012;12(10):2575–87. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2012.04224.x.
56. Park J.J., Omiya R., Matsumura Y. et al. B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. Blood 2010;116(8):1291–8. DOI: 10.1182/blood-2010-01-265975.
57. Topalian S.L., Hodi F.S., Brahmer J.R. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. New Engl J Med 2012;366(26):2443–54. DOI: 10.1056/NEJMoa1200690.
58. Sharma P., Retz M., Siefker-Radtke A. et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. Lancet Oncol 2017;18(3):312–22. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30065-7.
59. Motzer R.J., Tannir N.M., McDermott D.F. et al. Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in advanced renal-cell carcinoma. N Engl J Med2018;378(14):1277–90. DOI: 10.1056/NEJMoa1712126.
60. Patnaik A., Kang S.P., Rasco D. et al. Phase I study of pembrolizumab (MK-3475; anti-PD-1 monoclonal antibody) in patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res 2015;21(19):4286–93. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2607.
61. Motzer R.J., Penkov K., Haanen J. et al. Avelumab plus axitinib versus sunitinib for advanced renal-cell carcinoma. N Engl J Med 2019;380(12):1103–15. DOI: 10.1056/NEJMoa1816047.
62. Brahmer J.R., Tykodi S.S., Chow L.Q. et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. N Engl J Med 2012;366(26):2455–65. DOI: 10.1056/NEJMoa1200694.
63. Powles T., O'Donnell P.H., Massard C. et al. Efficacy and safety of durvalumab in locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: updated results from a phase 1/2 open-label study. JAMA Oncol 2017;3(9):1–10. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.2411.
64. Schmid P., Cruz C., Braiteh F.S. et al. Atezolizumab in metastatic TNBC (mTNBC): long-term clinical outcomes and biomarker analyses. AACR 2017;77(13):1. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2017-2986.
65. Postow M.A., Chesney J., Pavlick A.C. et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. N Engl J Med 2015;372(21):2006–17. DOI: 10.1056/NEJMoa1414428.

66. Pfirschke C., Engblom C., Rickelt S., Cortez-Retamozo V. et al., Immunogenic chemotherapy sensitizes tumors to checkpoint blockade therapy. Immunity 2016;44(2):343–54. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.11.024.
67. Fyfe G., Fisher R.I., Rosenberg S.A. et al. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. J Clin Oncol 1995;13(3):688–96. DOI: 10.1200/JCO.1995.13.3.688.
68. Rosenberg S.A., Yang J.C., White D.E., Steinberg S.M. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. Ann Surg 1998;228(3):307–19. DOI: 10.1097/00000658-199809000-00004.
69. Merchant R.E., Grant A.J., Merchant L.H., Young H.F. Adoptive immunotherapy for recurrent glioblastoma multiforme using lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2. Cancer 1988;62(4):665–71. DOI: 10.1002/1097-0142(19880815)62:4<665::AID-CNCR2820620403>3.0.CO;2-O.
70. Atkins M.B., Lotze M.T., Dutcher J.P. et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. J Clin Oncol 1999;17(7):2105. DOI: 10.1200/JCO.1999.17.7.2105.
71. Toh U., Yamana H., Sueyoshi S. et al. Locoregional cellular immunotherapy for patients with advanced esophageal cancer. Clin Cancer Res 2000;6(12):4663–73.
72. Nishiyama T., Tachibana M., Horiguchi Y. et al. Immunotherapy of bladder cancer using autologous dendritic cells pulsed with human lymphocyte antigen-A24-specific MAGE-3 peptide. Clin Cancer Res 2001;7(1):23–31.
73. Kabbinavar F., Hurwitz H.I., Fehrenbacher L. et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2003;21(1):60–5. DOI: 10.1200/JCO.2003.10.066.
74. Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W. et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 2004;350(23):2335–42. DOI: 10.1056/NEJMoa032691.
75. Davis I.D., Skrumsager B.K., Cebon J. et al. An open-label, two-arm, phase I trial of recombinant human interleukin-21 in patients with metastatic melanoma. Clin Cancer Res 2007;13(12):3630–6. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0410.
76. Giantonio B.J., Catalano P.J., Meropol N.J. et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. J Clin Oncol 2007;25(12):1539–44. DOI: 10.1200/JCO.2006.09.6305.
77. Iqbal S., Goldman B., Lenz H. et al. S0413: a phase II SWOG study of GW572016 (lapatinib) as first line therapy in patients (pts) with advanced or metastatic gastric cancer. J Clin Oncol 2007;25(18_suppl):4621. DOI: 10.1200/jco.2007.25.18_suppl.4621.
78. Hecht J.R., Mitchell E., Chidiac T. et al. A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2009;27(5):672–80. DOI: 10.1200/JCO.2008.19.8135.
79. Petrella T.M., Tozer R., Belanger K. et al. Interleukin-21 has activity in patients with metastatic melanoma: a phase II study. J Clin Oncol 2012;30(27):3396–401. DOI: 10.1200/JCO.2011.40.0655.
80. Gettinger S., Rizvi N.A., Chow L.Q. et al. Nivolumab monotherapy for first-line treatment of advanced non small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2016;34(25):2980–7. DOI: 10.1200/JCO.2016.66.9929.
81. Eggermont A.M., Chiarion-Sileni V., Grob J.J. et al. Prolonged survival in stage III melanoma with ipilimumab adjuvant therapy. N Engl J Med 2016;375(19):1845–55. DOI: 10.1056/NEJMoa1611299.
82. Davar D., Ding F., Saul M. et al. High-dose interleukin-2 (HD IL-2) for advanced melanoma: a single center experience from the University of Pittsburgh Cancer Institute. J Immunother Cancer 2017;5(74):1–10. DOI: 10.1186/s40425-017-0279-5.
83. Kok M., Horlings H., van de Vijver K. et al. LBA14Adaptive phase II randomized non-comparative trial of nivolumab after induction treatment in triple negative breast cancer: TONIC-trial. Ann Oncol 2017;28(suppl_5):1.
84. Hammers H.J., Plimack E.R., Infante J.R. et al. Safety and efficacy of nivolumab in combination with ipilimumab in metastatic renal cell carcinoma: the CheckMate 016 study. J Clin Oncol 2017;35(34):3851–8. DOI: 10.1200/JCO.2016.72.1985.
85. Абакушина Е.В., Пасова И.А., Почуев Т.П. и др. Адоптивная иммунотерапия активированными лимфоцитами в комплексной терапии пациентов с раком желудочно-кишечного тракта. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(S1):3. [Abakushina E.V., Pasova I.A., Pochuev T.P. et al. Adoptive immunotherapy with activated lymphocytes in the complex therapy of patients with gastrointestinal cancer. Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal 2017;16(S1):3. (In Russ.)].
86. Escudier B., Motzer R.J., Sharma P. et al. Treatment beyond progression in patients with advanced renal cell carcinoma treated with nivolumab in CheckMate 025. Eur Urol 2017;72(3):368–76. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.03.037.
87. Weber J., Mandala M., Del Vecchio M. et al. Adjuvant nivolumab versus ipilimumab in resected stage III or IV melanoma. N Engl J Med 2017;77(19):1824–35. DOI: 10.1056/NEJMoa1709030.
88. Adams S., Loi S., Toppmeyer D.L. et al. KEYNOTE-086 cohort B: Pembrolizumab monotherapy for PD-L1–positive, previously untreated, metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC). AACR 2018;78(4):1. DOI: 10.1158/1538-7445.SABCS17-PD6-10.
89. Buchbinder E.I., Dutcher J.P., Daniels G.A. et al. Therapy with high-dose Interleukin-2 (HD IL-2) in metastatic melanoma and renal cell carcinoma following PD1 or PDL1 inhibition. J Immunother Cancer 2019;7(1):1–7. DOI: 10.1186/s40425-019-0522-3.
90. Koster B.D., Santegoets S.J., Harting J. et al. Correction to: Autologous tumor cell vaccination combined with systemic CpG-B and IFN- promotes immune activation and induces clinical responses in patients with metastatic renal cell carcinoma: a phase II trial. Cancer Immunol Immunotherap 2019;68(6):1037. DOI: 10.1007/s00262-019-02328-6.
91. Topalian S.L., Hodi F.S., Brahmer J.R. et al. Five-year survival and correlates among patients with advanced melanoma, renal cell carcinoma, or non-small cell lung cancer treated with nivolumab. JAMA Oncol 2019;5(10):1411–20. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.2187.
92. Боробова Е.А., Жеравин А.А. Натуральные киллеры в иммунотерапии онкологических заболеваний. Сибирский онкологический журнал 2018;17(6):97–103. [Borobova E.A., Zheravin A.A. Natural killers in immunotherapy of oncological diseases. Sibirskij onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology 2018;17(6):97–103. (In Russ.)]. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-6-97-104.
93. Davila M.L., Riviere I., Wang X. et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. Sci Transl Medi 2014;6(224):224–5. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.
94. Xu Y., Zhang M., Ramos C.A. et al. Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR. CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. Blood 2014;123(24):3750–9. DOI: 10.1182/blood-2014-01-552174.

Вклад авторов
К.А. Гаптулбарова: написание текста статьи;
М.М. Цыганов: редактирование статьи;
М.К. Ибрагимова, А.М. Певзнер: сбор и обработка материала;
Л.В. Спирина, Н.В. Литвяков: разработка концепции и дизайна исследования.
Autrors' contributions
K.A. Gaptulbarova: article writing;
M.M. Tsyganov: article editing;
M.K. Ibragimova, A.M. Pevzner: collection and processing of material;
L.V. Spirina, N.V. Litvyakov: development of the concept and design of the study.

ORCID авторов / ORCID of authors
К.А. Гаптулбарова / K.A. Gaptulbarova: https://orcid.org/0000-0003-1091-7528
М.М. Цыганов / M.M. Tsyganov: https://orcid.org/0000-0001-7419-4512
М.К. Ибрагимова / M.K. Ibragimova: https://orcid.org/0000-0001-8815-2786
А.М. Певзнер / A.M. Pevzner: https://orcid.org/0000-0002-9657-9058
Л.В. Спирина / L.V. Spirina: https://orcid.org/0000-0002-5269-736X
Н.В. Литвяков / N.V. Litviakov: https://orcid.org/0000-0002-0714-8927

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 27.09.2021. **Принята к публикации:** 19.11.2021.
Article submitted: 27.09.2021. **Accepted for publication:** 19.11.2021.

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-21-28

CC BY

Иммунология и перспективы иммунотерапии злокачественных глиом: использование факторов гуморального иммунитета

С.А. Кулева[1, 2], К.М. Борокшинова[1], А.Е. Друй[3, 4]

[1]ФГБОУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

[2]ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России; Россия, 194100 Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2;

[3]ФГБОУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1;

[4]ГАУЗ «Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий»; Россия, 620026 Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22а

Контакты: Светлана Александровна Кулева *Kulevadoc@yandex.ru*

Глиомы высокой степени злокачественности – агрессивные опухоли центральной нервной системы. Стандартная химиолучевая терапия данных новообразований не является куративной опцией, поэтому попытки усиления и индивидуализации их лечения на сегодняшний день предполагают воздействие на патогенетические механизмы роста опухоли на клеточном и молекулярно-генетическом уровнях. Злокачественные глиомы, в первую очередь глиобластомы, являются «холодными» опухолями, в которых иммунный ответ и перитуморальное воспаление проявляются слабо. Это объясняется сниженной экспрессией неоантигенов опухолевыми клетками и низкой иммунореактивностью микроокружения. Клетки центральной нервной системы лишены молекул для хоминга лейкоцитов, а поверхностные соединения – ганглиозиды – оказывают прямое ингибирующее воздействие на CD178+-цитотоксические Т-лимфоциты. Это приводит к тому, что популяция лейкоцитов, инфильтрирующих опухоль, представлена в основном клетками, отрицательно регулирующими иммунный ответ (регуляторными (CD4+ CD25+ FOXP3+) Т-лимфоцитами и макрофагами 2-го типа). Макрофаги 2-го типа ингибируют клеточный иммунный ответ, стимулируют неоангиогенез и создают условия для метастатического распространения клеток опухоли.

Интеграция в лечении опухолей центральной нервной системы иммунотерапевтических подходов, в том числе применение вакцин и моноклональных антител, является актуальной стратегией, основанной на биологических свойствах опухолевой ткани.

Ключевые слова: глиомы высокой степени злокачественности, иммунотерапия, гуморальный иммунный ответ, моноклональные антитела

Для цитирования: Кулева С.А., Борокшинова К.М., Друй А.Е. Иммунология и перспективы иммунотерапии злокачественных глиом: использование факторов гуморального иммунитета. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(4):21–8. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-21-28.

Immunology and prospects of immunotherapy against malignant gliomas: humoral immunity

S.A. Kulyova[1, 2], K.M. Borokshinova[1], A.E. Druy[3, 4]

[1]N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaya St., Pesochnyy Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia;

[2]Saint Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of Russia; 2 Litovskaya St., St. Petersburg 194100, Russia;

[3]Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., GSP-7, Moscow 117997, Russia;

[4]Center for Specialized Types of Medical Care Institute of Medical Cell Technologies; 22a Karl Marks St., Yekaterinburg 620026, Russia

Contacts: Svetlana Aleksandrovna Kuleva *Kulevadoc@yandex.ru*

High-grade gliomas are aggressive brain tumors with limited survival rates. To date the maximum of survival benefit of conventional therapeutic options has been already reached and innovative treatment strategies, based on tumor biology are urgently needed. Generally, malignant gliomas, including glioblastoma, are immunologically "cold: neoplasms, with weak anti-tumor immune response and peritumoral inflammation, caused by reduced expression of neoantigens by tumor cells and restricted immunoreactivity of the microenvironment. The reduced immunogenicity of brain structures is conditioned by the absence of homing molecules for white blood cells on them, as well as the suppression of activated (CD178+) T cells by brain gangliosides. The cell population infiltrating malignant glioma is impoverished with cytotoxic T cells (CD8+ FOXP3–) and oppositely enriched with regulatory T cells and type 2 macrophages (M2). An effective anti-glioma immune response is resulted in increasing the total number of tumor-infiltrating lymphocytes and the CD8+ cell content; switching the functional activity of macrophages from M2 to M1 type. Integration of immunotherapeutic technologies (vaccines and monoclonal antibodies) into treatment strategies of malignant gliomas is relevant and promising approach based on biological features of the tumor.

Key words: high-grade gliomas, immunotherapy, humoral immunity, monoclonal antibodies

For citation: Kulyova S.A., Borokshinova K.M., Druy A.E. Immunology and prospects of immunotherapy against malignant gliomas: humoral immunity. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2021;8(4):21–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-21-28.

ВВЕДЕНИЕ

Среди всех опухолей центральной нервной системы (ЦНС) наибольшей агрессивностью обладают глиомы высокой степени злокачественности (III–IV степени). Стандартное лечение (химиолучевая терапия) не является куративной опцией, и для увеличения выживаемости пациентов предпринимаются попытки экспериментальной терапии, направленной на клеточные и молекулярные патогенетические механизмы роста опухоли. Интеграция в лечении опухолей головного мозга иммунотерапевтических подходов, в том числе использование вакцин и моноклональных антител, является перспективной стратегией, основанной на биологических свойствах опухолевой ткани.

Ранними молекулярно-генетическими событиями, запускающими процесс трансформации нормальной клетки в опухолевую, являются мутации в генах *H3F3A, Hist1H3B, IDH1/IDH2*, аберрантное метилирование промоторного региона гена *MGMT*, делеции короткого плеча хромосомы 1 и длинного плеча хромосомы 19. Мутации в кодирующей последовательности генов приводят к синтезу аберрантных пептидов, являющихся неоантигенами и инициирующих противоопухолевый иммунный ответ. Кроме того, нередко на клетках злокачественных глиом экспрессируются различные группы антигенов, среди которых можно выделить раково-тестикулярные (SOX6, MAGE1), дифференцировочные (TRP2, Gp100), мутантные (EGFRvIII) и ряд других (IL13Ra2, Eph2, EphB6, AIM2, HER2, WT1, ARF4L, SART3, SOX11, KIF1 и KIF3C) [1–13]. При этом злокачественные глиомы, и в первую очередь глиобластома, остаются «холодными» опухолями, в которых иммунный ответ и перитуморальное воспаление проявляются слабо. Это объясняется сниженной экспрессией неоантигенов клетками опухоли и низкой иммунореактивностью микроокружения опухоли [14, 15]. T. Nejo и соавт. продемонстрировали возможность клональной эволюции антигенного профиля опухоли, сопровождающейся динамическим снижением экспрессии неоантигенов и, как следствие, иммунореактивности опухоли и активности антигенпрезентирующих клеток [16].

Наличие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), призванного предотвращать проникновение в ткань мозга иммунокомпетентных клеток, также является фактором, ограничивающим противоопухолевый иммунный ответ. Плотные контакты отростков клеток олигодендроглии и эндотелиоцитов препятствуют разнонаправленному транспорту макромолекул (антигенов и иммуноглобулинов), клеточных элементов (лимфоцитов и антигенпрезентирующих клеток). Однако развитие опухоли в головном или спинном мозге сопровождается полным или частичным разрушением ГЭБ, что делает иммунный ответ в забарьерном пространстве возможным. Примечательно, что в регуляции физиологической проницаемости ГЭБ принимают участие факторы врожденного иммунитета. Так, стимуляция Toll-подобных рецепторов, экспрессированных на эндотелиоцитах сосудов мозга, вызывает запуск STAT-зависимого сигнализирования и уменьшение плотности межклеточных контактов [17]. Воздействие на рецепторы интерферона (ИНФ) 1-го типа приводит к обратному эффекту и снижению пенетрантности ГЭБ [18].

Клетки ЦНС лишены молекул для привлечения и хоминга лейкоцитов, а поверхностные молекулы – ганглиозиды – оказывают прямое ингибирующее воздействие на CD178+(FasL+)-цитотоксические Т- лимфоциты [19, 20]. Это приводит к тому, что популяция лейкоцитов, инфильтрирующих опухоль ЦНС, представлена в основном клетками, отрицательно регулирующими иммунный ответ: регуляторными (CD4+ CD25+ FOXP3+) Т-лимфоцитами и макрофагами 2-го типа (M2). Под действием цитокинов (интерлейкина 4 (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13) происходит поля-

ризация макрофагов в сторону M2-клеток, секретирующих цитокины (ИЛ-1β,-6,-8), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и металлопротеазы, что, в свою очередь, сопровождается ингибированием клеточного иммунного ответа, неоангиогенезом сосудов опухоли и создает условия для метастатического распространения клеток [21–23].

Применение моноклональных антител для иммунотерапии злокачественных глиом может преследовать две цели: индукцию антителозависимой цитотоксичности и воздействие на регуляторные механизмы для потенцирования иммунного ответа организма и модификации микроокружения опухоли.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К АНТИГЕНАМ ОПУХОЛИ

При злокачественных глиомах в большинстве случаев (до 90 %) происходит гиперэкспрессия рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), которые относятся к суперсемейству рецепторных тирозинкиназ [10]. Примерами моноклональных антител к внеклеточному домену EGFR могут служить цетуксимаб (химерное моноклональное антитело), нимотузумаб (гуманизированное моноклональное антитело) и панитумумаб (моноклональное антитело человека). Использование цетуксимаба в виде суперселективной внутриартериальной инфузии в сочетании с осмотическим повышением проницаемости ГЭБ для терапии рецидивов злокачественных глиом показало хорошую переносимость в исследовании I фазы, однако данные о клинической эффективности данной схемы терапии отсутствуют [24]. Применение аналогичного подхода для лечения первичной глиобластомы с амплификацией гена *EGFR* было успешным в 1 опубликованном случае [25]. J.M. Blesa и соавт. описали случай синергизма при совместном использовании анти-EGFR-моноклонального антитела (цетуксимаба) и ингибитора неоангиогенеза (бевацизумаба), проявляющегося в увеличении времени до прогрессирования глиобластомы на 20 мес [26]. U. Bode и соавт. сравнили эффективность лечения глиобластомы (хирургическое лечение, лучевая терапия, темозоломид) с применением нимотузумаба и без него [27]. Различия в показателях выживаемости отмечались лишь у пациентов, у которых наблюдались аберрантная форма EGFRvIII и экспрессирование фермента репарации ДНК O6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы. Медиана общей выживаемости больных глиобластомой при лечении нимотузумабом составила 18 мес [28, 29].

Аберрантная форма EGFRvIII представляет собой белок, лишенный значительной части внеклеточных доменов за счет делеции 2–7-го экзонов соответствующего гена и поэтому неспособный связывать любые лиганды. Тем не менее он сохраняет способность встраиваться в цитоплазматическую мембрану клетки, подвергаться димеризации и проявлять свойства протеинкиназ. Данная форма служит удобной мишенью для иммунотерапии, поскольку экспрессируется на поверхности опухолевых клеток, определяя их злокачественный фенотип, и отсутствует на мембране нормальных клеток. Так, именно клетки глиобластомы с амплификацией гена *EGFR* или экспрессией EGFRvIII являются таргетами для разработанных моноклональных антител. Например, антитело mAb 806, специфичное к EGFRvIII, может повышать чувствительность опухолевых клеток к лучевой терапии [30, 31].

Повышенная экспрессия фактора роста гепатоцитов (HGF) описана в клетках злокачественных глиом. Моноклональные антитела к HGF вызывают угнетение пролиферации опухолевых клеток и усиление апоптоза в гетеротопических ксенотрансплантатах глиобластом линий U87 и U118 [32]. Препарат моноклональных антител к HGF рилотумумаб (AMG102) увеличивает радиочувствительность глиобластомы, а также усиливает эффективность темозоломида и доцетаксела [33, 34]. T. Martens и соавт. описали эффективность использования неполного антитела (лишенного константного домена) к рецептору фактора роста гепатоцитов (MET) – препарата онартузумаб, который ингибировал рост опухоли на 95 % (снижение пролиферации на 75 %, плотности сосудов – на 90 %, увеличение частоты апоптоза – на 60 %) [35]. Кроме того, была проанализирована эффективность применения моноклональных антител к поверхностным антигенам опухоли, таким как GAGE, MAGE1 и GD2 [36, 37].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ

Перспективным направлением иммунотерапии глиом является использование антител с целью модификации опухолевого микроокружения. В связи с высокой васкуляризацией данного вида новообразований в ее терапии можно использовать ингибиторы ангиогенеза. Гуманизированное моноклональное антитело бевацизумаб является специфичным ко всем изоформам VEGF. Согласно рекомендациям Европейского общества медицинской онкологии (European Society of Medical Oncology, ESMO), применение бевацизумаба в схемах лечения первичной глиобластомы не увеличивает показатели выживаемости [38]. Однако некоторые исследования доказывают его эффективность в терапии рецидивов данного заболевания с увеличением периода выживаемости (в 46 % случаев) и наличием 6-месячной общей выживаемости (в 77 % случаев) [39–43]. A. Lai и соавт. сравнили показатели общей выживаемости и продолжительности жизни без прогрессирования пациентов с первичной глиобластомой, получивших тройную (лучевая терапия, темозоломид и бевацизумаб) и двойную (лучевая терапия

и темозоломид) схемы лечения, и выявили преимущество 1-й модели (20 и 13 мес, и 15 и 7 мес соответственно) [44]. Однако более масштабное исследование, включившее 621 больного, значительного различия в показателях выживаемости между группами, получавших бевацизумаб и плацебо, не обнаружило [45]. Успешно прошедшим III фазу клинических испытаний считается рамуцирумаб – препарат моноклонального антитела к трансмембранному рецептору VEGFR2 [46]. *In vivo* было доказано ингибирование опухолевого роста на 65 % с помощью IMC-3G3 (оларатумаба) – моноклонального антитела человека, блокирующего активацию рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFRα). Этот фактор играет одну из ключевых ролей в опухолевом ангиогенезе [47]. Кроме того, в случае экспрессии PDGFRα клетками глиомы применение данного антитела способно оказывать прямое противоопухолевое действие.

Связь между ангиогенной программой и иммунной системой осуществляется через систему галектинов – класса белков, взаимодействующих с β-галактозидами и гликозилированными белками (N- и O-гликанами). Экспрессия галектинов в опухолевых клетках способствует регионарной иммуносупрессии за счет блокирования ThI цитотоксического иммунного ответа, индукции регуляторных Т-клеток, повышения уровня ИЛ-10, ИЛ-27 и активации сигнального пути STAT3. В целом повышенная экспрессия галектинов снижает показатели выживаемости при многих типах злокачественных опухолей [48]. Однако в условиях гипоксии галектины (в частности, GAL1) способствуют димеризации VEGFR в отсутствие связи с лигандом VEGF (что запускает неоагиогенез) и ремоделированию эндотелиоцитов вновь образованных сосудов. На фоне применения ингибиторов ангиогенеза увеличивается экспрессия галектина-1 опухолевыми клетками и N-гликана клетками эндотелия, что приводит к развитию резистентности опухоли к ингибиторам VEGF. Блокирование галектина-1, осуществляемое с помощью гликоаминов, малых молекул (например, OTX008, которая препятствует образованию β-складчатости белка) или моноклональных антител, вызывает снижение васкуляризации опухоли и ее объема, увеличивает чувствительность к анти-VEGF-терапии и способствует инфильтрации глиомы CD8+-клетками. Эффективность блокирования галектина-1 была продемонстрирована при эпителиальных неоплазиях, глиомах, нейробластоме и саркомах [49–52]. Сочетание анти-GAL1-антител с ингибиторами иммунных сверочных точек (ингибиторами PD1/PDL1) показало эффективность при резистентной меланоме [53].

Антителами, которые способны потенцировать иммунный ответ против глиобластомы, являются инактивирующие ИЛ-6 иммуноглобулины. Отсутствие Ил-6 приводит к «деполяризации» макрофагов, т.е. к снижению доли M2-клеток в популяции лейкоцитов, инфильтрирующих опухоль. Это активирует макрофаги антигенпрезентирующих клеток, NK- и Т-лимфоцитов и, как следствие, вызывает регресс опухоли [54, 55].

Белки семейства коннексинов (в частности, коннексин 43, CX43) обеспечивают контакт клеток опухоли с астроцитами микроокружения, обеспечивая при этом реализацию онкогенного и метастатического потенциала, и могут быть мишенью для терапии. CX43 является каналом, по которому циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) поступает из опухолевой клетки в астроцит, где он активирует сигнальный каскад STING/TBK1/IRF3. Это приводит к продукции клеткой ИНФα и трансформирующего фактора роста α (TGF-α), паракринно воздействующих на опухоль, где индуцируется сигнализирование STAT и P65, которое вызывает пролиферацию, блокирование апоптоза и развитие химиорезистентности опухолевой клетки [56]. В настоящее время в рамках I фазы клинических испытаний исследуется препарат WP1066, представленный в виде наночастиц, проникающих через ГЭБ и способствующих блокированию активности STAT3 как в опухолевых астроцитах, так и в M2. Доклинические модели показали активность данного лекарственного средства в виде угнетения активности M2-клеток (продуцирующих ИЛ-1b,-6,-8), увеличения количества CD8+-клеток в опухолевом инфильтрате и снижения уровня пролиферации клеток опухоли [57, 58].

Потенциальной мишенью и для иммунной системы может быть TGF-β, который является иммуносупрессивным цитокином, угнетающим созревание и функцию антигенпрезентирующих клеток, активацию и дифференцировку Т-лимфоцитов [59]. В экстрацеллюлярном матриксе и периваскулярном пространстве глиом расположен белок опухоли тенасцин, который служит мишенью для моноклональных тел BC-2 и 81C6 [60, 61].

ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРОВ ИММУННЫХ СВЕРОЧНЫХ ТОЧЕК

Высокозлокачественные глиомы в детской популяции в ряде случаев служат проявлением синдрома недостаточности восстановления комплементарных пар ДНК. Данные опухоли характеризуются крайне большим количеством соматических мутаций (100 и более на 1Мб генома) и высоким уровнем образования неоантигенов [62]. У таких пациентов оправдано применение моноклональных антител – ингибиторов иммунных сверочных точек (анти-PDL1) [63]. Однако D.A. Reardon и соавт. не выявили преимуществ использования ниволумаба в общей когорте больных глиобластомой [64]. В настоящее время проводятся исследования эффективности применения ингибиторов иммунных сверочных точек по сравнению со стандартной терапией (темозоломид и лучевая терапия) с использованием одного или нескольких потенциальных предиктивных биологических маркеров. В качестве таких

маркеров рассматриваются статус *MGMT*, наличие потенциальных антигенов (мутантные формы *IDH1/IDH2*, EGFRvIII, IMA950), степень Т-клеточной инфильтрации опухоли (в том числе с оценкой активации Т-клеточного звена в ткани опухоли), экспрессия PD/PDL1, мутационная нагрузка в опухолевых клетках (количество соматических мутаций на 1 Мб генома), инактивирующие мутации в генах, ассоциированных с синдромом недостаточности восстановления комплементарных пар ДНК / синдромом Линча, дефицит экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы ε и δ (мутации в генах *POLE* и *POLD*) [65–67].

В целом, анализ лимфоцитарного микроокружения глиобластом продемонстрировал значительное преобладание клеток, находящихся в фазе истощения (экспрессирующих PD1), над активированными клетками и Т-клетками памяти. При этом использование пембролизумаба приводило к увеличению плотности лимфоцитарной инфильтрации опухоли и содержания в инфильтрате CD8+-цитотоксических Т-лимфоцитов и ИНФγ+-МФ1 [68]. Для оценки изменений, происходящих во взаимодействии опухоли (глиобластомы) и иммунной системы после применения анти-PD1-терапии ниволумабом, в рамках исследования Neo-nivo (NCT02550249) проводился анализ содержания PD1-позитивных клеток и наличия экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию иммунологических процессов (на базе платформы NanoString), в диагностическом образце опухоли в сравнении с образцом, полученным при развитии рецидива при назначении ниволумаба в неоадъювантном режиме [69].

ПРИМЕНЕНИЕ ВАКЦИН

Использование вакцинотерапии при первичных и рецидивирующих глиобластомах носит неоднозначный характер. Так, применение вакцин показало эффективность в рамках II фазы клинических испытаний, однако при проведении контролируемых исследований III фазы она подтверждена не была [70, 71]. Использование дендритноклеточных вакцин – метода активной иммунизации – повышало выживаемость больных с 257 до 455 дней [72]. В отношении злокачественных глиом отмечена эффективность пептидных вакцин против белка EGFRvIII. В исследовании II фазы у пациентов с EGFRvIII-позитивными глиобластомами удалось с помощью вакцинации увеличить медиану общей выживаемости до 26 мес по сравнению с контрольной группой, получающей темозоломид, однако в исследовании III фазы преимущество пациентов, получивших вакцинацию, подтверждено не было [73]. Также продемонстрирована эффективность пептидных вакцин против мутантной формы *IDH1* p.R132H. Мутации в генах *IDH1/IDH2* приводят к аберрантному синтезу D-2-гидроксиглутарата, который является онкометаболитом, изменяющим структурную организацию хроматина и вызывающим энергодефицит в клетке. Появление мутаций в генах изоцитратдегидрогеназы рассматривается как пусковой механизм прогрессирования глиомы низкой степени злокачественности (развитие более злокачественных форм). При этом пептидные вакцины, специфичные против мутантной формы *IDH1,* могут быть применены для элиминации более агрессивных клеток, и их использование является вариантом иммунопрофилактики прогрессирования глиом [74, 75].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, низкие показатели выживаемости больных со злокачественными глиомами требуют поиска и интеграции в режимы лечения альтернативных методов, одним из которых является иммуноопосредованное воздействие на опухоль или ее микроокружение. Исследования показали отдельные успешные примеры применения иммунотерапии глиом. В связи с этим в будущем предстоит установить предиктивные биологические маркеры, обусловливающие эффективность данного подхода.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Harada M., Ishihara Y., Itoh K., Yamanaka R. Kinesin superfamily protein-derived peptides with the ability to induce glioma-reactive cytotoxic T lymphocytes in human leukocyte antigen-A24+ glioma patients. Oncol Rep 2007;17(3):629–36. DOI: 10.3892/or.17.3.629.
2. Hashiba T., Izumoto S., Kagawa N. et al. Expression of WT1 protein and correlation with cellular proliferation in glial tumors. Neurol Med Chir (Tokyo) 2007;47(4):165–70. DOI: 10.2176/nmc.47.165.
3. Hatano M., Eguchi J., Tatsumi T. et al. EphA2 as a glioma-associated antigen: a novel target for glioma vaccines. Neoplasia 2005;7(8):717–22. DOI: 10.1593/neo.05277.
4. Heimberger A.B., McGary E.C., Suki D. et al. Loss of the AP-2alpha transcription factor is associated with the grade of human gliomas. Clin Cancer Res 2005;11(1):267–72.
5. Jin L., Ge H., Long Y. et al. CD70, a novel target of CAR T-cell therapy for gliomas. Neuro Oncol 2018;20(1):55–65. DOI: 10.1093/neuonc/nox116.
6. Kuramoto T. Detection of MAGE-1 tumor antigen in brain tumor. Kurume Med J 1997;44(1):43–51. DOI: 10.2739/kurumemedj.44.43.
7. Liu G., Ying H., Zeng G. et al. HER-2, gp100, and MAGE-1 are expressed in human glioblastoma and recognized by cytotoxic T cells. Cancer Res 2004;64(14):4980–6. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3504.
8. Liu H., Chen L., Liu J. et al. Co-delivery of tumor-derived exosomes with alpha-galactosylceramide on dendritic cell-based immunotherapy for glioblastoma. Cancer Lett 2017;411:182–90. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.09.022.

9. Murayama K., Kobayashi T., Imaizumi T. Expression of the SART3 tumor-rejection antigen in brain tumors and induction of cytotoxic T lymphocytes by its peptides. J Immunother 2000;23(5):511–8. DOI: 10.1097/00002371-200009000-00001.
10. Nonaka Y., Tsuda N., Shichijo S. et al. Recognition of ADP-ribosylation factor 4-like by HLA-A2-restricted and tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes from patients with brain tumors. Tissue Antigens 2002;60(4):319–27. DOI: 10.1034/j.1399-0039.2002.600406.x.
11. Okano F., Storkus W.J., Chambers W.H. et al. Identification of a novel HLA-A*0201-restricted, cytotoxic T lymphocyte epitope in a human glioma-associated antigen, interleukin 13 receptor alpha2 chain. Clin Cancer Res 2002;8(9):2851–5.
12. Schmitz M., Temme A., Senner V. et al. Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. Br J Cancer 2007;96(8):1293–301. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603696.
13. Ueda R., Kinoshita E., Ito R. et al. Induction of protective and therapeutic antitumor immunity by a DNA vaccine with a glioma antigen, SOX6. Int J Cancer 2008;122(10):2274–9. DOI: 10.1002/ijc.23366.
14. Gan H.K., Lappas M., Cao D.X. et al. Targeting a unique EGFR epitope with monoclonal antibody 806 activates NF-kappaB and initiates tumour vascular normalization. J Cell Mol Med 2009;13(9B):3993–4001. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00783.x.
15. Chistiakov D.A., Chekhonin I.V., Gurina O.I. et al. Approaches to improve efficiency of dendritic cell-based therapy of high grade gliomas. Curr Pharm Des 2016;22(37):5738–51. DOI: 10.2174/1381612822666160719110618.
16. Nejo T., Matsushita H., Karasaki T. et al. Reduced neoantigen expression revealed by longitudinal multiomics as a possible immune evasion mechanism in glioma. Cancer Immunol Res 2019;7(7):1148–61. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0599.
17. Nagyoszi P., Wilhelm I., Farkas A.E. et al. Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. Neurochem Int 2010;57(5):556–64. DOI: 10.1016/j.neuint.2010.07.002.
18. Daniels B.P., Holman D.W., Cruz-Orengo L. Viral pathogen-associated molecular patterns regulate blood-brain barrier integrity via competing innate cytokine signals. mBio 2014;5(5):e01476-14. DOI: 10.1128/mBio.01476-14.
19. Anirban G. Immune connection in glioma: fiction, fact and option, glioma, in glioma – exploring its biology and practical relevance. In: Glioma – exploring its biology and practical relevance. Ed. by D.A. Ghosh. InTech, 2011. P. 305–324.
20. Flügel A., Schwaiger F.W., Neumann H. et al. Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. Brain Pathol 2000;10(3):353–64. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2000.tb00267.x.
21. Szulzewsky F., Pelz A., Feng X. et al. Glioma-associated microglia/macrophages display an expression profile different from M1 and M2 polarization and highly express Gpnmb and Spp1. PLoS One 2015;10(2):e0116644. DOI: 10.1371/journal.pone.0116644.
22. Zhang M., Hutter G., Kahn S.A. Anti-CD47 treatment stimulates phagocytosis of glioblastoma by M1 and M2 polarized macrophages and promotes M1 polarized macrophages *in vivo*. PLoS One 2016;11(4):e0153550. DOI: 10.1371/journal.pone.0153550.
23. Zhu C., Kros J.M., Cheng C., Mustafa D. The contribution of tumor-associated macrophages in glioma neo-angiogenesis and implications for anti-angiogenic strategies. Neuro Oncol 2017;19(11):1435–46. DOI: 10.1093/neuonc/nox081.
24. Chakraborty S., Filippi C.G., Wong T. et al. Superselective intraarterial cerebral infusion of cetuximab after osmotic blood/brain barrier disruption for recurrent malignant glioma: phase I study. J Neurooncol 2016;128(3):405–15. DOI: 10.1007/s11060-016-2099-8.
25. Kulason K.O., Schneider J.R., Chakraborty S. et al. Superselective intraarterial cerebral infusion of cetuximab with blood brain barrier disruption combined with Stupp Protocol for newly diagnosed glioblastoma. J Exp Ther Oncol 2018;12(3):223–9.
26. Blesa J.M., Molla S.B., Esparcia M.F. et al. Durable complete remission of a brainstem glioma treated with a combination of bevacizumab and cetuximab. Case Rep Oncol 2012;5(3):676–81. DOI: 10.1159/000341852.
27. Bode U., Massimino M., Bach F. et al. Nimotuzumab treatment of malignant gliomas. Exp Opin Biol Ther 2012;12(12):1649–59. DOI: 10.1517/14712598.2012.733367.
28. Ramos T.C., Figueredo J., Catala M. et al. Treatment of high-grade glioma patients with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody h-R3: report from a phase I/II trial. Cancer Biol Ther 2006;5(4):375–9. DOI: 10.4161/cbt.5.4.2522.
29. Solomon M.T., Selva J.C., Figueredo J. et al. Radiotherapy plus nimotuzumab or placebo in the treatment of high grade glioma patients: results from a randomized, double blind trial. BMC Cancer 2013;13:299. DOI: 10.1186/1471-2407-13-299.
30. Johns T.G., McKay M.J., Cvrljevic A.N. et al. MAb 806 enhances the efficacy of ionizing radiation in glioma xenografts expressing the de2-7 epidermal growth factor receptor. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2010;78(2):572–8. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2010.03.027.
31. Jungbluth A.A., Stockert E., Huang H.J. et al. A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100(2):639–44. DOI: 10.1073/pnas.232686499.
32. Cao B., Su Y., Oskarsson M. et al. Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) display antitumor activity in animal models Proc Natl Acad Sci USA 2001;98(13):7443–8. DOI: 10.1073/pnas.131200498.
33. Buchanan I.M., Scott T., Tandle A.T. et al. Radiosensitization of glioma cells by modulation of Met signalling with the hepatocyte growth factor neutralizing antibody, AMG102 J Cell Mol Med 2011;15(9):1999–2006. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01122.x.
34. Jun H.T., Sun J., Rex K. et al. AMG 102, a fully human anti-hepatocyte growth factor/scatter factor neutralizing antibody, enhances the efficacy of temozolomide or docetaxel in U-87 MG cells and xenografts. Clin Cancer Res 2007;13:6735–42. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2969.
35. Martens T., Schmidt N.O., Eckerich C. et al. A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. Clin Cancer Res 2006;12:6144–52. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1418.
36. Kuramoto T. Detection of MAGE-1 tumor antigen in brain tumor. Kurume Med J 1997;44(1):43–51. DOI: 10.2739/kurumemedj.44.43.
37. Liu G., Ying H., Zeng G. et al. HER-2, gp100, and MAGE-1 are expressed in human glioblastoma and recognized by cytotoxic T cells. Cancer Res 2004;64(14):4980–6. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3504.
38. Stupp R., Brada M., van den Bent M.J. et al. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2014;3:iii93–101. DOI: 10.1093/annonc/mdu050.
39. Чехонин И.В., Леопольд А.В., Гурина О.И., Семенова А.В. Моноклональные антитела в терапии низкодифференцированных глиом. Вестник РАМН 2014;9–10:131–9. [Chekhov I.V., Leopold A.V., Gurina O.I., Semenova A.V. Monoclonal antibodies in the therapy of low-grade gliomas. Vestnik Rossijskoj Akademii Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences 2014;9–10:131–9. (In Russ.)].
40. Chamberlain M.C., Johnston S.K. Salvage therapy with single agent bevacizumab

for recurrent glioblastoma. J Neurooncol 2010;96(2):259–69. DOI: 10.1007/s11060-009-9957-6.

41. Nagane M., Nishikawa R., Narita Y. et al. Phase II study of single-agent bevacizumab in Japanese patients with recurrent malignant glioma. Jpn J Clin Oncol 2012;42(10):887–95. DOI: 10.1093/jjco/hys121.
42. Pope W.B., Lai A., Nghiemphu P. et al. MRI in patients with high-grade gliomas treated with bevacizumab and chemotherapy. Neurology 2006;66(8):1258–60. DOI: 10.1212/01.wnl.0000208958.29600.87.
43. Vredenburgh J.J., Desjardins A., Herndon J.E. et al. Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. Clin Cancer Res 2007;13(4):1253–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2309.
44. Lai A., Tran A., Nghiemphu P.L. et al. Phase II study of bevacizumab plus temozolomide during and after radiation therapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. J Clin Oncol 2011;29(2):142–8. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.2729.
45. Gilbert M.R., Dignam J.J., Armstrong T.S. et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. N Engl J Med 2014;370(8):699–708. DOI: 10.1056/NEJMoa1308573.
46. Liguigli W., Tomasello G., Toppo L. et al. Ramucirumab for metastatic gastric or gastroesophageal junction cancer: results and implications of the REGARD trial. Future Oncol 2014;10(9):1549–57. PMID: 25145426. DOI: 10.2217/fon.14.106.
47. Chiorean E.G., Sweeney C., Youssoufian H. et al. A phase I study of olaratumab, an anti-platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRα) monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors. Cancer Chemother Pharmacol 2014;73(3):595–604. DOI: 10.1007/s00280-014-2389-9.
48. Girotti M.R., Salatino M., Dalotto-Moreno T., Rabinovich G.A. Sweetening the hallmarks of cancer: galectins as multifunctional mediators of tumor progression. J Exp Med 2020;217(2):e20182041. DOI: 10.1084/jem.20182041.
49. Batzke K., Büchel G., Hansen W., Schramm A. TrkB-target galectin-1 impairs immune activation and radiation responses in neuroblastoma: implications for tumour therapy. Int J Mol Sci 2018;19(3):718. DOI: 10.3390/ijms19030718.
50. Croci D.O., Salatino M., Rubinstein N. et al. Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. J Exp Med 2012;209(11):1985–2000. DOI: 10.1084/jem.20111665.
51. Verschuere T., Toelen J., Maes W. et al. Glioma-derived galectin-1 regulates innate and adaptive antitumor immunity. Int J Cancer 2014;134(4):873–84. DOI: 10.1002/ijc.28426.
52. You X., Wu J., Wang Y. et al. Galectin-1 promotes vasculogenic mimicry in gastric adenocarcinoma via the Hedgehog/GLI signaling pathway. Aging (Albany NY) 2020;12(21):21837–53. DOI: 10.18632/aging.104000.
53. Górniak P., Wasylecka-Juszczyńska M., Ługowska I. et al. BRAF inhibition curtails IFN-gamma-inducible PD-L1 expression and upregulates the immunoregulatory protein galectin-1 in melanoma cells. Mol Oncol 2020;14(8):1817–32. DOI: 10.1002/1878-0261.12695.
54. Wang H., Lathia J.D., Wu Q. et al. Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. Stem Cells 2009;27(10):2393–404. DOI: 10.1002/stem.188.
55. Lamano J.B., Lamano J.B., Li Y.D. et al. Glioblastoma-derived IL6 induces immunosuppressive peripheral myeloid cell PD-L1 and promotes tumor growth. Clin Cancer Res 2019;25(12):3643–57. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2402.
56. Chen Q., Boire A., Jin X. et al. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. Nature 2016;533(7604):493–8. DOI: 10.1038/nature18268.
57. Honda S., Sadatomi D., Yamamura Y. et al. WP1066 suppresses macrophage cell death induced by inflammasome agonists independently of its inhibitory effect on STAT3. Cancer Sci 2017;108(3):520–7. DOI: 10.1111/cas.13154.
58. Ott M., Kassab C., Marisetty A. et al. Radiation with STAT3 blockade triggers dendritic cell-T cell Interactions in the glioma microenvironment and therapeutic efficacy. Clin Cancer Res 2020;26(18):4983–94. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-4092.
59. Roy L.O., Poirier M.B., Fortin D. Differential expression and clinical significance of transforming growth factor-beta isoforms in GBM tumors. Int J Mol Sci 2018;19(4):1113. DOI: 10.3390/ijms19041113.
60. Bigner D.D., Brown M., Coleman R.E. et al. Phase I studies of treatment of malignant gliomas and neoplastic meningitis with 131I-radiolabeled monoclonal antibodies anti-tenascin 81C6 and anti-chondroitin proteoglycan sulfate Me1-14 F (ab')2-a preliminary report. J Neurooncol 1995;24(1):109–22. DOI: 10.1007/BF01052668.
61. Riva P., Arista A., Franceschi G. et al. Glioblastoma therapy by direct intralesional administration of I-131 radioiodine labeled antitenascin antibodies. Cell Biophys 1994;24–25:37–43. DOI: 10.1007/BF02789213.
62. Shlien A., Campbell B.B., de Borja R. et al. Combined hereditary and somatic mutations of replication error repair genes result in rapid onset of ultra-hypermutated cancers. Nat Genet 2015;47(3):257–62. DOI: 10.1038/ng.3202.
63. Bouffet E., Larouche V., Campbell B.B. et al. Immune checkpoint inhibition for hypermutant glioblastoma multiforme resulting from germline biallelic mismatch repair deficiency. J Clin Oncol 2016; 34(19):2206–11. DOI: 10.1200/JCO.2016.66.6552.
64. Reardon D.A., Brandes A.A., Omuro A. et al. Effect of nivolumab vs bevacizumab in patients with recurrent glioblastoma: the CheckMate 143 phase 3 randomized clinical trial. JAMA Oncol 2020;21:e201024. DOI: 10.1001/jamaoncol.2020.1024.
65. Hodges T.R., Ott M., Xiu J. et al. Mutational burden, immune checkpoint expression, and mismatch repair in glioma: implications for immune checkpoint immunotherapy. Neuro Oncol 2017;19(8):1047–57. DOI: 10.1093/neuonc/nox026.
66. Giles A.J., Hutchinson M.N.D., Sonnemann H.M. et al. Dexamethasone-induced immunosuppression: mechanisms and implications for immunotherapy. J Immunother Cancer 2018;6(1):51. DOI: 10.1186/s40425-018-0371-5.
67. Garg A.D., Vandenberk L., Woensel M. et al. Preclinical efficacy of immune-checkpoint monotherapy does not recapitulate corresponding biomarkers-based clinical predictions in glioblastoma. Oncoimmunology 2017;6(4):e1295903. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1295903.
68. Berghoff A.S., Kiesel B., Widhalm G. et al. Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. Neuro Oncol 2015;17(8):1064–75. DOI: 10.1093/neuonc/nou307.
69. Lu Y., Ng A.H.C., Chow F.E. Resolution of tissue signatures of therapy response in patients with recurrent GBM treated with neoadjuvant anti-PD1. Nat Commun 2021;12(1):4031. DOI: 10.1038/s41467-021-24293-4.
70. Chistiakov D.A., Chekhonin I.V., Gurina O.I. et al. Approaches to improve efficiency of dendritic cell-based therapy of high grade gliomas. Curr Pharm Des 2016;22(37):5738–51. DOI: 10.2174/1381612822666160719110618.
71. Swartz A.M., Shen S.H., Salgado M.A. et al. Promising vaccines for treating glioblastoma. Expert Opin Biol Ther 2018;18(11):1159–70. PMID: 30281978. DOI: 10.1080/14712598.2018.1531846.
72. Yu J.S., Wheeler C.J., Zeltzer P.M. et al. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits

systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. Cancer Res 2001;61(3):842–7.
73. Weller M., Butowski N., Tran D.D. et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. Lancet Oncol 2017;18(10):1373–85. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30517-X.
74. Molenaar R.J., Maciejewski J.P., Wilmink J.W., van Noorden C.J.F. Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses. Oncogene 2018;37(15):1949–60. DOI: 10.1038/s41388-017-0077-z.
75. Platten M., Bunse L., Wick A. et al. A vaccine targeting mutant IDH1 in newly diagnosed glioma. Nature 2021;592(7854):463–8. DOI: 10.1038/s41586-021-03363-z.

Вклад авторов
С.А. Кулева, А.Е. Друй: разработка дизайна статьи, анализ научного материала, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи, научное редактирование статьи;
К.М. Борокшинова: обзор публикаций по теме статьи.
Autrors' contributions
S.A. Kulyova, A.E. Druy: development of article design, analysis of scientific material, review of publications on the topic of the article, article writing and edition;
K.M. Borokshinova: review of publications on the topic of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors
С.А. Кулева / S.A. Kulyova: https://orcid.org/0000-0003-0390-8498
К.М. Борокшинова / K.M. Borokshinova: https://orcid.org/0000-0002-5004-1543
А.Е. Друй / A.E. Druy: https://orcid.org/0000-0003-1308-8622

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 16.05.2021. **Принята к публикации:** 25.11.2021.
Article submitted: 16.05.2021. **Accepted for publication:** 25.11.2021.

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-29-41

CC BY

Механизм развития посттравматических глиом

И.Ф. Гареев[1], Ю.Г. Филиппов[2], О.А. Бейлерли[1], А.А. Суфианов[1, 3], А.В. Тюрин[4], У.Ф. Мухаметов[4], Guang Yang[5], А.Т. Бейлерли[2]

[1]ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Минздрава России; Россия, 625032 Тюмень, ул. 4-й км Червишевского тракта, 5;
[2]ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 450008 Уфа, ул. Ленина, 3;
[3]ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России; Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;
[4]ГБУЗ «Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Куватова»; Россия, 450005 Уфа, ул. Достоевского, 132;
[5]Первый аффилированный госпиталь Харбинского медицинского университета; Харбин 150001, Провинция Хэйлунцзян, Китай

Контакты: Ильгиз Фанилевич Гареев *ilgiz_gareev@mail.ru*

Глиомы являются наиболее распространенными первичными опухолями центральной нервной системы. Их агрессивная форма – глиобластомы – характеризуются неблагоприятным прогнозом и высокой частотой рецидивов. Считается, что предшествующая черепно-мозговая травма служит одним из возможных факторов последующего развития глиальных опухолей головного мозга. Ряд авторов предложили критерии установления возможной причинно-следственной связи между черепно-мозговой травмой и глиомами. Однако фактическая роль предшествующей травмы мозга в патогенезе данного типа опухолей все еще остается предметом дискуссий. Было высказано предположение, что травматические повреждения вызывают активный и продолжительный воспалительный процесс. При этом нарушается проницаемость гематоэнцефалического барьера, что приводит к воздействию на ткани головного мозга канцерогенных (токсичных) веществ, различных факторов роста или клеток иммунной системы, циркулирующих в кровотоке. В результате может возникнуть злокачественная трансформация глиальных клеток. Эта гипотеза подтверждается сообщениями о менингиомах головного мозга, расположенных рядом с посттравматическими оболочечно-мозговыми рубцами. В данной работе мы попытаемся выяснить потенциальную связь между черепно-мозговой травмой и формированием глиальных опухолей головного мозга.

Ключевые слова: глиома, глиобластома, черепно-мозговая травма, критерии, онкогенез

Для цитирования: Гареев И.Ф., Филиппов Ю.Г., Бейлерли О.А. и др. Механизм развития посттравматических глиом. Успехи молекулярной онкологии. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(4):29–41. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-29-41.

The mechanism of development of post-traumatic gliomas

I.F. Gareev[1], Yu.G. Filippov[2], O.A. Beylerli[1], A.A. Sufianov[1, 3], A.V. Tyurin[4], U.F. Mukhametov[4], Guang Yang[5], A.T. Beylerli[2]

[1]Federal Center of Neurosurgery, Ministry of Health of Russia; 5 4th km Chervishevskogo trakta, Tyumen 625032, Russia;
[2]Bashkir State Medical University, Ministry of Health of Russia; 3 Lenina St., Ufa 450008, Russia;
[3]Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow119991, Russia;
[4]G.G. Kuvatova Republican Clinical Hospital; 132 Dostoevsky St., Ufa 450005, Russia;
[5]First Affiliated Hospital of Harbin Medical University; Harbin 150001, Heilongjiang Province, People's Republic of China

Contacts: Ilgiz Fanilevich Gareev *ilgiz_gareev@mail.ru*

Gliomas are the most common primary tumors of the central nervous system. Their aggressive form – glioblastomas – is characterized by an unfavorable prognosis and a high frequency of relapses. It is believed that prior traumatic brain injury is one of the possible factors for the subsequent development of glial brain tumors. Several authors have proposed several criteria for establishing a possible causal relationship between traumatic brain injury and gliomas. However, the actual role of antecedent brain injury in the pathogenesis of this tumor type is still a matter of debate. It has been suggested that traumatic injuries cause an active and prolonged inflammatory process, while disrupting the permeability of the blood-brain barrier, which leads to exposure of the brain tissue to carcinogenic (toxic) substances, various growth factors or cells of the immune system circulating in the bloodstream, which ultimately can lead to malignant transformation of glial cells. One of the evidence for this hypothesis is supported by reports of meningiomas located adjacent to post-

traumatic meninges and cerebral scars. In this paper, we will try to elucidate the potential relationship between traumatic brain injury and the formation of glial brain tumors.

Key words: glioma, glioblastoma, traumatic brain injury, criteria, oncogenesis

For citation: Gareev I.F., Filippov Yu.G., Beylerli O.A. et al. The mechanism of development of post-traumatic gliomas. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2021;8(4):29–41. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-29-41.

ВВЕДЕНИЕ

Глиальные опухоли являются наиболее распространенными первичными опухолями центральной нервной системы (ЦНС) человека (около 80 % случаев), происходящими из глиальных клеток. Подавляющее большинство этих новообразований характеризуется диффузным инфильтративным ростом в окружающую паренхиму ЦНС [1]. В связи с астроцитарным и, соответственно, олигодендроглиальным фенотипом опухолевых клеток эти опухоли традиционно гистопатологически типируются как диффузные астроцитомы, олигодендроглиомы и смешанные глиомы или олигоастроцитомы. Кроме того, исходя из наличия или отсутствия выраженной митотической активности, некроза и микрососудистой пролиферации, глиомам присваивается различная степень злокачественности по шкале Всемирной организации здравоохранения (G1–4) [1–3]. Глиобластомы (ГБМ) (G4) характеризуются инвазивным ростом в различных участках ЦНС, частыми рецидивами, крайне неблагоприятным прогнозом и вызывают отчетливые неврологические симптомы. Средняя продолжительность жизни пациентов после поставленного диагноза составляет менее 15 мес [4].

До настоящего времени было выявлено несколько случаев связи между черепно-мозговой травмой (ЧМТ) и возникновением глиом. Критерии диагностики посттравматических глиом представлены в табл. 1 [4–7]. Однако фактическая роль предшествующей травмы головы в патогенезе данной патологии все еще остается предметом дискуссий. Возможно, регенеративные процессы, вторичные по отношению к травме, в редких случаях могут стимулировать пролиферацию глиальных клеток и их трансформацию в опухоль. Если новообразование возникнет на месте старого глиального рубца, это продемонстрирует связь между травмой и опухолью. Тот факт, что эпидемиологические исследования не показали заметного увеличения относительного риска возникновения посттравматических глиом, может свидетельствовать о наличии непрямой ассоциации ЧМТ с возникновением глиомы [8, 9].

Согласно экспериментальным данным, травма может действовать как стимулятор злокачественной трансформации в присутствии инициирующего канцерогена [10, 11]. Например, L. Zhang и соавт. в своем исследовании *ex vivo* продемонстрировали, что в клетках головного мозга после ЧМТ и глиом с высокой степенью злокачественности происходит активация 5-липоксигеназы (5-LOX) [12]. Недавно было показано, что 5-LOX участвует в процессах повреждения головного мозга. Фермент активируется в нейронах и глиальных клетках после травм головного мозга, а также при его опухолях (например, в случае анапластической астроцитомы) [13, 14]. Доказано, что 5-LOX участвует в пролиферации клеток: ее ингибирование снижает пролиферацию и вызывает апоптотическую гибель клеток глиом [15]. Согласно результатам исследования L. Zhang и соавт., 5-LOX может играть большую роль в механизме формирования постравматических глиом.

Предполагалось, что деление клеток и их бурный рост под воздействием инициирующего канцерогена являются естественным результатом травмы, приводящим к формированию опухоли. Таким образом, травма, вероятно, действует как стимулятор в присутствии инициирующего канцерогена, т.е. может вызывать пролиферацию «инициированных» глиальных клеток [10, 11]. В данной работе мы попытаемся выяснить предполагаемую связь между ЧМТ и возникновением глиальных опухолей головного мозга.

ПОВРЕЖДЕНИЕ И РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПОСЛЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Экспериментальные исследования, а также наблюдения за пациентами с ЧМТ, сопровождающимися формированием глиом (табл. 2), выявили несколько механизмов, которые весьма вероятно связаны с образованием опухоли, вызванной травмой [7, 16–26]. Было показано, что формирование посттравматических глиом может быть связано с воспалительными процессами как в остром, так и в отдаленном периоде травмы. Известно, что одной из основных функций клеток иммунной системы является устранение поврежденных компонентов ткани вследствие травматических повреждений [27]. В ЦНС эту функцию выполняет микроглия. В некоторых случаях ей помогают другие клетки иммунной системы [16]. Индуцированная травмой активация микроглии и компонентов иммунной системы сопровождается несколькими процессами, которые вызваны повреждением сосудов и сопровождаются кровоизлиянием, отеком мозга и повышенным внутричерепным давлением. Все это связано с нарушением защитных и стабилизирующих структур ЦНС и ее компонентов [28].

Процессы восстановления головного мозга в патологических условиях включают не только клетки микроглии, которые обычно в нормальных условиях изолированы от компонентов иммунной системы,

Таблица 1. *Критерии диагностики посттравматических глиом*

Table 1. *Criteria for the diagnosis of post-traumatic gliomas*

Источник Reference	Критерии Criteria
J. Ewing [4]	Травма подтверждена. The injury is authenticated. Сохранность тканей до травмы доказана. The preservation of tissues before injury has been proven. Опухоль сформировалась на месте травмы/контузионного очага. The neoplasm develop at the very site of the previous trauma. Необходим минимальный промежуток времени, который должен отделить период травматического повреждения головного мозга от начала формирования опухоли. A minimal lapse of time should separate the trauma from the appearance of the subsequent tumor. Есть положительный (не установленный в порядке исключения) диагноз, подтверждающий наличие опухоли и ее тип. В случае «тлеющей» (бессимптомной) опухоли диагностика может помочь исключить посттравматическую глиому. A positive diagnosis (not established by exception) will confirm the presence and the type of the cancer. In the case of a smoldering tumor, the diagnosis may help to exclude a traumatic cancer. Посттравматическая опухоль будет иметь гистологические признаки травматического повреждения, включая стойкое и интенсивное восстановление A post-traumatic tumor will have histological signs of traumatic injury, including persistent and intensive recovery
K.J. Zulch и соавт. [5] K.J. Zulch et al. [5]	Отсутствие в анамнезе других заболеваний нервной системы до травмы. No history of other nervous system diseases before trauma. Травма достаточно серьезная, вызывающая ушиб головного мозга и вторичный репаративный процесс. The injury is quite serious, causing a brain injury and a secondary reparative process. Местоположение повреждения (контузионный очаг) и расположение опухоли точно соответствуют друг другу, т.е. опухоль возникает на месте травмы. The tumor should be located at the very site of lesion (contusion area); in other words, the tumor should develop in continuity with the blow. Между травмой и клиническим появлением опухоли прошло не менее 1 года: более продолжительный латентный период увеличивает вероятность причинно-следственной связи. At least 1 year should separate the injury and first clinical manifestation of the tumor; longer latent period increases the probability of a causal relationship. Опухоль обоснована гистологически или макроскопически. The tumor should be histologically confirmed or be obvious macroscopically. Проведена дифференциальная диагностика глиомы и глиальной рубцовой ткани. Confusion between glioma and glial scar tissue should be avoided. Причиной травмы служит внешний фактор The trauma should be exogenous
E.E. Manuelidis и соавт. [6] E.E. Manuelidis et al. [6]	Травма и опухоль обоснованы гистологически. The trauma should be histologically confirmed. Недавние или старые кровотечения, глиальные рубцы и отеки, вторичные по отношению к наличию опухоли, четко дифференцированы от травмы. Recent or old bleeding, edema, and glial scars should be distinguished from trauma. Опухолевая ткань находится в прямом контакте с травматическим глиальным рубцом, а не просто находится в его окрестностях или отделяется узкой зоной здоровой/слегка измененной ткани The tumor should be in direct continuity with the traumatic scar, not just located nearby or separated by a narrow zone of healthy or slightly altered tissue
R.K. Moorthy, V. Rajshekhar [7]	Наличие контузионного очага и опухоли в месте ранее задокументированного контузионного очага вследствие травмы подтверждено КТ/МРТ-исследованием. CT/MRI will confirm evidence of the traumatic contusion. Контрастное КТ/МРТ-исследование, проведенное вскоре после ресорбции контузионного очага, не выявляет массового поражения Contrast CT/MRI, performed shortly after the resorption of the traumatic contusion, should not disclose any mass lesion

Примечание. МРТ – магнитно-резонансная томография; КТ – компьютерная томография.

Note. *MRI – magnetic resonance imaging; CT – computed tomography.*

Таблица 2. *Клинические исследования последних 20 лет, посвященные изучению причинно-следственной связи между черепно-мозговой травмой и формированием глиом*

Table 2. *Clinical studies investigating the causal relationship between traumatic brain injury and glioma formation*

Исследование Study	Тип исследования Type of study	Количество пациентов, абс. Number of patients, abs.	Страна Country	Возраст, лет Age, year	Наблюдение, лет Follow-up, year	Гистология Histology
V. Tyag и соавт. [16] V. Tyag et al. [16]	Клинические случаи Case series	2	США USA	54 и 65 54 and 65	6 и 11 6 and 11	Глиобластома Glioblastoma
S. Coskun и соавт. [17] S. Coskun et al. [17]	Клинический случай Case report	1	Турция Turkey	65	35	Глиобластома Glioblastoma
R. Ju kys и соавт. [18] R. Ju kys et al. [18]	Клинический случай Case report	1	Литва Lithuania	47	4	Глиобластома Glioblastoma
B. Zhou и соавт. [19] B. Zhou et al. [19]	Клинический случай Case report	1	Китай China	45	10	м
A. Spallone и соавт. [20] A. Spallone et al. [20]	Клинический случай Case report	1	Италия Italy	37	25	Анапластическая астроцитома Anaplastic astrocytoma
G.T. Monteiro и соавт. [21] G.T. Monteiro et al. [21]	Ретроспективное многоцентровое исследование Retrospective multicenter study	69	Бразилия Brazil	30–65	6	Менингиома и глиома Meningioma and glioma
C. Nygren и соавт. [22] C. Nygren et al. [22]	Ретроспективное одноцентровое исследование Retrospective single-center study	161	Швеция Sweden	32,2*	10,4*	Глиома (Grade 1–4) Glioma (Grade 1–4)
Y.H. Chen и соавт. [23] Y.H. Chen et al. [23]	Ретроспективное одноцентровое исследование Retrospective single-center study	9	Китай China	43,5*	3*	Анапластическая астроцитома и глиобластома Anaplastic astrocytoma and glioblastoma
T.N. Munch и соавт. [24] T.N. Munch et al. [24]	Ретроспективное одноцентровое исследование Retrospective single-center study	14	Дания Denmark	51*	28*	Анапластическая астроцитома и глиобластома Anaplastic astrocytoma and glioblastoma
Z. Han и соавт. [25] Z. Han et al. [25]	Клинический случай Case report	1	Китай China	29	9	Глиобластома Glioblastoma
E. Anselmi и соавт. [26] E. Anselmi et al. [26]	Клинические случаи Case series	2	Италия Italy	40 и 60	15 и 20	Глиобластома Glioblastoma
R.K. Moorthy и соавт. [7] R.K. Moorthy et al. [7]	Клинический случай Case report	1	Индия India	56	5	Глиобластома Glioblastoma

**Среднее значение.*
**Median.*

но и другие ее клетки, например нейтрофилы и макрофаги. Однако во время травмы изоляция нарушается, и клетки иммунной системы вместе с кровью попадают в паренхиму мозга. Этот процесс становится постоянным, поскольку нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) вызвано не только механическим повреждением его структур, но и гипоксией и последующим ацидозом [29]. Известно, что высвобождение аутокоидов (таких как брадикинин, гистамин и арахидоновая кислота) при патологических состояниях (воспалении, травме и кровоизлиянии) изменяет барьерные свойства ГЭБ, увеличивает проницаемость сосудов и, возможно, способствует диффузии различных молекул из крови (канцерогены, компоненты иммунной системы и т.д.) в паренхиму головного мозга [30]. Таким образом, клетки, поврежденные инициаторами канцерогенеза, вследствие травмы будут делиться, что может привести к развитию опухоли.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВОСПАЛЕНИЯ В ОНКОГЕНЕЗЕ ГЛИОМ

Воспалительный ответ начинается уже через несколько минут после ЧМТ. В его процессе удаляются некротические клетки, что способствует восстановлению тканей. Стало очевидным, что хроническое воспаление связано с повреждением ЦНС. Связь между воспалением и опухолью является общепризнанной концепцией. Воспалительные компоненты считаются одним из элементов микроокружения различных опухолей [31]. Для воспаления, связанного с опухолью, характерны инфильтрация лейкоцитов (например, макрофагов), присутствие медиаторов воспаления (например, цитокинов, интерлейкинов и хемокинов), ангиогенез и ремоделирование тканей [32]. Хорошо регулируемый воспалительный ответ должен оказывать противоопухолевый эффект, однако хроническое воспаление после ЧМТ способствует онкогенной трансформации клеток и молекулярным изменениям как внешними, так и внутренними путями [33]. На внутреннем пути связанные с канцерогенезом генетические события инициируют программы, обусловленные воспалением, которые направляют развитие воспалительной микросреды. На внешнем пути хроническое воспаление действует как движущая сила, способствующая развитию опухоли.

Быстрая активация микроглии в ответ на повреждение необходима для того, чтобы ограничить степень повреждения ткани. Однако чрезмерная активация выступает ключевым фактором вторичной травмы головного мозга. Ряд исследований показали, что микроглия может активироваться в течение нескольких недель и даже нескольких лет после ЧМТ [34, 35]. Анализ посмертной ткани пациентов, умерших через несколько месяцев после травмы и имеющих в анамнезе ЧМТ, показал чрезмерную активацию микроглии в трактах белого вещества [36]. Сверхактивная микроглия вырабатывает в большом количестве воспалительные цитокины и цитотоксические факторы, которые потенциально могут стать причиной возникновения глиом после ЧМТ. Макрофаги выделяют множество цитокинов и факторов роста (в том числе фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)), которые способствуют прогрессированию опухоли и проницаемости сосудов [37]. Известно, что происходящие от миелоида VEGF и передача сигналов через рецептор 1 VEGF (VEGFR1) способствуют прогрессированию ГБМ и патологическому ангиогенезу [37, 38].

Воспалительный процесс необходим для запуска процессов регенерации тканей и поддержания тканевого гомеостаза. Однако, будучи стрессовым состоянием для клетки, этот процесс также может вызывать повреждение ДНК и генетическую нестабильность. Хроническое воспаление может привести к злокачественной трансформации клеток через мутации или эпигенетические пути [31, 33]. Большую роль в развитии воспаления и такого изменения клеток играет активированный онкоген c-MYC. Его функция зависит от клеточного контекста и может варьировать от повышения клеточной пролиферации до активации путей апоптоза. Регулирование c-MYC часто нарушается из-за воспаления. Данный онкоген имеет решающее значение в эффективной индукции p53-зависимого апоптоза после повреждения ДНК [31]. Результаты иммуногистохимического анализа тканей головного мозга в модели ЧМТ *in vivo* продемонстрировали высокую экспрессию c-MYC [35].

РЕАКТИВНЫЕ АСТРОЦИТЫ

Астроциты являются важными компонентами ГЭБ и синаптической нейронной сети, способствующей двунаправленной связи между нейронами в физиологических условиях [39]. При некоторых патологических состояниях ЦНС астроциты становятся реактивными. Для таких клеток характерны гипертрофия и активация промежуточных филаментов, состоящих из нестина, виментина и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), а также активация пролиферации клеток [40]. Кроме того, в ситуациях, вызванных ишемией (например, при ишемическом инсульте или травме), к образованию реактивных астроцитов могут приводить клетки-предшественники, инициирующие формирование опухоли головного мозга [41].Такие астроциты способствуют избыточной продукции глутамата или активатора транскрипции 3 (STAT3), которая, в свою очередь, подавляет иммунный ответ и приводит к неопластическим процессам в головном мозге [42].

При острых повреждениях головного мозга, таких как ЧМТ или инсульт, реактивные астроциты образуют функциональный барьер, называемый глиальным рубцом (астроглиозом), который служит для изоляции повреждения. Образование глиальных рубцов может помешать регенерации аксонов. Кроме того, реактивные астроциты высвобождают цитокины, хемокины, интерлейкины,

оксид азота (NO) и другие молекулы, усиливающие нейровоспалительные реакции [33]. К тому же секретируемыми ими молекулы, такие как интерлейкин 6 (ИЛ-6), интерлейкин 8 (ИЛ-8), трансформирующий фактор роста-β (TGF-β), инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), хемотаксический белок-4 моноцитов (MCP-4), VEGF и фактор ингибирования лейкемии (LIF), стимулируют пролиферацию, рост, инвазию и миграцию опухолевых клеток [42]. Перивентрикулярные нервные стволовые клетки, из которых могут образовываться глиальные клетки (например, астроциты и олигодендроциты), также активируются при астроглиозе как часть механизма восстановления при структурном повреждении головного мозга. Реактивные астроциты и перивентрикулярные нервные стволовые клетки экспрессируют GFAP, который также активируется в большинстве глиальных опухолей, в частности в ГБМ [43]. Считается, что ГБМ возникает в основном из клеток астроцитарного происхождения и клеток-предшественников олигодендроцитов (в зависимости от подтипов).

Неопластическая трансформация поврежденных астроцитов была предложена в качестве возможного патологического механизма на основании экспериментальных исследований и сообщений о случаях формирования глиом, возникающих спустя несколько лет после ЧМТ. S. Coskun и соавт., B. Zhou и соавт., A. Spallone [17, 19, 20], D. Schiffer и соавт. изучали реакцию астроцитов в мозге крыс после травмы [39]. Было установлено, что маркеры пролиферации, такие как бромодезоксиуридин (BrdU) и ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA), имеют высокий индекс мечения ядер вокруг поврежденной ткани на 2-й день. Рассеянные положительные ядра были обнаружены на ипсилатеральной стороне (стороне поражения). Авторы пришли к выводу, что клетки, близкие к очагу поражения, возникают вследствие гиперплазии зрелых или незрелых глиальных клеток. Было высказано предположение, что клетки перивентрикулярного матрикса способствуют посттравматической пролиферативной активности [44].

Исследование S.J. Hill-Felberg и соавт. продемонстрировало пролиферативную активность астроцитов в областях перкуссионного повреждения мозга у крыс [45]. Пролиферация астроцитов была наиболее распространенной (с использованием маркировки антителами к PCNA и GFAP) там, где участки повреждения ГЭБ были более существенны. Это указывает на то, что пролиферация может быть вызвана митогенами, высвобождаемыми из структур ГЭБ, для компенсации потери некоторых астроцитарных клеток, наблюдаемых после повреждения [45]. В исследовании S.G. Kernie и соавт. использовался маркер Brd U. Была выявлена значительная пролиферативная активность нейрональных предшественников в ответ на травму в областях, проксимальных и дистальных по отношению к месту повреждения *in vivo*. Примечательно, что через 2 мес после травмы в проксимальных участках от повреждения наблюдалась исключительно пролиферация астроцитов, а нейрогенез обнаружен в областях, удаленных от области травмы [46].

ЦИТОКИНЫ

Цитокины представляют собой растворимые медиаторы врожденного и адаптивного иммунного ответа, которые высвобождаются различными клетками в ответ на патогены или повреждение тканей. Это небольшие молекулы, в основном состоящие из гликопротеинов и полипептидов и имеющие широкий спектр функций. В зависимости от окружающих условий цитокины могут оказывать как про-, так и противовоспалительное действие. Они являются основными компонентами клеточных воспалительных реакций и работают над удалением любых нежелательных объектов из ткани для поддержания гомеостаза [47].

В нормальном физиологическом контексте после восстановления ткани или устранения патогена воспаление исчезает и гомеостатическое состояние восстанавливается. Однако, если система не может адекватно устранить причину воспалительного процесса, возникает хроническое патогенное состояние. Роль хронического воспаления в патогенезе опухоли в настоящее время является общепризнанным фактом [37]. Недавние исследования обнаружили молекулярный механизм прогрессирования опухолей, опосредованный воспалением, большую роль в котором играют цитокины. Эти молекулы также могут служить эффекторами нескольких онкогенных процессов, включая связь между опухолевыми и стромальными клетками, привлечение иммунных клеток в микроокружение опухоли, клеточную дифференцировку, миграцию и инвазию клеток, уклонение от иммунитета [48].

Интерлейкин 6. Этот цитокин, выполняющий иммуномодулирующую функцию, присутствует в мозге в физиологических условиях и регулирует различные физиологические процессы в иммунном ответе ЦНС. В нормальных условиях экспрессия ИЛ-6 очень низкая. Травма вызывает увеличение его продукции микроглией в ЦНС [49]. Кроме того, ИЛ-6 секретируется периферическими клетками иммунной системы, поступающими с кровью, что вызывает значительное увеличение его концентрации в месте повреждения. Данный цитокин также играет большую роль в процессах регуляции клеточного цикла, что было доказано в экспериментальных исследованиях in vivo [30]. Он активирует STAT3, белок, ответственный за рост, пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток. Исследования показали, что ингибирование STAT3 подавляет рост и пролиферацию клеток ГБМ и индуцирует их апоптоз [50]. Это было подтверждено в исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo* [51].

Интерлейкин 6, секретируемый макрофагами, активирует этот белок, тем самым ингибируя апоптоз и увеличивая пролиферацию клеток, расположенных в месте повреждения. Данный цитокин участвует в иммунном

Т-клеточном ответе, опосредованном Т-хелперами 2 (Th2), и сверхэкспрессируется при различных опухолях головного мозга [52]. V. Samaras и соавт. обнаружили, что секреция ИЛ-6 периферическими моноцитами значительно выше у пациентов с глиомами, чем у участников контрольной группы [53]. Некоторые авторы, используя иммуногистохимическое окрашивание, показали, что ИЛ-6 экспрессируется в опухолевых клетках, макрофагах и участках ишемической ткани. Исследование R. Li и соавт. подтвердило, что данный цитокин способствует росту клеток глиомы человека на 25 % [54]. Кроме того, ИЛ-6 стимулирует ангиогенез в астроцитоме, регулируя экспрессию VEGF. Установлено, что этот цитокин способствует пролиферации опухолевых клеток в ряде различных новообразований по пути JAK/STAT [37]. Очевидно, что ИЛ-6 имеет большое значение в развитии глиальных опухолей головного мозга, в частности в злокачественной трансформации астроцитов за счет индукции ангиогенеза, пролиферации и устойчивости к апоптозу [52]. Сообщалось об опосредованной стимуляции ИЛ-6 инвазивности клеток ГБМ [54]. H. Wang и соавт. выявили убедительную корреляцию между уровнем мРНК ИЛ-6 и степенью злокачественности глиомы [55]. Поэтому представляется разумным попытаться уменьшить концентрацию ИЛ-6 после повреждения, чтобы защитить клетки от его неблагоприятных воздействий. Такие попытки уже предпринимаются с использованием современных методов генной терапии.

Интерлейкин 8. Данный хемокин является членом семейства CXC-рецепторов хемокинов, он секретируется клетками микроглии, макрофагами и клетками эндотелия. Интерлейкин 8 представляет собой важный медиатор хемотаксиса и активации нейтрофилов при остром воспалении [52]. Кроме того, этот хемокин секретируется астроцитами после ЧМТ [42]. S. Yousefzadeh-Chabok и соавт. проанализировали уровни ИЛ-6, ИЛ-8 и интерлейкина 10 (ИЛ-10) в образцах сыворотки, взятых в течение первых 6 ч после ЧМТ, у 44 пациентов с показателем шкалы комы Глазго (GCS) ≤8 и сравнили эти данные с уровнями данных интерлейкинов (показатель GCS ≤8), измеренными после 6 мес. Уровни ИЛ-6 и ИЛ-8 в сыворотке были значительно повышены, что связано с хроническим воспалительным процессом и повреждением головного мозга, наблюдаемым на поздней стадии ЧМТ. Авторы предположили, что ИЛ-6 и ИЛ-8 являются индикаторами плохого прогноза [56].

Интерлейкин 8 – мощный медиатор ангиогенеза, который сверхэкспрессирован при большинстве видов опухолей ЦНС, включая глиомы [57]. Повышенная экспрессия ИЛ-8 в тканях глиомы свидетельствует об исключительном значении этого хемокина в глиомагенезе. Интерлейкин 8 индуцирует синтез матричных металлопротеиназ (MMP), которые играют решающую роль в ангиогенезе, разрушении внеклеточного матрикса и инвазии опухолевых клеток. Этот хемокин также осуществляет хемотаксическое притяжение различных лейкоцитов, особенно нейтрофилов, что иллюстрирует его участие в различных воспалительных реакциях, в том числе возникающих после травм. Интерлейкин 8 способствует миграции нейтрофилов, базофилов и Т-лимфоцитов в поврежденные участки. Его экспрессия, как и всех строго регулируемых цитокинов, очень низкая или почти не обнаруживается в физиологических условиях [58]. S.K. Carlsson и соавт. исследовали экспрессию ИЛ-8 у пациентов с ГБМ и обнаружили, что этот хемокин и VEGF являются мощными ангиогенными факторами развития злокачественных опухолей [59].

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Повреждение головного мозга в дополнение к задействованным клеткам иммунной системы вызывает миграцию нейрональных стволовых клеток и клеток-предшественников к месту повреждения. Эти клетки локально мигрируют в поврежденные участки и начинают процесс регенерации, дифференцируясь в нейроны, астроциты и олигодендроциты. Однако они также показывают повышенную экспрессию онкогенов, пониженную активность генов-супрессоров опухолей и высокую чувствительность к химическим мутагенным факторам. Чувствительность к мутагенным факторам, проявляемая стволовыми клетками, очень важна как во время травмы, так и в момент диффузии клеток иммунной системы в головной мозг. В этом случае на стволовые клетки воздействуют провоспалительные факторы и активные формы кислорода (АФК), продуцируемые эозинофилами [60]. Хотя АФК индуцируют апоптоз клеток, их количество, по-видимому, недостаточно для апоптоза интенсивно пролиферирующихся клеток микроглии и макрофагов, образующих около 1/3 массы глиальной опухоли [61]. В связи со способностью АФК индуцировать мутации, которые фундаментально изменяют функции микроглии, интенсивная пролиферация эозинофилов, индуцированная веществами, секретируемыми другими клетками иммунной системы, может вызывать злокачественную трансформацию клеток.

Нейрональные стволовые клетки очень чувствительны к мутагенным факторам и легко видоизменяются в результате их воздействия. Более того, сниженная активность генов-супрессоров опухолей ограничивает способность этих клеток противостоять трансформации в опухолевую клетку. Это может увеличивать частоту мутаций и образование быстро пролиферирующих опухолевых клеток, вследствие чего происходит увеличение массы опухоли (за счет не только деления, но и индуцирования образования микроокружения опухоли) [60, 62]. Так называемая миграция стволовых клеток была подтверждена в случаях демиелинизирующих заболеваний, ишемического инсульта и травм. Однако при травме эти клетки подвергаются воздействию вышеупомянутых факторов, и существует высокий риск неопластической трансформации. Поэтому представляется разумным связать повреждение, которое вызывает активность стволовых клеток головного мозга,

с последующим развитием новообразования. Данные клетки не только из субэпендимальной области, но и из других мест, считаются потенциально онкогенными [63]. Некоторые исследователи утверждают, что стволовые клетки из субэпендимальной области играют большую роль в глиомагенезе [39, 64].

РОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА

Окислительный, или оксидативный, стресс – это биохимический и физиологический стресс или повреждение, вызванное АФК и активными формами азота (АФА), сопровождающееся нарушением функции антиоксидантных механизмов. Вторичное повреждение головного мозга после ЧМТ в основном связано с оксидативным стрессом. Он играет большую роль в этиологии прогрессирующей патологии ЦНС при ЧМТ. Молекулы АФК очень реактивны и имеют короткий период полураспада из-за собственной нестабильности. Активные формы кислорода способны вызывать повреждение ДНК клеток, белков и липидов, что имеет серьезные последствия для аберрантной экспрессии генов и иногда приводит к инициации и/или прогрессированию опухоли, включая развитие глиом [61, 65, 66].

Известно, что продукция АФК модифицирует эпигенетический код, регулируя активность ферментов (например, каталазы), участвующих в деметилировании и деацетилировании гистонов. Тем не менее мало что известно о том, как окислительный стресс влияет на такие эпигенетически модифицирующие ферменты. Одним из основных механизмов, с помощью которых АФК участвуют в повреждении или метилировании ДНК, является образование аддуктов, ингибирующих метилирование соседних участков [67]. Эпигенетические механизмы имеют решающее значение для регуляции генов. Однако литературы, освещающей роль АФК в генерализованном гипометилировании и/или гиперметилировании определенных последовательностей генов в глиомах, очень мало. Поэтому необходимо провести больше исследований в этом направлении, а также изучить влияние АФК на эпигенетическую регуляцию. Это позволит лучше понять естественный ход глиомагенеза и взаимосвязь травмы и формирования глиом.

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ И ГЛИОМЕ

Об активации воспалительного процесса и окислительного стресса сообщается как при ЧМТ, так и при глиомах. Для обоих этих состояний, по-видимому, характерна общая сеть передачи сигналов. Известно, что активация воспаления также может способствовать онкогенезу за счет генерации АФК и активации окислительного стресса, и наоборот, окислительный стресс способствует воспалительному процессу [68]. В частности, в этой ситуации происходит активация астроцитов, микроглии и стволовых клеток, которые непосредственно участвуют в регулировании воспаления и окислительного стресса при ЧМТ и онкогенезе глиом [69, 70]. Во время окислительного стресса или воспаления в головном мозге увеличивается образование АФК в митохондриях. Некоторые специфические для опухолей внешние стимулы, включая фактор некроза опухоли α (TNF-α), приводят к снижению потенциала митохондриальной мембраны и влияют на компоненты цепи транспорта электронов, тем самым способствуя генерации АФК [69]. Более того, специфические факторы транскрипции, такие как TGF-β, митоген-активированные протеинкиназы (MAPK), AKT и киназы, регулируемые внеклеточными сигналами (ERK), могут вызывать конформационные изменения в клеточном мембранасвязанном мультимолекулярном ферментном комплексе NADPH-оксидаза (NOX) и увеличивать синтез АФК [69].

Еще один незаменимый сигнальный путь, участвующий в онкогенезе глиом и патогенезе ЧМТ, – фактор, индуцирующий гипоксию 1 (HIF-1), который может быть активирован в связи с ингибированием деградации посредством инактивации домена пролилгидроксилазы 2 (PHD-2). Этот фактор увеличивает экспрессию транспортера глюкозы 3 (GLUT3), эритропоэтина, VEGF и белка-3, взаимодействующего с BCL2 (BNIP3) [71].

Ядерный фактор «каппа-би» (NF-κB) может увеличивать генерацию АФК через петлю положительной обратной связи регуляции TNF. Кроме того, синтез АФК регулируется путем Ras/Raf/митоген-активируемая протеинкиназа (MEK) сигнального пути посредством регуляции экспрессии транскрипционного GATA-связывающего фактора 6 (GATA6) [71, 72]. Сообщалось, что активация фактора теплового шока 1 (HSF1) с помощью Ras увеличивает экспрессию сестрина-1 (SESN1) и сестрина-3 (SESN3), способствуя продукции АФК. TGF-β также увеличивает синтез АФК, активируя гликогенсинтазу киназу 3β (GSK3β) и мишень рапамицина млекопитающих (mTOR) в митохондриях, ингибируя антиоксидантные ферменты, в том числе супероксиддисмутазу (SOD) и глутатионпероксидазу (GPx) [73–75].

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ

Факторы транскрипции, такие как p53, фактор, индуцируемый гипоксией 1-α (HIF-1α), и c-MYC, имеют решающее значение для нормального развития клетки. Как известно, они регулируют метаболизм, рост, пролиферацию и дифференцировку клеток. Однако аберрантная экспрессия прослеживается при многих патологических состояниях, в том числе при ЧМТ и глиоме [31, 71].

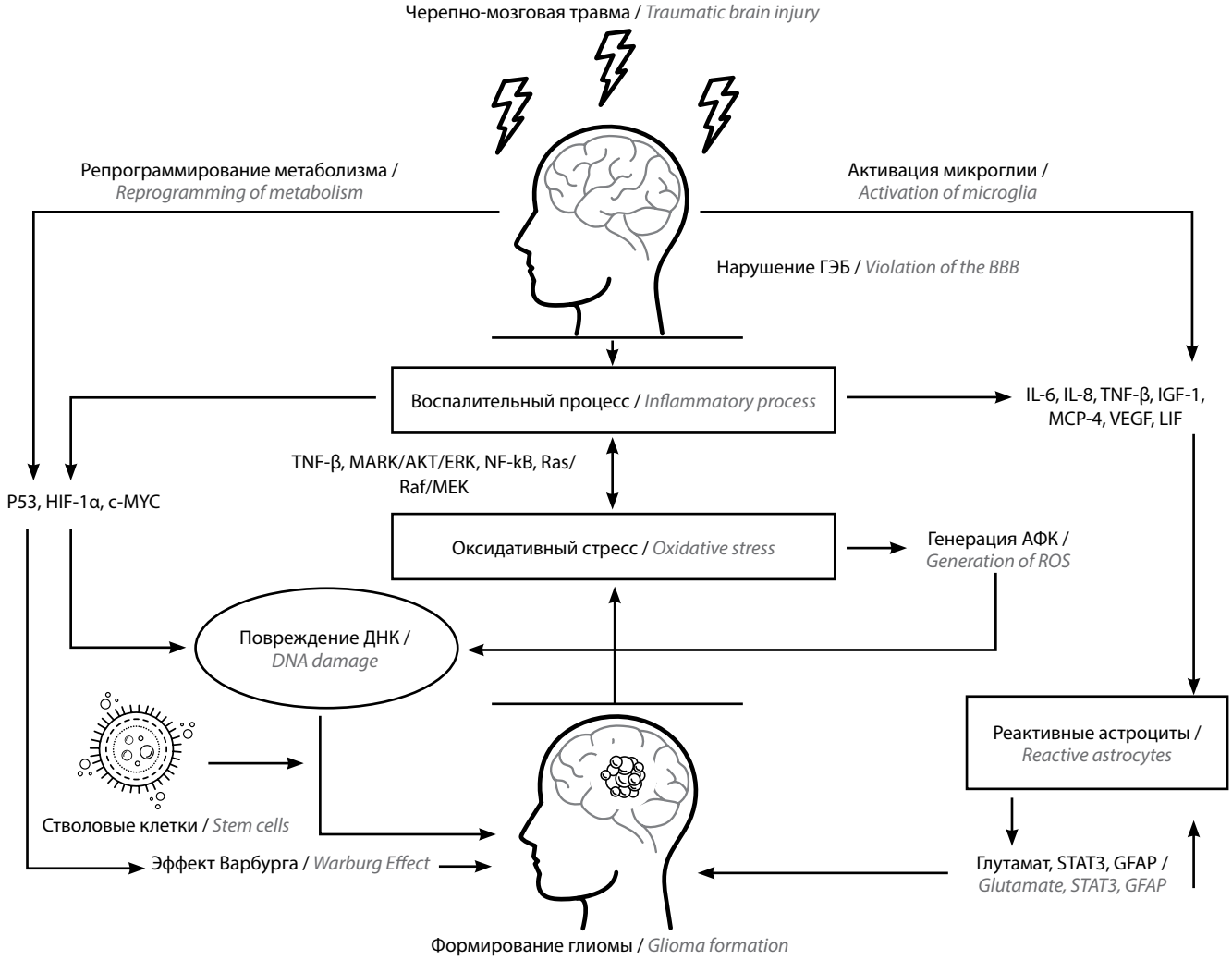
Было доказано, что при ЧМТ может изменяться энергетический метаболизм головного мозга, нарушаться процесс трансдукции и транспорта ионов Ca^{2+} на митохондриальном уровне. Следовательно, индукция окислительного стресса и нарушение клеточного транспорта ионов Ca^{2+} играют большую роль в патогенезе ЧМТ [76].

Существуют исследования, показывающие перепрограммирование метаболизма опухолевых клеток [77]. В одном из них было продемонстрировано, что потенциалзависимый анионный канал 1 (VDAC1) – митохондриальный белок, который контролирует энергетический баланс,– можно инактивировать, чтобы изменить перепрограммированный метаболизм опухоли. Инактивация VDAC1 вызывала увеличение экспрессии p53 и снижение экспрессии HIF-1α и c-MYC, что приводило к ингибированию пролиферации, дифференцировки и инвазивности опухолевых клеток [78].

Факторы транскрипции p53, HIF-1α и c-MYC, как известно, модулируют экспрессию нескольких сигнальных путей, включая те, которые ответственны за регулирование гликолиза [79]. Следовательно, нельзя исключить, что p53, HIF-1α, c-MYC и VDAC1 могут активироваться при ЧМТ и играть регуляторную роль в метаболическом репрограммировании (включая аэробный гликолиз, т.е. эффект Варбурга) [79]. Требуются дальнейшие исследования *in vitro* и *in vivo* для более подробного изучения роли данных факторов транскрипции в возможной связи между ЧМТ и онкогенезом глиом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Черепно-мозговые травмы долгое время считались одной из возможных причин возникновения опухолей головного мозга. Сначала в основном изучались менингиомы с посттравматической транслокацией вне естественного участка. В дальнейшем были выявлены случаи формирования глиом после ЧМТ. Описание роли стволовых клеток в свете различных наблюдений следует



Схематичное изображение возможной причинно-следственной связи между черепно-мозговой травмой и формированием глиом. ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; HIF-1α – фактор, индуцируемый гипоксией 1-α; TNF-β – прансформирующий фактор роста бета; NF-kB – ядерный фактор «каппа-би»; IL-6 – интерлейкин 6; IL-8 – интерлейкин 8; IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; LIF – лейкемия-ингибирующий фактор; STAT3 – активатор транскрипции 3; GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок; АФК – активные формы кислорода

Schematic representation of a possible causal relationship between traumatic brain injury (TBI) and the formation of gliomas. BBB – blood-brain barrier; HIF-1α – hypoxia-inducible factor 1-α; TNF-β – transforming growth factor β; NF-kB – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; IL-6 – interleukin 6; IL-8 – interleukin 8; IGF-1 – insulin-like growth factor 1; VEGF – vascular endothelial growth factor; LIF – leukemia inhibitory factor; STAT3 – signal transducer and activator of transcription 3; GFAP – glial fibrillary acidic protein; ROS – reactive oxygen species

принимать во внимание при анализе патологического процесса, приводящего к возникновению посттравматических глиальных опухолей. Стволовые клетки могут быть задействованы в опухолевой трансформации после травм. Исследований, направленных на изучение прямого влияния АФК на сигнальные пути и молекулярные механизмы онкогенеза глиом, и того, как эти молекулы участвуют в клеточном метаболизме опухолевой клетки, немного.

Глиальные опухоли формируются в результате сложного взаимодействия генетических и эпигенетических факторов. Имеются также подтверждения того, что иммунологические факторы играют большую роль в довольно сложном процессе взаимодействия генов между собой и факторов среды с определенными генами. Об активации воспалительного процесса и окислительного стресса сообщается как при ЧМТ, так и при глиомах. Оба эти состояния имеют общую сеть передачи сигналов. В частности, в случаях окислительного стресса или воспаления в головном мозге таким образом может генерироваться больше АФК. Имеются также подтверждения того, что после ЧМТ происходят перепрограммирование метаболизма, активация микроглии и реактивных астроцитов, которые играют большую роль в довольно сложном процессе взаимодействия генов между собой и факторов среды с определенными факторами транскрипции и могут привести к злокачественной трансформации клеток головного мозга (см. рисунок). Основываясь на результатах исследований, случаях и гипотезах, можно предположить, что любое состояние, вызывающее активный и длительный воспалительный процесс (любой тип структурного повреждения головного мозга, в том числе травма), может быть связано с риском возникновения глиом, особенно злокачественных. Хотя отчеты об эпидемиологических наблюдениях, включая когортные исследования, упомянутые в литературе, явно не подтверждают взаимосвязь ЧМТ и формирования глиом, есть данные, предполагающие ее возможность (см. табл. 2). При этом результаты представленных клинических исследований нельзя сравнивать некритически, поскольку они касаются разных этнических групп, людей разного возраста, проживающих в различных средах. Данные испытания также не были стандартизированы по типу и тяжести повреждения головного мозга. Сложности в их проведении связаны с низкой заболеваемостью опухолями головного мозга по сравнению с опухолями других областей и необходимостью масштабных и всесторонних эпидемиологических исследований посттравматической глиомы. Это подтверждается довольно большим количеством отчетов.

Следует учитывать, что пациенты с посттравматическими глиомами в анамнезе могли иметь какой-ли бо вид повреждения головного мозга в прошлом (например, инсульты). Они также должны были стать предметом более тщательной ретроспективной и проспективной проверки, дополненной подробной аутопсией головного мозга. Еще один важный вопрос – сравнение динамики роста опухоли у пациентов с посттравматическими глиомами после операции, различающимися по объему и локализации, и опухолями у пациентов, которых не оперировали. Интерес представляет также потенциальная миграция различных тканей, например цельной крови или морфотических элементов крови (лейкоцитов), в паренхиму головного мозга.

Все вышеперечисленные вопросы указывают на необходимость всестороннего доклинического исследования связи между ЧМТ и онкогенезом. Значительный временной интервал между травмой и возникновением опухоли затрудняет адекватное выполнение исследований *in vivo*. Их проведение на первичных культурах также проблематично из-за большого количества различных типов клеток, составляющих ткань мозга, и их метаболического взаимодействия. Использование иммортализованных линий глиальных клеток исключено в связи с их физиологической несхожестью с нормальными клетками головного мозга. Следовательно, нужны эффективные модели *in vivo* и *in vitro*, которые могли бы помочь в объяснении механизмов формирования посттравматических глиом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Soni N., Priya S., Bathla G. Texture analysis in cerebral gliomas: a review of the literature. Am J Neuroradiol 2019;40(6):928–34. DOI: 10.3174/ajnr.A6075.
2. Malzkorn B., Reifenberger G. Integrated diagnostics of diffuse astrocytic and oligodendroglial tumors. Pathologe 2019;40(Suppl 1):9–17. DOI: 10.1007/s00292-019-0581-8.
3. Wood M.D., Halfpenny A.M., Moore S.R. Applications of molecular neuro-oncology – a review of diffuse glioma integrated diagnosis and emerging molecular entities. Diagn Pathol 2019;14(1):29. DOI: 10.1186/s13000-019-0802-8.
4. Ewing J. The Bulkley Lectur. The modern attitude toward traumatic cancer. Bull New York Academy Med 1935;11:281–333.
5. Zulch K.J., Meinel H.D. The biology of brain tumours. In: Tumours of the brain and skull. Part I. Handbook of Clinical Neurology. Vol. 16. Ed. By P.J. Vinkin, G.W. Bruyn. Amsterdam: North Holland, 1974. Pp. 1–56.
6. Manuelidis E.E. Glioma in trauma. In: Pathology of the Nervous System. Ed. by J. Minckler. Vol. 2. New York: McGraw-Hill, 1978. Pp. 2237–40.
7. Moorthy R.K., Rajshekhar V. Development of glioblastoma multiforme following traumatic cerebral contusion: case report and review of literature. Surg Neurol 2001;61(2):180–4. DOI: 10.1016/s0090-3019(03)00423-3.
8. Monteiro G.T., Pereira R.A., Koifman R.J., Koifman S. Head injury and brain tumours in adults: A case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. Eur J Cancer 2006;42(7):917–21. DOI: 10.1016/j.ejca.2005.11.028.
9. Munch T.N., Gørtz S., Wohlfahrt J., Melbye M. The long-term risk of malignant astrocytic tumors after structural brain injury – a nationwide cohort study. Neuro Oncol 2015;17(5):718–24. DOI: 10.1093/neuonc/nou312.

10. Morantz R.A., Shain W. Trauma and brain tumours: an experimental study. Neurosurgery 1978;3:181–6.
11. Brenner M. Role of GFAP in CNS injuries. Neurosci Lett 2014;565:7–13. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.01.055.
12. Zhang L., Zhang W.P., Hu H. et al. Expression patterns of 5-lipoxygenase in human brain with traumatic injury and astrocytoma. Neuropathology 2006;26(2):99–106. DOI: 10.1111/j.1440-1789.2006.00658.x.
13. Härtig W., Michalski D., Seeger G. et al. Impact of 5-lipoxygenase inhibitors on the spatiotemporal distribution of inflammatory cells and neuronal COX-2 expression following experimental traumatic brain injury in rats. Brain Res 2013;1498:69–84. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.12.022.
14. Nathoo N., Prayson R.A., Bondar J. et al. Increased expression of 5-lipoxygenase in high-grade astrocytomas. Neurosurgery 2006;58(2):347–5. DOI: 10.1227/01.NEU.0000195096.43258.94.
15. Ishii K., Zaitsu M., Yonemitsu N. et al. 5-lipoxygenase pathway promotes cell proliferation in human glioma cell lines. Clin Neuropathol 2009;28(6):445–52. DOI: 10.5414/npp28445.
16. Tyagi V., Theobald J., Barger J. et al. Traumatic brain injury and subsequent glioblastoma development: Review of the literature and case reports. Surg Neurol Int 2016;7:78. DOI: 10.4103/2152-7806.189296.
17. Coskun S., Coskun A., Gursan N., Aydin M.D. Post-traumatic glioblastoma multiforme: a case report. Eurasian J Med 2011;43(1):50–3. DOI: 10.5152/eajm.2011.10.
18. Juškys R., Chomanskis Ž. Glioblastoma following traumatic brain injury: case report and literature review. Cureus 2020;12(5):e8019. DOI: 10.7759/cureus.8019.
19. Zhou B., Liu W. Post-traumatic glioma: report of one case and review of the literature. Int J Med Sci 2010;7(5):248–50. DOI: 10.7150/ijms.7.248.
20. Spallone A., Izzo C., Orlandi A. Posttraumatic glioma: report of a case. Case Rep Oncol 2013;6(2):403–9. DOI: 10.1159/000354340.
21. Monteiro G.T., Pereira R.A., Koifman R.J., Koifman S. Head injury and brain tumours in adults: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. Eur J Cancer 2006;42(7):917–21. DOI: 10.1016/j.ejca.2005.11.028.
22. Nygren C., Adami J., Ye W., Bellocco R. Primary brain tumors following traumatic brain injury – a population-based cohort study in Sweden. Cancer Causes Control 2001;12(8):733–7. DOI: 10.1023/A:10112276172568.8.
23. Chen Y.H., Keller J.J., Kang J.H., Lin H.C. Association between traumatic brain injury and the subsequent risk of brain cancer. J Neurotrauma 2012;29(7):1328–33. DOI: 10.1089/neu.2011. 22357.
24. Munch T.N., Gørtz S., Wohlfahrt J., Melbye M. The long-term risk of malignant astrocytic tumors after structural brain injury – a nationwide cohort study. Neuro Oncol 2015;17(5):718–24. DOI: 10.1093/neuonc/ nou3126.
25. Han Z., Du Y., Qi H., Yin W. Post-traumatic malignant glioma in a pregnant woman: case report and review of the literature. Neurol Med Chir (Tokyo) 2013;53(9):630–4. DOI: 10.2176/nmc.cr2013-0029.
26. Anselmi E., Vallisa D., Bertè R. et al. Post-traumatic glioma: report of two cases. Tumori 2006;92(2):175–7.
27. Hirsiger S., Simmen H.P., Werner C.M. et al. Danger signals activating the immune response after trauma. Mediators Inflamm 2012;315941. DOI: 10.1155/2012/315941.
28. Jha R.M., Kochanek P.M., Simard JM. Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury. Neuropharmacology 2019;145(Pt.B):230–246. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.08.004.
29. Wofford K.L., Loane D.J., Cullen D.K. Acute drivers of neuroinflammation in traumatic brain injury. Neural Regen Res 2019;14(9):1481–9. DOI: 10.4103/1673-5374.255958.
30. Xu B., Yu D.M., Liu F.S. Effect of siRNA induced inhibition of IL 6 expression in rat cerebral gliocytes on cerebral edema following traumatic brain injury. Mol Med Rep 2014;10(4):1863–8. DOI: 10.3892/mmr.2014.2462.
31. Cho A., McKelvey K.J., Lee A., Hudson A.L. The intertwined fates of inflammation and coagulation in glioma. Mamm Genome 2018;29(11–12):806–16. DOI: 10.1007/s00335-018-9761-8.
32. Neagu M., Constantin C., Caruntu C. et al. Inflammation: a key process in skin tumorigenesis. Oncol Lett 2019;17(5):4068–84. DOI: 10.3892/ol.2018.9735.
33. Needham E.J., Helmy A., Zanier E.R. et al. The immunological response to traumatic brain injury. J Neuroimmunol 2019;332:112–25. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2019.04.005.
34. Elder G.A., Ehrlich M.E., Gandy S. Relationship of traumatic brain injury to chronic mental health problems and dementia in military veterans. Neurosci Lett 2019;707:134294. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.134294.
35. Clark D.P.Q., Perreau V.M., Shultz S.R. et al. Inflammation in traumatic brain injury: roles for toxic A1 astrocytes and microglial-astrocytic crosstalk. Neurochem Res 2019;44(6):1410–24. DOI: 10.1007/s11064-019-02721-8.
36. Smith C., Gentleman S.M., Leclercq P.D. et al. The neuroinflammatory response in humans after traumatic brain injury. Neuropathol Appl Neurobiol 2013; 39(6):654–66. DOI: 10.1111/nan.12008.
37. Mostofa A.G., Punganuru S.R. et al. The process and regulatory components of inflammation in brain oncogenesis. Biomolecules 2017;7(2):E34. DOI: 10.3390/biom7020034.
38. Jo J., Wen P.Y. Antiangiogenic therapy of high-grade gliomas. Prog Neurol Surg 2018;31:180–99. DOI: 10.1159/000467379.
39. Schiffer D., Annovazzi L., Casalone C., Corona C., Mellai M. Glioblastoma: Microenvironment and Niche Concept. Cancers (Basel) 2018;11(1).E5. DOI: 10.3390/cancers11010005.
40. Van Bodegraven E.J., van Asperen J.V. et al. Importance of GFAP isoform-specific analyses in astrocytoma. Glia 2019;67(8):1417–33. DOI: 10.1002/glia.23594.
41. Valori C.F., Guidotti G., Brambilla L., Rossi D. Astrocytes: Emerging therapeutic targets in neurological disorders. Trends Mol Med 2019;25(99):750–9. DOI: 10.1016/j.molmed.2019.04.010.
42. Guan X., Hasan M.N., Maniar S. et al. Reactive Astrocytes in glioblastoma multiforme. Mol Neurobiol 2018;55(8):6927–38. DOI: 10.1007/s12035-018-0880-8.
43. Gimple R.C., Bhargava S., Dixit D., Rich J.N. Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. Genes Dev 2019;33(11–12):591–609. DOI: 10.1101/gad.324301.119.
44. Schiffer D., Giordana M.T., Cvalla P. et al. Immunohistochemistry of glial reaction after injury in the rat: double staining and markers of cell proliferation. Int J Dev Neurosci 1993;11(2):269–80.
45. Hill-Felberg S.J., McIntosh T.K., Oliver D.L. et al. Concurrent loss and proliferation of astrocytes following lateral fluid percussion brain injury in the adult rat. J Neurosci Res 1999;57(2):271–9. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19990715)57:2<271::AID-JNR13>3.0.CO;2-Z.
46. Kernie S.G., Erwin T.M., Parada L.F. Brain remodeling due to neuronal and astrocytic proliferation after controlled cortical injury in mice. J Neuroci Res 2001;66(3):317–26. HTTPS://DOI.ORG/10.1002/jnr.10013.
47. Cassatella M.A., Östberg N.K., Tamassia N., Soehnlein O. Biological roles of neutrophil-derived granule proteins and cytokines. Trends Immunol 2019;40(7):648–64. DOI: 10.1016/j.it.2019.05.003.
48. Ferrer V.P., Moura Neto V., Mentlein R. Glioma infiltration and extracellular matrix: key players and modulators. Glia 2018;66(8):1542–65. DOI: 10.1002/glia.23309.

49. West P.K., Viengkhou B., Campbell I.L., Hofer M.J. Microglia responses to interleukin-6 and type I interferons in neuroinflammatory disease. Glia 2019;67(10):1821–41.DOI: 10.1002/glia.23634.
50. Chang N., Ahn S.H., Kong D.S. et al. The role of STAT3 in glioblastoma progression through dual influences on tumor cells and the immune microenvironment. Mol Cell Endocrinol 2017;451:53–65. DOI: 10.1016/j.mce.2017.01.004.
51. Linder B., Weirauch U., Ewe A. et al. Therapeutic targeting of Stat3 using lipopolyplex nanoparticle-formulated siRNA in a syngeneic orthotopic mouse glioma model. Cancers (Basel) 2019;11(3):E333. DOI: 10.3390/cancers11030333.
52. Zhan X., Gao H., Sun W. Correlations of IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 and TNF-α with the pathological stage and prognosis of glioma patients. Minerva Med 2019;(111)20:192–5. DOI: 10.23736/S0026-4806.19.06101-9.
53. Samaras V., Piperi C., Korkolopoulou P. et al. Application of the ELISPOT method for comparative analysis of interleukin (IL)-6 and IL-10 secretion in peripheral blood of patients with astroglial tumors. Mol Cell Biochem 2007;304(1–2):343–51. DOI: 10.1007/s11010-007-9517-3.
54. Li R., Li G., Deng L. et al. IL-6 augments the invasiveness of U87MG human glioblastoma multiforme cells via up-regulation of MMP-2 and fascin-1. Oncol Rep 2010;23:1553–9. DOI: 10.3892/or_00000795.
55. Wang H., Lathia J.D., Wu Q. et al. Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. Stem Cells 2009;27(10):2393–404. DOI: 10.1002/stem.188.
56. Yousefzadeh-Chabok S., Dehnadi Moghaddam A., Kazemnejad-Leili E. et al. The relationship between serum levels of Interleukins 6, 8, 10 and clinical outcome in patients with severe traumatic brain injury. Arch Trauma Res 2015;4(1):e18357. DOI: 10.5812/atr.18357.
57. Kosmopoulos M., Christofides A., Drekolias D. et al. Critical role of IL-8 targeting in gliomas. Curr Med Chem 2018;25(17):1954–67. DOI: 10.2174/0929867325666171129125712.
58. Christofides A., Kosmopoulos M., Piperi C. Pathophysiological mechanisms regulated by cytokines in gliomas. Cytokine 2015;71(2):377–84. DOI: 10.1016/j.cyto.2014.09.008.
59. Carlsson S.K., Brothers S.P., Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. EMBO Mol Med 2014;6(11):1359–70. DOI: 10.15252/emmm.201302627.
60. Figarella-Branger D., Colin C., Tchoghandjian A. et al. Glioblastomas: gliomagenesis, genetics, angiogenesis, and microenvironment. Neurochirurgie 2010;56(6):441–8. DOI: 10.1016/j.neuchi.2010.07.010.
61. Salazar-Ramiro A., Ramírez-Ortega D., de la Cruz V.P. et al. Role of redox status in development of glioblastoma. Front Immunol 2016;7:156. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00156.
62. Korbecki J., Gutowska I., Kojder I. et al. New extracellular factors in glioblastoma multiforme development: neurotensin, growth differentiation factor-15, sphingosine-1-phosphate and cytomegalovirus infection. Oncotarget 2018;9(6):7219–70. DOI: 10.18632/oncotarget.24102.
63. Ma Q., Long W., Xing C. et al. Cancer stem cells and immunosuppressive microenvironment in glioma. Front Immunol 2018;9:2924. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02924.
64. Zhou J., Shrikhande G., Xu J. et al. Tsc1 mutant neural stem/progenitor cells exhibit migration deficits and give rise to subependymal lesions in the lateral ventricle. Genes Dev 2011;25(15):1595–600. DOI: 10.1101/gad.16750211.
65. Rinaldi M., Caffo M., Minutoli L. et al. ROS and brain gliomas: an overview of potential and innovative therapeutic strategies. Int J Mol Sci 2016;17(6):E984. DOI: 10.3390/ijms17060984.
66. Ciccarone F., Castelli S., Ciriolo M.R. Oxidative stress-driven autophagy acROSs onset and therapeutic outcome in hepatocellular carcinoma. Oxid Med Cell Longev 2019;2019:6050123. DOI: 10.1155/2019/6050123.
67. Sanchez-Perez Y., Soto-Reyes E., Garcia-Cuellar C.M. et al. Role of epigenetics and oxidative stress in gliomagenesis. CNS Neurol Disord Drug Targets 2017;16(10):1090–8. DOI: 10.2174/1871527317666180110124645.
68. Colquhoun A. Cell biology-metabolic crosstalk in glioma. Int J Biochem Cell Biol 2017;89:171–81. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.05.022.
69. Galgano M., Toshkezi G., Qiu X. et al. Traumatic brain injury: current treatment strategies and future endeavors. Cell Transplant 2017;26(7):1118–30. DOI: 10.1177/0963689717714102.
70. Conti A., Gulì C., La Torre D. et al. Role of inflammation and oxidative stress mediators in gliomas. Cancers (Basel) 2010;2(2):693–712. DOI: 10.3390/cancers2020693.
71. Khan M., Khan H., Singh I., Singh A.K. Hypoxia inducible factor-1 alpha stabilization for regenerative therapy in traumatic brain injury. Neural Regen Res 2017;12(5):696–701. DOI: 10.4103/1673-5374.206632.
72. Tu J., Fang Y., Han D. et al. Activation of nuclear factor-kappaB in the angiogenesis of glioma: Insights into the associated molecular mechanisms and targeted therapies. Cell Prolif 2021;54(2):e12929. DOI: 10.1111/cpr.12929.
73. D'Souza L.C., Mishra S., Chakraborty A. et al. Oxidative stress and cancer development: are noncoding RNAs the missing links? Antioxid Redox Signal 2020;33(17):1209–29. DOI: 10.1089/ars.2019.7987.
74. Li X., Wu C., Chen N. et al. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. Oncotarget 2016;7(22):33440–50. DOI: 10.18632/oncotarget.7961.
75. Cohen A.L., Colman H. Glioma biology and molecular markers. Cancer Treat Res 2015;163:15–30. DOI: 10.1007/978-3-319-12048-5_2.
76. Kupats E., Stelfa G., Zvejniece B. et al. Mitochondrial-protective effects of R-phenibut after experimental traumatic brain injury. Oxid Med Cell Longev 2020;2020:9364598. DOI: 10.1155/2020/9364598.
77. Vander Heiden M.G., DeBerardinis R.J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology Cell 2017;168(4):657–69. DOI: 10.1016/j.cell.2016.12.039.
78. Shteinfer-Kuzmine A., Arif T., Krelin Y. et al. Mitochondrial VDAC1-based peptides: attacking oncogenic properties in glioblastoma. Oncotarget 2017;8(19):31329–46. DOI: 10.18632/oncotarget.15455.
79. Vaupel P., Schmidberger H., Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. Int J Radiat Biol 2019;95(7):912–9. DOI: 10.1080/09553002.2019.1589653.

Благодарность. Спасибо всем рецензентам за их мнения и предложения.
Acknowledgment. Thanks to all the peer reviewers for their opinions and suggestions.

Вклад авторов
И.Ф. Гареев, Ю.Г. Филиппов: разработка дизайна исследования, написание текста статьи;
О.А. Бейлерли, А.А. Суфианов: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;
У.Ф. Мухаметов, А.В. Тюрин, Guang Yang, А.Т. Бейлерли: редактирование статьи.
Autrors' contributions
I.F. Gareev, Yu.G. Filippov: development of research design, article writing;
O.A. Beylerli, A.A. Sufianov: review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained;
U.F. Mukhametov, A.V. Tyurin, Guang Yang, A.T. Beilerli: article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors
И.Ф. Гареев / I.F. Gareev: https://orcid.org/0000-0002-4965-0835
Ю.Г. Филиппов / Yu.G. Filippov: https://orcid.org/0000-0002-3033-6029
О.А. Бейлерли / O.A. Beylerli: https://orcid.org/0000-0002-6149-5460
А.А. Суфианов / A.A. Sufianov: https://orcid.org/0000-0001-7580-0385
Guang Yang: https://orcid.org/0000-0002-7173-1914
А.Т. Бейлерли / A.T. Beilerli: https://orcid.org/0000-0002-3486-6246

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

Статья поступила: 22.07.2021. **Принята к публикации:** 24.11.2021.
Article submitted: 22.07.2021. **Accepted for publication:** 24.11.2021.

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-42-52

CC BY

Роль ретроэлементов в развитии наследственных опухолевых синдромов

Р.Н. Мустафин[1], Э.К. Хуснутдинова[2]

[1]ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»; Россия, 450008 Уфа, ул. Ленина, 3;
[2]Институт биохимии и генетики ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр» Российской академии наук; Россия, 450054 Уфа, пр-т Октября, 71

Контакты: Рустам Наилевич Мустафин *ruji79@mail.ru*

В развитии злокачественных новообразований большую роль играет геномная нестабильность, обусловленная активированными ретроэлементами. Происходит усиленная экспрессия онкогенов, которые содержат последовательности транспозонов в промоторах и интронах. При этом гены онкосупрессоров инактивируются, поскольку содержат горячие точки инсерционного мутагенеза. В то же время ретроэлементы содержат последовательности, чувствительные к негативному регуляторному влиянию онкосупрессоров. Поэтому их инактивация усиливает геномную нестабильность при канцерогенезе вследствие устранения сайленсинга ретроэлементов.
Цель статьи – описать механизмы влияния ретротранспозонов на развитие наследственных опухолевых синдромов, что позволит по-новому рассмотреть классические представления канцерогенеза.
Представленные данные позволяют пересмотреть двухударную гипотезу Кнудсона при наследственных опухолевых синдромах, поскольку герминативная инактивация 1 аллеля онкосупрессорного гена способствует развитию злокачественных опухолей из-за повышения активности транспозонов. Соматическая инактивация 2-го аллеля является не причиной, а следствием развившейся в неоплазме геномной нестабильности и может влиять на клональную эволюцию и прогрессирование канцерогенеза.

Ключевые слова: канцерогенез, наследственные опухолевые синдромы, онкогены, онкосупрессоры, ретроэлементы

Для цитирования: Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Роль ретроэлементов в развитии наследственных опухолевых синдромов. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(4):42–52. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-42-52.

The role of retroelements in the development of hereditary tumor syndromes

R.N. Mustafin[1], E.K. Khusnutdinova[2]

[1]Bashkir State Medical University; 3 Lenin St., Ufa 450008, Russia;
[2]Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Center of Russian Academy of Sciences; 71 Prospekt Oktyabrya, Ufa 450054, Russia

Contacts: Rustam Nailevich Mustafin *ruji79@mail.ru*

Genomic instability caused by activated retroelements plays an important role in the development of malignant neoplasms. Activated retroelements cause enhanced expression of oncogenes containing transposon sequences in their promoters and introns. Oncosuppressor genes contain hot spots of insertional mutagenesis, therefore retroelements cause their inactivation. As a result, genomic instability increases during the development of tumors, since oncosuppressors normally silence retrotransposons. Accordingly, inactivation of the oncosuppressor causes increased expression of retroelements.
The study objective is to describe the role of retrotransposons on the development of hereditary tumor syndromes, which will allow a new look at the classical concepts of carcinogenesis. The data we have described allow us to consider in a new way the Knudson's two-hit hypothesis in hereditary tumor syndromes, since the germinal inactivation of 1 allele of the oncosuppressor gene promotes the development of malignant tumors due to an increase in the activity of transposons. The consequence of the developed instability in the tumor is the inactivation of the second allele of the oncosuppressor gene, which contributes to clonal evolution and the progression of carcinogenesis.

Key words: carcinogenesis, hereditary tumor syndromes, oncogenes, tumor suppressors, retroelements

For citation: Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. The role of retroelements in the development of hereditary tumor syndromes. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2021;8(4):42–52. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-42-52.

ВВЕДЕНИЕ

Более 45 % всех последовательностей ДНК человека занимают транспозоны – специфические элементы, способные к перемещению внутри генома и горизонтальному переносу. Они подразделяются на 2 класса в зависимости от особенностей их транспозиций. К 1-му классу относятся ретроэлементы (РЭ), которые перемещаются с помощью обратной транскриптазы и эндонуклеазы, используя промежуточный транскрипт РНК. Различают содержащие LTR (long terminal repeats) РЭ (LTR-РЭ) и не содержащие LTR (non-LTR РЭ) [1]. К последним относятся автономные LINE1 (long interspersed elements-1; составляют 17 % генома человека, 500 000 элементов), неавтономные SINE (short interspersed repeats) и SVA (SINE-VNTR-Alu). Среди SINE наиболее распространены Alu (составляют 11 % генома, более 1,1 млн копий) [2]. Ретроэлементы, содержащие LTR, включают эндогенные ретровирусы (ERV) и занимают 8 % генома человека. Ко 2-му классу относятся ДНК-транспозоны, которые перемещаются по механизму «вырезания и вставки» [1].

Доказано, что инсерции РЭ представляют собой фактор риска развития как спорадических злокачественных новообразований (ЗНО) [2], так и наследственных опухолевых синдромов [1]. Это связано с наличием горячих точек мутагенеза в онкосупрессорных генах (ОСГ) [3–7], причинами которых могут быть эволюционная роль РЭ в возникновении белок-кодирующих генов [1] и сохранение в них инсерций РЭ в связи с адаптивным значением. То есть гены содержат комплементарные РЭ последовательности, способствующие большей вероятности инсерций. Ранее считалось, что доля РЭ в геноме человека составляет 45 %, однако последние исследования показали, что транспозоны могут занимать более 2/3 всего генома [8]. Разработанные методики определения скрытых РЭ в геномах животных позволили убедиться, что от транспозонов в эволюции произошло значительное количество белок-кодирующих генов и регуляторных последовательностей [9].

Доля наследственных опухолевых синдромов ко всем случаям рака у детей составляет от 3,6 до 16 %. Известно более 40 ОСГ, мутации в которых вызывают данные синдромы (см. таблицу). Для большинства из них характерен аутосомно-доминантный тип наследования. Однако для синдромов Блума, Ниймеген, Швахмана–Даймонда и Линча, анемии Фанкони, атаксии-телеангиэктазии, врожденной амегакариоцитарной тромбоцитопении определен аутосомно-рецессивный, а для Х-сцепленного лимфопролиферативного синдрома, анемии Фанкони, обусловленной мутацией в гене *FANCB*, врожденного дискератоза, синдрома Вискотта–Олдрича – Х-сцепленный рецессивный тип наследования [10]. То есть при данных заболеваниях специфична герминативная

Гены онкосупрессоров и наследственные опухолевые синдромы

Oncosuppressor genes and hereditary tumor syndromes

Гены Genes	Синдром/заболевание Syndrome/disease	Неопухолевые клинические проявления/характерные опухоли Non-neoplastic clinical manifestations/specific tumors
APC	Синдром Гарднера Gardner's syndrome	Аномалии развития зубов, кисты сальных желез / рак толстой кишки, медуллобластома, гепатобластома, рак желудка Anomalies in the development of teeth, cysts of the sebaceous glands / colon cancer, medulloblastoma, hepatoblastoma, stomach cancer
ATM	Атаксия-телеангиэктазия Ataxia-telangiectasia	Иммунодефицит, телеангиэктазии лица и глаз, атаксия, низкий рост, дегенерация центральной нервной системы, преждевременное старение / лейкозы, лимфомы, карциномы immunodeficiency, telangiectasias of the face and eyes, ataxia, short stature, central nervous system degeneration, premature aging / leukemia, lymphomas, carcinomas
BLM	Синдром Блума Bloom's syndrome	Иммунодефицит, гипогонадизм, микроцефалия, низкий рост / лимфомы и лейкозы Immunodeficiency, hypogonadism, microcephaly, short stature / lymphomas and leukemias
BRCA1, BRCA2	Наследственный рак молочной железы Hereditary breast cancer	– / рак молочной железы – / breast cancer
CBL	Синдром CBL CBL syndrome	Дизморфизм лица, аномалии грудной клетки, короткая шея, гипермобильность суставов / ювенильный миеломоноцитарный лейкоз Face dysmorphism, chest abnormalities, short neck, hyperextension of joints / juvenile myelomonocytic leukemia
FAS, CASP10, IL12, RB1	Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром Autoimmune lymphoproliferative syndrome	Гипергаммаглобулинемия, лимфаденопатия с гепатоспленомегалией и аутоиммунной цитопенией / лимфомы, рак языка, молочной железы, кожи, щитовидной железы, печени Hypergammaglobulinemia, lymphadenopathy with hepatosplenomegaly and autoimmune cytopenia / lymphomas, cancer of the tongue, breast, skin, thyroid, liver

Продолжение таблицы
Continuation of table

Гены Genes	Синдром/заболевание Syndrome/disease	Неопухолевые клинические проявления/характерные опухоли Non-neoplastic clinical manifestations/specific tumors
CDH1	Наследственный рак желудка Hereditary stomach cancer	– / рак желудка – / stomach cancer
CDKN2A	Наследственная меланома Hereditary melanoma	– / меланома – / melanoma
CEBPA	Синдром CEBPA CEBPA syndrome	МДС, ОМЛ MDS, AML
CHEK22	Синдром Ли–Фраумени 2 Li–Fraumeni syndrome 2	– / рак молочной железы – / breast cancer
DICER1	Синдром DICER1 DICER1 syndrome	Макроцефалия, аномалии почек и глаз / кистозная нефрома, плевропульмональная бластома Macrocephaly, kidney and eye abnormalities / cystic nephroma, pleuropulmonary blastoma
DKC1, WRAP53	Врожденный дискератоз Congenital dyskeratosis	Дистрофия ногтевых пластинок, лейкоплакия слизистой полости рта, аномальная пигментация кожи / МДС, ОМЛ Degeneration of the nail plates, leukoplakia of the oral mucosa, abnormal skin pigmentation / MDS, AML
ELANE, HAX1	Синдром Костмана Kostman syndrome	Хронические рецидивирующие инфекции, врожденная нейтропения / МДС, ОМЛ Chronic recurrent infections, congenital neutropenia / MDS, AML
ETV6	Синдром ETV6 ETV6 syndrome	Тромбоцитопения / рак толстой кишки, МДС, ОМЛ, ОЛЛ Thrombocytopenia / colon cancer, MDS, AML, ALL
FANCA	Анемия Фанкони Fanconi anemia	CALM, низкий рост, гипогонадизм, глухота, умственная отсталость, врожденные пороки развития сердца, почек и конечностей / опухоль Вильмса, опухоль головного мозга, плоскоклеточный рак, лейкоз CALM, short stature, hypogonadism, deafness, mental retardation, congenital malformations of the heart, kidneys and extremities / Wilms tumor, BT, squamous cell carcinoma, leukemia
GATA2	Синдром MonoMAC MonoMAC syndrome	Моноцитопения, лимфопения, частые инфекции / МДС, ОМЛ Monocytopenia, lymphopenia, frequent infections / MDS, AML
MEN1	Множественная эндокринная неоплазия 1-го типа Multiple endocrine neoplasia type 1	– / инсулинома, аденомы гипофиза или паращитовидных желез –/ insulinoma, pituitary or parathyroid adenoma
MLH1, MSH2	Синдром Линча Linch syndrome	CALM / рак толстой кишки, ОЛЛ, миелолейкоз, лимфома, опухоль головного мозга CALM / colon cancer, ALL, myeloid leukemia, lymphoma, brain tumor
MPL	Врожденная амегакариоцитарная тромбоцитопения Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia	Тромбоцитопения / МДС, ОМЛ Thrombocytopenia / MDS, AML
MYH	MYH-ассоциированный полипоз MYH-associated polyposis	– / рак толстой кишки – / colon cancer,
NBN	Синдром Ниймеген Nijmegen syndrome	CALM, лицевой дизморфизм, недостаточность костного мозга, рецидивирующие инфекции / рабдомиосаркома, лимфомы, ОМЛ, ОЛЛ CALM, facial dysmorphism, bone marrow failure, recurrent infections / rhabdomyosarcoma, lymphomas, AML, ALL

Продолжение таблицы
Continuation of table

Гены Genes	Синдром/заболевание Syndrome/disease	Неопухолевые клинические проявления/характерные опухоли Non-neoplastic clinical manifestations/specific tumors
NF1	Нейрофиброматоз 1-го типа Neurofibromatosis type 1	CALM, веснушчатость, скелетные аномалии / нейрофибромы, глиомы, феохромоцитомы, ОМЛ, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз CALM, freckles, skeletal anomalies / neurofibromas, gliomas, pheochromocytomas, AML, juvenile myelomonocytic leukemia
NF2	Нейрофиброматоз 2-го типа Neurofibromatosis type 2	CALM, веснушчатость / нейрофибромы, глиомы, астроцитомы, невриномы слуховых нервов CALM, freckles / neurofibromas, gliomas, astrocytomas, acoustic neuromas
PAX5	Синдром PAX5 PAX5 syndrome	– / ОЛЛ – / ALL
PTCH1	Синдром Горлина–Гольца Gorlin–Goltz syndrome	Макроцефалия, аномалии ребер, дизморфизм лица, кальцификация серпа головного мозга, кисты челюстей / базальноклеточный рак Macrocephaly, rib abnormalities, facial dysmorphism, sickle calcification, jaw cysts / basal cell carcinoma
PTEN, SDHB, SDHD, KLLN	Синдром Коудена Cowden's syndrome	Лейкоплакия слизистой ротовой полости, умственная отсталость, атаксия, скелетные аномалии / рак молочной и щитовидной желез Leukoplakia of oral mucosa, mental retardation, ataxia, skeletal anomalies / breast and thyroid cancer
PTPN11	Синдром Нунан Noonan syndrome	CALM, дизморфизм лица, низкий рост, короткая шея, врожденные пороки развития сердца, нарушения свертывания крови / нейробластома, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, ОЛЛ CALM, face dysmorphism, short stature, short neck, congential malformations of the heart, blood clotting disorders / neuroblastoma, juvenile myelomonocytic leukemia, ALL
RB1	Семейная ретинобластома Familial retinoblastoma	– / ретинобластома, остеосаркома, меланома, глиома – / retinoblastoma, osteosarcoma, melanoma, glioma
RUNX1	Семейная тромбоцитопатия Familial thrombocytopathy	Тромбоцитопения, аномалии фукнции тромбоцитов / МДС, ОМЛ Thrombocytopenia, platelet function abnormalities / MDS, AML
RPS-7, RPS-10, RPS-24, RPL-11, GATA1	Анемия Даймонда–Блекфена Diamond–Blackfan anemia	Врожденные пороки развития сердца, мочевыделительной системы, черепа, верхних конечностей, анемия, низкий рост / саркома, рак толстой кишки, МДС, ОЛЛ, ОМЛ Congential malformations of the heart, urinary system, skull, upper limbs, anemia, short stature / sarcoma, colon cancer, MDS, ALL, AML
SBDS	Синдром Швахмана–Даймонда Schwachman–Diamond syndrome	Скелетные аномалии, панцитопения / МДС, ОМЛ, ОЛЛ Skeletal abnormalities, pancytopenia / MDS, AML, ALL
SDHB	Семейная параганглиома Familial paraganglioma	– / параганглиома, феохромоцитома – / paraganglioma, pheochromacytoma
SH2D1A	Х-сцепленный лимфопролиферативный синдром X-linked lymphoprolifera-tive syndrome	Тяжелый иммунодефицит, мононуклеоз, гипогаммаглобулинемия / неходжкинская лимфома, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз Severe immunodeficiency, mononucleosis, hypogammoglobulinemia / non-Hodgkin's lymphoma, hemophagocytic lymphohistiocytosis
SMAD4	Семейный ювенильный полипоз Amilial juvenile polyposis	– / полипы толстого кишечника, рак толстой кишки – / colon polyps, colon cancer
STK11, LKB1	Синдром Пейтца–Егерса Peutz–Jeghers syndrome	Пигментные пятна на лице и слизистой полости рта / рак толстой кишки, поджелудочной железы, яичника, молочной железы Age spots on the face and oral mucosa / colon cancer, cancer of the pancreas, ovary, breast

Окончание таблицы
End of table

Гены Genes	Синдром/заболевание Syndrome/disease	Неопухолевые клинические проявления/характерные опухоли Non-neoplastic clinical manifestations/specific tumors
TSC1, TSC2	Туберозный склероз Tuberous sclerosis	Гипопигментные пятна и шагреневые бляшки на коже, умственная отсталость, кисты почек / гамартомы и опухоли сердца, почек, опухоль головного мозга Hypopigmented spots and pebbled plaques on the skin, mental retardation, renal cysts / hamartomas and tumors of the heart and kidneys, brain tumor
TP53	Синдром Ли–Фраумени Li–Fraumeni syndrome	– /саркомы мягких тканей, остеосаркомы, рак молочной железы, лейкоз, адренокортикальный рак, опухоль головного мозга – / soft tissue sarcomas, osteosarcomas, breast cancer, leukemia, adrenocortical carcinoma, brain tumor
VHL	Синдром Гиппеля–Линдау von Hippel–Lindau disease	Кисты почек, головного и спинного мозга / опухоль спинного мозга, рак почки, феохромоцитома, опухоль головного мозга Cysts of the kidneys, brain and spinal cord / tumor of the spinal cord, kidney cancer, pheochromacytoma, brain tumor
WAS	Синдром Вискотта–Олдрича Wiskott–Aldrich syndrome	Иммунодефицит, тромбоцитопения, экзема / лейкозы, лимфомы, астроцитома мозжечка, опухоли гладкомышечных клеток, саркома Капоши Immunodeficiency, thrombocytopenia, eczema / leukemia, lymphomas, cerebellar astrocytoma, smooth muscle cell tumors, Kaposi's sarcoma
WT1	Синдром Дениса–Драша Denis–Drash syndrome	Диффузный мезангиальный склероз почек, дисгенезия гонад у мальчиков / нефробластома, гонадобластома Diffuse mesangial renal sclerosis, gonadal dysgenesis in boys / nephroblastoma, gonadoblastoma

Примечание. *CALM – café au lait macules (пятна цвета кофе с молоком); МДС – миелодиспластический синдром; ОЛЛ – острый лимфолейкоз; ОМЛ – острый миелолейкоз.*
Note*. CALM – café au lait macules (spots the color coffee with milk) MDS – myelodysplastic syndrome; ALL – acute lymphocytic leukemia; AML – acute myeloid leukemia.*

инактивация обоих аллелей ОСГ, поэтому двухударная гипотеза Кнудсона для объяснения механизма канцерогенеза здесь неприемлема, поскольку во всех клетках организма (не только в опухолевых) изначально инактивирован онкосупрессор. В то же время даже для наследственных опухолевых синдромов с аутосомно-доминантным типом наследования ЗНО развиваются при наличии не менее 5–9 мутаций в разных ОСГ и/или онкогенах [11].

Наиболее вероятной причиной, инициирующей канцерогенез при наследственных опухолевых синдромах, является активация РЭ, которые находятся под негативным регуляторным контролем онкосупрессоров [12–16]. Например, белковые продукты генов *TP53* [12] и *VHL* [13] подавляют экспрессию ERV. Кроме того, p53, а также семейство белков ретинобластомы (RB), BRCA1 ингибируют транскрипцию LINE [14] (рис. 1). Соответственно, при мутациях в ОСГ снижается сайленсинг РЭ, активация которых вызывает прогрессирующую геномную нестабильность. Это связано с транспозициями в ОСГ, содержащими горячие точки инсерционного мутагенеза [3–7]. Данная особенность подтверждена в отношении генов *TSC2* [3], *VHL* [4], *MSH2* [5], *NF1* [6] и *PTEN* [7], герминативные мутации в которых вызывают известные наследственные опухолевые синдромы. Развивающиеся при этом опухоли характеризуются инактивацией 2-го аллеля ОСГ [3–7]. В связи с этим допустимо пересмотреть двухударную гипотезу Кнудсона, поскольку соматическая инактивация 2-го аллеля ОСГ может быть не причиной развития опухоли, а следствием геномной нестабильности, обусловленной патологической активацией РЭ.

Кроме того, повышенная экспрессия РЭ вызывает активацию протоонкогенов, которые содержат РЭ в составе своих промоторов [17–19] и интронов [20–23]. При этом инактивации 2-го аллеля ОСГ, вызвавшего наследственный опухолевый синдром, могут быть обусловлены не только инсерциями, но и генными мутациями в горячих точках мутагенеза в связи с развившейся геномной нестабильностью. Данное явление описано при синдроме DICER1, непосредственно взаимосвязанном с дисрегуляцией РЭ, поскольку DICER необходим для процессинга микроРНК, участвующих в эпигенетическом контроле экспрессии РЭ. МикроРНК – одноцепочечные молекулы РНК длиной 20–22 нуклеотида, которые регулируют экспрессию более половины белок-кодирующих генов на посттранскрипционном уровне, ингибируя мРНК. В связи с комплементарностью нуклеотидов микроРНК и продуктов транскрипции генов микроРНК служат в качестве гидов

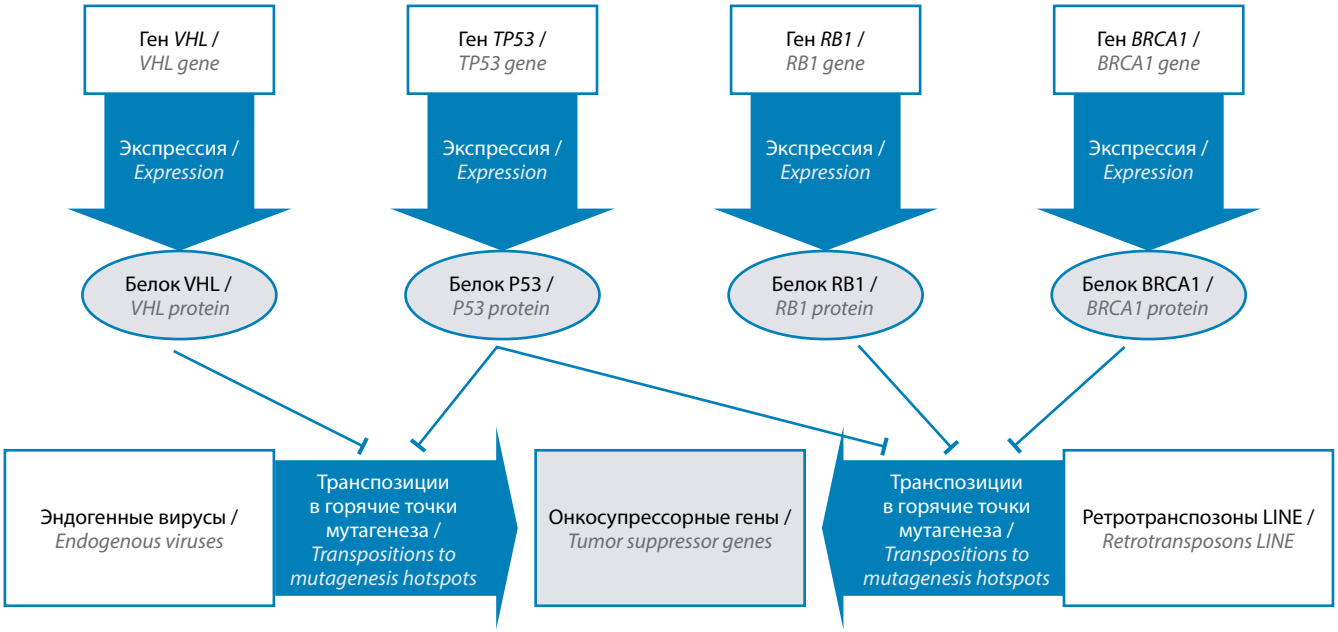


Рис. 1. *Схема ингибирующего влияния онкосупрессорных генов на мутагенную активность ретроэлементов*
Fig. 1. *Diagram of the inhibitory effect of tumor suppressor genes on the mutagenic activity of retroelements*

для РНК-интерференции РНК-индуцируемого комплекса выключения гена (RISC). Последний, в свою очередь, вызывает деградацию молекул матричной РНК или подавление трансляции. При этом мишенями для одной микроРНК могут быть множество транскриптов, поскольку для сайленсинга достаточно неполной комплементарности 3'-нетранслируемой области мРНК [24]. При синдроме Линча, вызванном мутациями в генах *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* и *PMS1*, также определена эпигенетическая активация ретротранспозонов LINE1 в образцах опухолей вследствие их гипометилирования [25].

РОЛЬ РЕТРОЭЛЕМЕНТОВ В РАЗВИТИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Активация РЭ является характерной особенностью более 50 % различных типов ЗНО, в которых транспозиции вызывают амплификацию протоонкогенов и инактивацию онкосупрессоров [26]. Сходные процессы наблюдаются также при хромотрипсисе – сложных структурных перестройках хромосом, которые считаются драйверными событиями в канцерогенезе. Хромотрипсис выявляется более чем в 50 % всех типов ЗНО [27]. Доказано, что активированные non-LTR РЭ приводят к развитию хромотрипсиса. Потенциальный сайт расщепления эндонуклеазы LINE1 вызывает двухцепочечные разрывы, способствуя в последующем возникновению репарации посредством гомологичной рекомбинации внутри данных областей. При этом обнаруживаются инсерции 5'-усеченных SVA в одном из соединений точек разрыва в область, напоминающую консенсусный сайт расщепления LINE1 эндонуклеазы (5'-TTTT/AA-3'). Была определена микрогомология 5'-конца вставки SVA с последовательностью на стыке точки разрыва дистального фрагмента [28].

Поскольку обратная транскрипция SVA при помощи продуктов экспрессии ORF2p LINE1-элементов может функционировать как «молекулярный пластырь» двухцепочечных разрывов, а опосредованные LINE1 инсерции вызывают крупные геномные делеции, данные РЭ являются источниками хромотрипсиса [29]. Имеется механистическая взаимосвязь ретротранспозиций LINE1 и хромотрипсиса. Это обусловлено тем, что индуцированных LINE1-элементами двухцепочечных разрывов ДНК больше, чем успешных инсерций [30]. Кроме того, активированные РЭ способствуют крупным хромосомным перестройкам, как это было показано для LINE1 [31] и SVA [32]. То есть эндонуклеазная активность РЭ может служить инициатором хромосомных перестроек при хромотрипсисе [30]. В постмитотических соматических клетках LINE1 способствуют образованию CNV (copy number variation) за счет негомологичных соединений концов [33].

Дерегуляция РЭ при ЗНО отмечена в ряде исследований. В наиболее масштабных из них активация транспозонов определена почти в половине образцов с различием в зависимости от типа опухоли. Например, при исследовании 2954 геномов тканей ЗНО перемещения РЭ выявлены в 35 % образцов. Наиболее часто наблюдались интеграции LINE1 при раке пищевода, головы и шеи и колоректальном раке. При этом было отмечено, что ретротранспозиции являются драйверами канцерогенеза [26]. Помимо LINE1 в развитие ЗНО вовлечены также LTR-РЭ. Так, для рака молочной железы и лимфом характерны возрастающие уровни транскриптов эндогенных ретровирусов человека

(HERV – human endogenous retrovirus). Для метастазирующих меланом выявлена ассоциация с HERV-подобными вирусами. При раке яичника, ободочной кишки и яичек экспрессируются высокие уровни оболочечных генов HERV [34]. Большую роль в развитии ЗНО играют транспозиции HERV-K, HERV-H, HERV-W/syncytin-1, HERV-R, активация которых связана с гипометилированием ДНК, характерным для опухолевой прогрессии [35].

РОЛЬ ОНКОСУПРЕССОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ РЕТРОЭЛЕМЕНТОВ

Наиболее часто мутирующим геном в различных типах ЗНО является *TP53*. Герминативные мутации в нем вызывают синдром Ли–Фраумени. Белок p53 служит регулятором многих HERV. Обнаружено 1509 LTR, которые содержат почти идеальные сайты связывания с этим белком. Особенно обогащены такими областями специфичные для приматов LTR10 и MER61. В геноме человека более 1/3 всех идентифицированных сайтов связывания с p53 находятся в копиях HERV [12]. Белок p53 вызывает также сайленсинг LINE1 за счет образования репрессивных гистоновых меток. Поэтому инактивация p53 вызывает повышенную экспрессию LINE1 [16]. В промоторных областях генов ретроэлементов LINE1 белок p53 непосредственно связывается с короткой 15-нуклеотидной последовательностью, которая появилась в эволюции около 20 млн лет назад [36]. Белковый продукт гена *VHL* вызывает сайленсинг HERV-E, транскрипция которого характерна для светлоклеточного рака почки с инактивированным ОСГ *VHL* [13]. Сходным образом в клетках ЗНО с мутациями в другом ОСГ – *ATM* – определяется активация non-LTR РЭ LINE1, поскольку белок ATM ингибирует экспрессию данного РЭ. У больных атаксией-телеангиэктазией (с герминативными мутациями в *ATM*) в посмертной ткани головного мозга определяется повышенное количество копий LINE1 по сравнению с нормой [37].

Белковый продукт гена *BRCA1* напрямую влияет на частоту ретротранспозиций LINE1, контролируя трансляцию его открытой рамки считывания (ORF – open reading frame) посредством связывания с матричной РНК данного РЭ. Поэтому дефицит BRCA1 приводит к нарушению репарации и патологической активации LINE1 [15]. Белок BRCA1 связывается также с LTR вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), участвуя в его активации во время инфекции [38]. Онкосупрессор Smad-4 подавляет транскрипцию промотора ВИЧ за счет воздействия на Smad-3 и C/EBPbeta (CCAAT box/enhancer binding protein beta), которые являются активаторами LTR [39]. Белки Smad являются также активаторами экспрессии LINE1 в тканях рака молочной железы у человека [40]. Вирус иммунодефицита человека и другие экзогенные вирусы эволюционно связаны с LTR-РЭ [41], поэтому BRCA1 могут также влиять на HERV подобно другим онкосупрессорам [13].

ВЛИЯНИЕ РЕТРОЭЛЕМЕНТОВ НА ГЕНЫ ОНКОСУПРЕССОРОВ

Инсерции РЭ в области ОСГ являются частыми событиями не только при наследственных опухолевых синдромах, но и при спорадических ЗНО. Это связано с наличием горячих точек мутагенеза для РЭ как в фланкирующих ОСГ локусах, так и в самих генах. Например, частым событием при колоректальном раке являются инсерции AluY5a в 6-й экзон гена *MLH1* [42]. Известно более 100 различных инсерций РЭ, вызывающих заболевания человека, в том числе перемещения в ОСГ, такие как *APC*, *BRCA1*, *BRCA2*, *MSH2* и *NF1* [1]. Так, при исследовании 211 больных с наследственными опухолевыми синдромами было обнаружено 37 уникальных герминативных инсерций РЭ в области 10 ОСГ. В 45,9 % случаев транспозиции происходили в ген *BRCA2*, в остальных – в гены *ATM*, *BRCA1*, *PALB2*, *MSH2*, *MLH1*, *BARD1*, *APC*, *PMS2* [2].

В 3-м экзоне гена *BRCA2* выявлена горячая точка инсерционного мутагенеза для Alu при наследственном раке молочной железы [43, 44]. Ген *MEN1* фланкирован Alu-элементами, рекомбинации которых могут вызывать делецию всего гена. Описаны случаи, когда Alu вызывали герминативную делецию гена *MEN1* при синдроме множественной эндокринной неоплазии [45] и гена *PTCH1* – при синдроме Горлина–Гольца [46]. Около 30 % случаев синдрома Гиппеля–Линдау обусловлены крупными делециями, до 90 % точек разрывов которых локализованы внутри Alu-элементов. Их рекомбинации служат основным механизмом мутаций в гене *VHL*. Наиболее активным в данном отношении является эволюционно молодой элемент AluYa5, расположенный во 2-м интроне гена *VHL* [4]. При туберозном склерозе герминативные делеции ОСГ *TSC2* также связаны с гомологичной рекомбинацией, обусловленной Alu-элементами, расположенными в нескольких интронах (2, 5, 9, 15-м) гена [3]. Около 20 % случаев синдрома Линча связаны с гетерогенными делециями, обусловленными рекомбинациями между Alu в гене *MSH2* [5]. При синдроме Пейтца–Егерса мутации в гене *STK11*, обусловленные вариациями числа копий (CNV), также связаны с наличием специфических Alu молодого подсемейства AluY в горячих точках мутагенеза в области делеций CNV [47].

Семейная ретинобластома может быть обусловлена характерной инсерцией LINE1 в 14-й интрон гена *RB1*. Образуется неканонический акцепторный сайт сплайсинга, и синтезируется дефектный белок [48]. Горячие точки инсерционного мутагенеза обнаружены в 5-м экзоне ОСГ *PTEN* для инсерций Alu при синдроме Коудена [7], а также для транспозиций LINE1 в гене *NF1* при нейрофиброматозе 1-го типа [6]. На рис. 2 представлена схема мутагенного влияния активированных РЭ на ОСГ. Инактивация ОСГ под влиянием

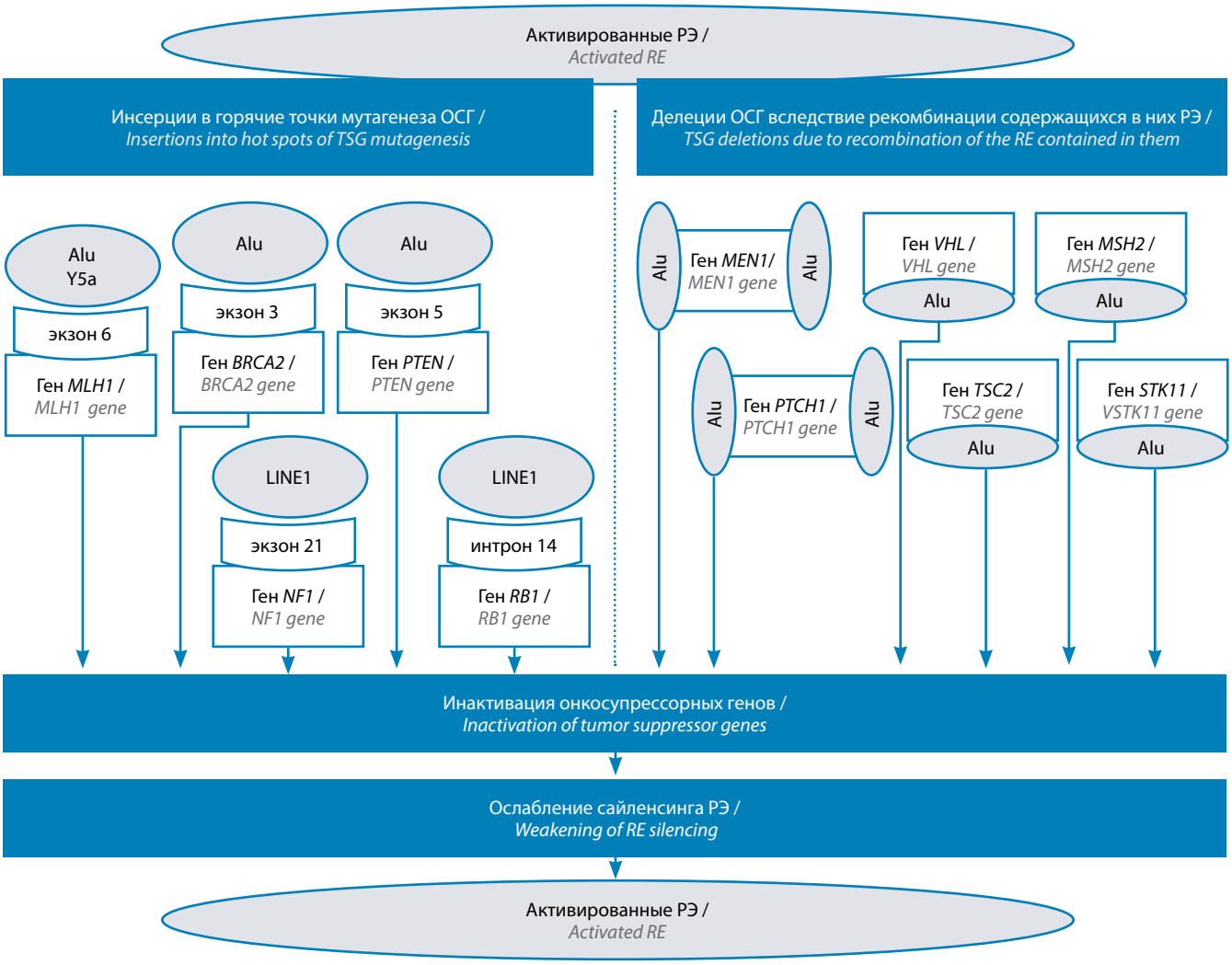


Рис. 2. *Влияние ретроэлементов на онкосупрессоры в канцерогенезе. РЭ – ретроэлементы; ОСГ – онкосупрессорные гены*
Fig. 2. *The effect of retroelements on oncosuppressors in carcinogenesis. RE – retroelements; TSG – tumor suppressor genes*

РЭ вызывает ослабление сайленсинга новых РЭ (поскольку они находятся под негативным регуляторным контролем онкосупрессоров). Соответственно, образуется порочный круг, когда вновь активированные РЭ также перемещаются в другие ОСГ или вызывают их делеции вследствие рекомбинации. Наличием горячих точек мутагенеза можно объяснить инактивацию ОСГ в канцерогенезе при развитии наследственных опухолевых синдромов в связи с активацией РЭ. Кроме того, развившаяся геномная нестабильность может способствовать появлению генных мутаций, в том числе во 2-х аллелях генов, вызывавших наследственные опухолевые синдромы. Характерным примером является синдром DICER, при котором наблюдается повышенная частота генных мутаций вследствие возникшей геномной нестабильности [24].

Причиной частых инсерций РЭ в области ОСГ может служить эволюционная взаимосвязь этих генов и транспозонов, последовательности которых сохранились в связи с их адаптивной регуляторной ролью. Например, LINE1 участвуют в эпигенетическом контроле дифференцировки клеток почек, регулируя экспрессию гена *WT1*. Экспрессия активных LINE1 в пролиферирующих клетках вызывает снижение уровней белка WT1, который является транскрипционным регулятором многих генов, таких как *Bmp7*, *Pax2*, *Egfr* и *Sall1*, необходимых для органогенеза почек [49]. Ретроэлементы также контролируют экспрессию ОСГ на эпигенетическом уровне. Например, из транскрипта РЭ VL30–1 процессируется некодирующая РНК, которая взаимодействует с РНК-связывающими доменами онкосупрессорного белка PSF [50]. Ярким примером регуляторной роли РЭ в отношении белков, участвующих в канцерогенезе, является влияние транспозонов на онкогены.

ВЗАИМОСВЯЗЬ РЕТРОЭЛЕМЕНТОВ С ОНКОГЕНАМИ

Последовательности РЭ могут быть использованы для активации экспрессии онкогенов в 12–87 % различных типов ЗНО. Данное явление было названо онкоэкзаптацией. В 3864 из 7769 образцов злокачественных

опухолей было обнаружено 129 событий активации латентных промоторов РЭ с вовлечением 106 онкогенов [51]. Более того, сами белки, кодируемые эволюционно молодыми HERV-K (HML-2), являются онкогенными. К ним относится Np9. Данный белок стимулирует пролиферацию стволовых клеток при лейкозе за счет активации β-катенина, ERK, Akt и Notch [52]. Рэтроэлементы необходимы также для образования рэтрогенов, обладающих онкогенными свойствами. Например, ген *NANOGP8* был сформирован в эволюции около 2 млн лет назад путем ретротранспозиции *NANOG*, который экспрессируется в эмбриональных клетках при нормальном развитии человека. Экспрессия *NANOGP8* характерна для злокачественных клеток, так как усиливает пролиферацию клеток [53].

При расположении РЭ выше начала транскрипции генов они могут быть использованы как альтернативные промоторы без нарушения открытой рамки считывания. Например, для клеток лимфомы Ходжкина характерна активация LTR-РЭ MaLR подсемейства THE1, которые служат драйверами экспрессии протоонкогена *CSF1R* (colony-stimulating factor 1 receptor), участвующего в канцерогенезе [17]. При метастазах колоректального рака гипометилирование LINE1 ведет к активации протоонкогенов *MET*, *RAB3IP* и *CHRM3* [18]. Активация LTR-РЭ LOR1a вызывает экспрессию *IRF5* (interferon regulatory factor 5) при лимфоме Ходжкина [19].

При расположении в интронах протоонкогенов активация РЭ вызывает образование химерных транскриптов, продукты трансляции которых могут обладать функциями онкогенов и способствовать канцерогенезу. При этом новый белок инициирует и усиливает опухолевый рост. У человека в составе 988 генов выявлены LINE1, контролирующие их транскрипцию с помощью обычных и антисмысловых промоторов. Гипометилирование таких LINE1 обнаруживается во всех изученных типах ЗНО [23]. При диффузной В-крупноклеточной лимфоме определяется экспрессия химерного транскрипта LTR2-FABP7 с использованием промотора LTR РЭ семейства LTR2 для протоонкогена *FABP7* (fatty acid-binding protein). При этом пропускается нормальный стартовый кодон ATG, так как матричная РНК под действием LTR2 сплайсируется непосредственно во 2-й экзон. Нормальный белок FABP7 регулирует дифференцировку клеток в головном мозге. Химерный вариант LTR2-FABP7 вызывает усиленную пролиферацию [20]. Протоонкоген *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) содержит в 19-м интроне РЭ LTR, а в 18-м интроне – LINE, которые участвуют в регуляции транскрипции *ALK*. При меланоме активация *ALK* обусловлена гипометилированием данного LTR, который служит в качестве промотора гена с образованием онкогенного транскрипта LTR-ALK [21]. Активация данного гена наблюдается также при ALK-позитивных типах анапластической крупноклеточной лимфомы. Для ALK-негативных типов лимфомы характерна эктопическая экспрессия протоонкогена *ERBB4*, вызванная активацией находящегося в его интроне LTR-РЭ [22]. Инициация колоректального рака может быть вызвана образованием химерного транскрипта протоонкогена *MET* (LINE1-MET) [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При наследственных опухолевых синдромах герминативная инактивация ОСГ вызывает повышенную экспрессию РЭ, которые имеют в своем составе чувствительные к онкосупрессорам регуляторные последовательности. Было доказано, что белковые продукты генов *ATM*, *BRCA1*, *Smad*, *TP53* и *VHL* вызывают сайленсинг РЭ. В связи с этим при наследственных опухолевых синдромах развивается геномная нестабильность с транспозициями в гены онкосупрессоров, которые содержат горячие точки инсерционного мутагенеза, что характерно для генов *BRCA2*, *MLH1*, *NF1*, *PTEN* и *RB1*. Инактивация ОСГ происходит также вследствие рекомбинации РЭ, расположенных в составе их интронов или фланкирующих областей, что было доказано для генов *MEN1*, *PTCH1*, *VHL*, *TSC2*, *MSH2* и *STK11*.

Ретроэлементы также могут оказывать регуляторное влияние на ОСГ, например, LINE1 контролируют экспрессию гена *WT1*, а VL30–1 – гена *PSF*. Повышенная экспрессия РЭ при наследственных опухолевых синдромах может вызывать активацию онкогенов 4 путями. Во-первых, расположенные в интронах протоонкогенов РЭ служат причиной экспрессии химерных транскриптов, обладающих повышенной активностью. Примерами являются LTR2-FABP7, LTR-ALK, LINE1-MET. Во-вторых, расположенные в промоторах РЭ вызывают усиленную экспрессию протоонкогенов, например, MaLR – для *CSF1R*, LINE1 – для *MET*, *RAB3IP* и *CHRM3*. В-третьих, РЭ используются для образования ретрогенов, обладающих онкогенной активностью, как было показано для гена *NANOGP8*. В- четвертых, белковые продукты РЭ могут быть онкогенными, например Np9 эндогенных ретровирусов HERV-K. Поскольку инактивация 2-го аллеля ОСГ при наследственных опухолевых синдромах является не причиной, а следствием геномной нестабильности, развившейся в результате активации РЭ, можно пересмотреть двухударную гипотезу Кнудсона. Инициирующим событием служит вызванная ослаблением контроля онкосупрессорным белком повышенная экспрессия РЭ, которые активируют онкогены и инактивируют ОСГ, чувствительные к инсерциям.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hancks D.C., Kazazian H.H. Roles for retrotransposon insertions in human disease. Mob DNA 2016;7:9. DOI: 10.1186/s13100-016-0065-9.
2. Qian Y., Mancini-DiNardo D., Judkins T. et al. Identification of pathogenic retrotransposon insertions in cancer predisposition genes. Cancer Genet 2017;216–217:159–69. DOI: 10.1016/j.cancergen.2017.08.002.
3. Dabora S.L., Nieto A.A., Franz D. et al. Characterisation of six large deletions in TSC2 identified using long range PCR suggests diverse mechanisms including Alu mediated recombination. J Med Genet 2000;37(11):877–83. DOI: 10.1136/jmg.37.11.877.
4. Franke G., Bausch B., Hoffmann M.M. et al. Alu-Alu recombination underlies the vast majority of large VHL germline deletions: Molecular characterization and genotype-phenotype correlation in VHL patients. Hum Mutat 2009;30(5):776–86. DOI: 10.1002/humu.20948.
5. Hitchins M.P., Burn J. Alu in Lynch syndrome: a danger SINE. Cancer Prev Res (Phila) 2011;4(10):1527–30.
6. Wimmer K., Callens T., Wernstedt A. et al. The *NF1* gene contains hotspots for L1 endonuclease-dependent de novo insertion. PLoS Genet 2011;7(11):e1002371. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002371.
7. Crivelli L., Bubien V., Jones N. et al. Insertion of Alu elements at a PTEN hotspot in Cowden syndrome. Eur J Hum Genet 2017;25(9):1087–91. DOI: 10.38/ejhg.2017.81.
8. De Koning A.P., Gu W., Castoe T.A. et al. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. PLOS Genetics 2011;7(12):e1002384. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002384.
9. Goerner-Potvin P., Bourque G. Computational tools to unmask transposable elements. Nat Rev Genet 2018;19:688–704. DOI: 10.1038/s41576-018-0050-x.
10. Kuhlen M., Borkhardt A. Cancer susceptibility syndromes in children in the area of broad clinical use of massive parallel sequencing. Eur J Pediatr 2015;174(8):987–97.
11. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Молекулярная генетика в клинической онкологии. Сибирский онкологический журнал 2004;2–3:40–7. [Imyanitov E.N., Hanson K.P. Molecular genetics in clinical oncology. Sibirskij onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology 2004;2–3: 40–7. (In Russ.)].
12. Wang T., Zeng J., Lowe C.B. et al. Species-specific endogenous retroviruses shape the transcriptional network of the human tumor suppressor protein p53. Proc Natl Acad Sci 2007;104(47):18613–8. DOI: 10.1073/pnas.0703637104.
13. Cherkasova E., Malinzak E., Rao S. et al. Inactivation of the von Hippel–Lindau tumor suppressor leads to selective expression of a human endogenous retrovirus in kidney cancer. Oncogene 2011;30(47):4697–706. DOI: 10.1038/onc.2011.179.
14. Montoya-Durango D.E., Ramos K.S. Retinoblastoma famiy of proteins and chromatin epigenetics: a repetitive story in a few LINEs. Biomol Concepts 2011;2(4):233–45. DOI: 10.1515/bmc.2011.027.
15. Mita P., Sun X., Fenyo D. et al. BRCA1 and S phase DNA repair pathways restrict LINE-1 retroptransposition in human cells. Nat Struct Mol Biol 2020;27(2):179–91. DOI: 10.1038/s41594-020-0374-z.
16. Tiwari B., Jones A.E., Caillet C.J. et al. P53 directly repress human LINE1 transposons. Genes Dev 2020;34(21–22):1439–51. DOI: 10.1101/gad.343186.120.
17. Lamprecht B., Walter K., Kreher S. et al. Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma. Nat Med. 2010;16(5):571–9. DOI: 10.1038/nm.2129.
18. Hur K., Cejas P., Feliu J. et al. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis. Gut 2014;63(4):635–46. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-304219.
19. Babaian A., Romanish M.T., Gagnier L. et al. Onco-exaptation of an endogenous retroviral LTR drives IRF5 expression in Hodgkin lymphoma. Oncogene 2016;35(19):2542–6. DOI: 10.1038/onc.2015.308.
20. Lock F.E., Rebollo R., Miceli-Royer K. et al. Distinct isoform of FABP7 revealed by screening for retroelement-activated genes in diffuse large B-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci 2014;111(34):E3534–43. DOI:10.1073/pnas.1405507111.
21. Wiesner T., Lee W., Obenauf A.C. et al. Alternative transcription initiation leads to expression of a novel ALK isoform in cancer. Nature 2015;526(7573):453–7. DOI: 10.1038/nature15258.
22. Scarfò I., Pellegrino E., Mereu E. et al. Identification of a new subclass of ALK-negative ALCL expressing aberrant levels of ERBB4 transcripts. Blood 2016;127(2):221–32. DOI: 10.1182/blood-2014-12-614503.
23. Cervantes-Ayalc A., Esparza-Garrido R.R., Velazquez-Floes M.A. Long Interspersed Nuclear Elements 1 (LINE1): The chimeric transcript L1-MET and its involvement in cancer. Cancer Genet 2020;241:1–11. DOI: 10.1016/j.cancergen.2019.11.004.
24. Thunders M., Delahunt B. Gene of the month: DICER1: ruler and controller. J Clin Pathol 2021;74(2):69–72. DOI: 10.1136/jclinpath-2020-207203.
25. Maki-Nevala S., Valo S., Ristimaki A. et al. DNA methylation changes and somatic mutations as tumorigenic events in Lynch syndrome-associated adenomas retaining mismatch repair protein expression. EBioMedicine 2019;39:280–91. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.12.018.
26. Rodriguez-Martin B., Alvarez E.G., Baez-Ortega A. et al. Pan-cancer analysis of whole genomes identifies driver rearrangements promoted by LINE-1 retrotransposition. Nat Genet 2020;52(3):306–19. DOI: 10.1038/s41588-019-0562-0.
27. Cortes-Ciriano I., Lee J.J., Xi R. et al. Comprehensive analysis of chromothripsis in 2658 human cancer using whole-genome sequencing. Nat Genet 2020;52(3):331–41. DOI: 10.1038/s41588-019-0576-7.
28. Nazaryan-Petersen L., Bertelsen B., Bak M. et al. Germline chromothripsis driven by L1-mediated retrotransposition and Alu/Alu homologous recombination. Hum Mutat 2016;37(4):385–95. DOI: 10.1002/humu.22953.
29. Erwin J.A., Paquola A.C.M., Singer T. et al. L1-Associated Genomic Regions are Deleted in Somatic Cells of the Healthy Human Brain. Nat Neurosci 2016;19(12):1583–91. DOI: 10.1038/nn.4388.
30. Chen J.M., Cooper D.N. A mechanistic link between L1 retrotransposition and chromothripsis. Hum Mutat 2016;37(4):329. DOI: 10.1002/humu.22870.
31. Symer D.E., Connelly C., Szak S.T. et al. Human L1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo. Cell 2002;110(3):327–38. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00839-5.
32. Vogt J., Bengesser K., Claes K.B.M. et al. SVA retrotransposon insertion-associated deletion represents a novel mutational mechanism underlying large genomic copy number changes with non-recurrent breakpoints. Genome Biol 2014;15:R80.
33. Poot M. Genes, proteins, and biological pathways preventing chromothripsis. Methods Mol Biol 2018;1769:231–51. DOI: 10.1007/978-1-4939-7780-2_15.
34. Anwar S.L., Wulaningsih W., Lehmann U. Transposable elements in human cancer: causes and consequences of deregulation. Int J Mol Sci 2017;18(5):pii: E974. DOI: 10.3390/ijms18050974.
35. Bermejo A.V., Ragonnaud E., Daradoumis J. et al. Cancer associated endogenous retroviruses: ideal immune

target for adenovirus-based immunotherapy. Int J Mol Sci 2020;21(14):4843. DOI: 10.3390/ijms21144843.
36. Harris C.R., Dewan A., Zupnick A. et al. P53 responsive elements in human retrotransposons. Oncogene 2009;28(44):3857–65. DOI: 10.1038/onc.2009.246.
37. Coufal N.G., Garcia-Perez J.L., Peng G.E. et al. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) modulates long interspersed element-1 (L1) retrotransposition in human neural stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2011;108(51):20382–7. DOI: 10.1073/pnas.1100273108.
38. Guendel I., Meltzer B.W., Baer A. et al. BRCA1 functions as a novel transcriptional cofactor in HIV-1 infection. Virol J 2015;12:40. DOI: 10.1186/s12985-015-0266-8.
39. Coyle-Rink J., Sweet T., Abraham S. et al. Interaction between TGFbeta signaling proteins and C/EBP controls basal and Tat-mediated transcription of HIV-1 LTR in astrocytes. Virology 2002;299(2):240–7. DOI: 10.1006/viro.2002.1439.
40. Miret N., Zappia C.D., Altamirano G. et al. AhR ligands reactivate LINE-1 retrotransposon in triple-negative breast cancer cells MDA-MB-231 and non-tumorigenic mammary epithelial cells NMuMG. Biochem Pharmacol 2020;175:113904. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.113904.
41. Sotero-Caio C.G., Platt R.N., Suh A., Ray D.A. Evolution and diversity of transposable elements in vertebrate genomes. Genome Biol Evol 2017;9(1):161–77. DOI: 10.1093/gbe/evw264.
42. Solassol J., Larrieux M., Leclerc J. et al. Alu element insertion in the MLH1 exon 6 coding sequence as a mutation predisposing to Lynch syndrome. Hum Mutat 2019;40(6):716–20. DOI: 10.1002/humu.23725.
43. Machado P.M., Brandao R.D., Cavaco B.M. et al. Screening for a BRCA2 rearrangement in high-risk breast/ovarian cancer families: evidence for a founder effect and analysis of the associated phenotypes. J Clin Oncol 2007;25(15):2027–34. DOI: 10.1200/JCO.2006.06.9443.
44. Peixoto A., Santos C., Pinto P. The role of targeted BRCA1/BRCA2 mutation analysis in hereditary breast/ovarian cancer families of Portuguese ancestry. Clin Genet 2015;88(1):41–8. DOI: 10.1111/cge.12441.
45. Yoshiji S., Iwasaki Y., Iwasaki K. et al. Alu-mediated MEN1 gene deletion and loss of heterozygosity in patient with multiple endocrine neoplasia type1 2020;4(8):bvaa051. DOI: 10.1210/jendso/bvaa051.
46. Fujii K., Ishikawa S., Uchikawa H. et al. High-density oligonucleotide array with subkilobase resolution reveals breakpoint information of submicroscopic deletions in nevoid basal cell carcinoma syndrome. Hum Genet 2007;122(5):459–66. DOI: 10.1007/s00439-007-0419-y.
47. Borun P., De Rosa M., Nedoszytko B. et al. Specific Alu elements involved in a significant percentage of copy number variations of the STK11 gene in patients with Peutz–Jeghers syndrome. Fam Cancer 2015;14(3):455–61. DOI: 10.1007/s10689-015-9800-5.
48. Rodriguez-Martin C., Cidre F., Fernandez-Teijeiro A. et al. Familial retinoblastoma due to intronic LINE-1 insertion causes aberrant and noncanonical mRNA splicing of the RB1 gene. J Hum Genet 2016;61(5):463–6. DOI: 10.1038/jhg.2015.173.
49. Ramos K.S., Montoya-Durango D.E., Teneng I. et al. Epigenetic control of embryonic renal cell differentiation by L1 retrotransposon. Birth Defects Res. A Clin Mol Teratol 2011;91(8):693–702. DOI: 10.1002/bdra.20786.
50. Garen A. From a retrovirus infection of mice to a long noncoding RNA that induces proto-oncogene transcription and oncogenesis via an epigenetic transcription switch. Signal Transduct. Target Ther 2016;1:16007. DOI: 10.1038/sigtrans.2016.7.
51. Jang H.S., Shah N.M., Du A.Y. et al. Transposable elements drive widespread expression of oncogenes in human cancer. Nat Genet 2019;51(4):611–7. DOI: 10.1038/s41588-019-0373-3.
52. Chen T., Meng Z., Gan Y. et al. The viral oncogene Np9 acts as a critical molecular switch for co-activating beta-catenin, ERK, Akt and Notch1 and promoting the growth of human leukemia stem/progenitor cells. Leukemia 2013;27(7):1469–78.
53. Fairbanks D.J., Fairbanks A.D., Ogden T.H. et al. NANOGP8: evolution of a human-specific retro-oncogene. G3 (Bethesda) 2012;2(11):1447–57. DOI: 10.1534/g3.112.004366.

Вклад авторов
Р.Н. Мустафин: разработка дизайна исследования, анализ научной литературы по теме статьи, обработка полученных данных, написание текста статьи, редактирование статьи;
Э.К. Хуснутдинова: редактирование текста статьи.
Autrors' contributions
R.N. Mustafin: developing the research design, analysis of scientific literature on the topic, processing the results, article writing, article editing;
E.K. Khusnutdinova: article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors
Р.Н. Мустафин / R.N. Mustafin: https://orcid.org/0000-0002-4091-382X
Э.К. Хуснутдинова / E.K. Khusnutdinova: https://orcid.org/0000-0003-2987-3334

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 04.05.2021. **Принята к публикации:** 15.11.2021.
Article submitted: 04.05.2021. **Accepted for publication:** 15.11.2021.

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-53-60

CC BY

Жидкостная биопсия колоректального рака: новый подход к оценке аберрантного метилирования гена *SEPT9*

И.В. Ботезату, В.Н. Кондратова, А.М. Строганова, С.Л. Дранко, А.В. Лихтенштейн

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

Контакты: Анатолий Владимирович Лихтенштейн *alicht@mail.ru*

Введение. Гиперметилированные CpG-островки в промоторах генов-супрессоров (в частности, *SEPT9*) – клинически значимые опухолевые маркеры, широко используемые в жидкостной биопсии. Для количественной оценки гиперметилированных ДНК обычно используют полимеразную цепную реакцию в реальном времени с метилспецифическими праймерами. Этот метод требует нормализации данных, зависит от степени вариабельности числа копий генов-калибраторов и весьма трудоемок.

Цель исследования – разработка альтернативного метода оценки аберрантного метилирования посредством количественного анализа плавления ДНК (qDMA, quantitative DNA melting analysis).

Материалы и методы. Образцы ДНК, выделенные из плазмы крови здоровых доноров и больных колоректальным раком, анализировали методом qDMA, включающим: 1) асимметричную полимеразную цепную реакцию с метилнезависимыми индивидуально подобранными праймерами к гену *SEPT9*; 2) использование зонда TaqMan, гибридизующегося с 2 CpG-динуклеотидами ампликона; 3) постамплификационное плавление гибридов зонд/ампликон; 4) количественный анализ плавления ДНК.

Результаты. Метод испытан на гене *SEPT9* (применялся в жидкостной биопсии колоректального рака). Различия в степени метилирования *SEPT9* между группами здоровых ($n = 41$) и больных ($n = 39$) людей статистически значимы ($p < 0{,}0001$). Определена диагностическая эффективность qDMA: AUC ROC (area under curve – площадь под ROC-кривой) – 0,812 (после перекрестной валидизации – 0,801), чувствительность – 90 %, специфичность – 66 %.

Заключение. Предлагаемый метод количественной оценки аберрантно метилированных ДНК прост, реализуется в закрытом формате, не требует нормализации и построения стандартных кривых. Предполагается возможность его оптимизации посредством применения мультиплексного варианта с одновременным анализом нескольких маркеров.

Ключевые слова: жидкостная биопсия, колоректальный рак, ген *SEPT9*, анализ плавления ДНК

Для цитирования: Ботезату И.В., Кондратова В.Н., Строганова А.М. и др. Жидкостная биопсия колоректального рака: новый подход к оценке аберрантного метилирования гена *SEPT9*. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(4):53–60. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-53-60.

Liquid biopsy of colorectal cancer: a new approach to evaluation of aberrant methylation of the *SEPT9* gene

I.V. Botezatu, V.N. Kondratova, A.M. Stroganova, S.L. Dranko, A.V. Lichtenstein

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

Contacts: Anatoly Vladimirovitch Lichtenstein *alicht@mail.ru*

Introduction. Hypermethylated CpG islands in the promoters of suppressor genes (in particular, SEPT9) are clinically significant markers of malignant growth that are widely used in liquid biopsy. Real-time polymerase chain reaction with methylation-specific primers is commonly used to quantify hypermethylated DNA. The method requires data normalization, depends on copy number variability of the calibrator genes, and is rather laborious.

The study subject is to develop an alternative qDMA method (quantitative DNA Melting Analysis).

Materials and methods. DNA samples isolated from blood plasma of healthy donors and colorectal cancer patients were analyzed by the method including: 1) asymmetric polymerase chain reaction with methylation-independent

individually selected primers for the SEPT9 gene; 2) using the TaqMan probe hybridizing to two CpG dinucleotides in the amplicon; 3) post-amplification melting of probe/amplicon hybrids; 4) quantitative analysis of DNA melting. **Results.** The method was tested on the SEPT9 gene in liquid biopsy of colorectal cancer. Differences in SEPT9 methylation in healthy donors (n = 41) and cancer patients (n = 39) were statistically significant (p <0.0001). Analytical sensitivity and diagnostic efficiency of qDMA were determined: AUC (area under curve) ROC– 0.812 (according to the result of 10-fold cross-validation AUC ROC – 0.801), sensitivity – 90%, specificity – 66%.
Conclusion. The proposed method for the quantitative assessment of aberrantly methylated DNA is simple, implemented in the closed-tube format, does not require normalization and usage of standard curves. The possibility of optimization through the use of a multiplex variant with simultaneous analysis of several markers is assumed.

Key words: liquid biopsy, colorectal cancer, SEPT9 gene, DNA melting analysis

For citation: Botezatu I.V., Kondratova V.N., Stroganova A.M. et al. Liquid biopsy of colorectal cancer: a new approach to evaluation of aberrant methylation of the SEPT9 gene. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2021;8(4):53–60. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-53-60.

ВВЕДЕНИЕ

Жидкостная биопсия основана на анализе циркулирующих в плазме крови нуклеиновых кислот (ДНК, мРНК (матричной РНК), микроРНК) и направлена на скрининг, раннюю диагностику и прогноз онкологического заболевания, выявление остаточной болезни, мониторинг эффективности терапии и эволюции опухолевых клонов [1, 2]. Одной из главных мишеней этой биопсии являются гиперметилированные CpG-островки в промоторах генов-супрессоров, для выявления которых применяют, как правило, бисульфитную обработку ДНК и различные варианты анализа на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) [3–6].

При использовании наиболее широко применяемой в клинической практике ПЦР в реальном времени с метилспецифическими праймерами (МС-ПЦР – MS-PCR) возникает ряд проблем. Во-первых, необходимо учитывать непредсказуемую гетерогенность CpG-островков (имеется в виду разнообразие паттернов их метилирования) [7]. В связи с этим использование метилспецифических праймеров (т.е. праймеров, содержащих CpG-динуклеотиды) может искажать общую картину: избирательно амплифицировать лишь какую-то субпопуляцию метилированных последовательностей. Во-вторых, в дополнение к построению стандартной кривой для анализируемого гена (в данном случае *SEPT9*) для нормализации количественных показателей необходимо построение стандартной кривой также для гена-калибратора (обычно *ACTINB*), не содержащего CpG-динуклеотиды и не подверженного изменению числа копий [8–11]. Показаны, однако, значительная вариабельность результатов при использовании одного калибратора [12] и необходимость использования нескольких из них [13], что усложняет анализ. В-третьих, принято считать, что гены-калибраторы во всех отношениях подобны исследуемому гену, но это всего лишь более или менее вероятное предположение. Степень деградации ДНК и скорость ее поступления в кровоток могут быть неодинаковыми для разных генов, что в ряде случаев приводит к различиям в числе копий и длине соответствующих фрагментов и, соответственно, к разной кинетике их амплификации. В-четвертых, для обработанной бисульфитом ДНК известен феномен предпочтительной амплификации неметилированных последовательностей [14], который может привести к неверным результатам.

Некоторые из этих проблем могут быть устранены, во-первых, использованием метилнезависимых праймеров (т.е. праймеров, не содержащих CpG-динуклеотиды) и, во-вторых, отказом от применения ПЦР в реальном времени в пользу ПЦР с анализом результатов по конечной точке (end-point ПЦР), предполагающей анализ конечного продукта, а не кинетики его синтеза. Наиболее удобен при этом реализуемый «в закрытом формате» метод HRMA (high resolution melting analysis – анализ плавления ДНК с высоким разрешением) [15, 16]. Однако и он имеет ряд ограничений: появление неспецифических пиков плавления ДНК при использовании интеркалирующих красителей, сложность количественного анализа плавления длинных ампликонов, проблема предпочтительной амплификации неметилированных последовательностей.

В данной работе для оценки аберрантного метилирования ДНК применен метод qDMA, разработанный нами ранее для выявления генных мутаций [17, 18]. Испытание qDMA проводили на гене *SEPT9* как маркере, наиболее востребованном в жидкостной биопсии разных форм рака [19, 20].

Цель исследования – разработка альтернативного метода оценки аберрантного метилирования посредством количественного анализа плавления ДНК (qDMA, quantitative DNA melting analysis).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические образцы. В исследование включены случайно отобранные 39 пациентов с колоректальным раком, проходивших лечение в клинике Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, и 41 здоровый донор. Клинические характеристики больных представлены в табл. 1.

Выделение ДНК проводили методом фенол-хлороформной депротеинизации [17].

Бисульфитная конверсия ДНК. К ДНК, выделенной из 1 мл плазмы крови, прибавляли 300 нг ДНК спермы

Таблица 1. *Клинические характеристики пациентов с колоректальным раком*

Table 1. *Clinical characteristics of patients with colorectal cancer*

Показатель Parameter	**Число пациентов, абс. (*n* = 39)** Number of patients, abs. (*n* = 39)
Пол: Gender:	
мужской male	16
женский female	23
Возраст: Age:	
медиана median	58
интервал range	31–84
Стадия Stage	
Tis	1
T3	23
T4	13
Tx	2
Локализация: Localization:	
слепая кишка caecum	1
ободочная кишка colon	24
прямая кишка rectum	14

лосося во избежание потерь из-за неспецифической сорбции, что повышало выход конвертированной ДНК (каждый опыт включал соответствующий контроль). Бисульфитную обработку ДНК проводили с использованием DNA Methylation-Gold Kit TM (Cat. № D5005, Zymo Research, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. ДНК элюировали 20 мкл буфера для элюции и хранили при 20 °C. В реакцию (объем – 25 мкл) вносили 3 мкл конвертированной ДНК.

Асимметричная ПЦР и количественный анализ плавления ДНК. Последовательность ампликона 5 гена *SEPT9* (GenBank Accession number NC_000017) [21] амплифицировали в 2 параллелях посредством асимметричной ПЦР с зондом TaqMan. Праймеры и зонд подбирали с помощью программ Integrative Genomics Viewer (v. 2.8.2), Vector NTI Advance 10 (Invitrogen Corp., Карлсбад, Калифорния, США), SnapGene Viewer 5.3.2 (GSL Biotech LLC, Сан-Диего, США) и MeltCalc [22]. Последовательности праймеров и зонда TaqMan представлены в табл. 2, а их взаимное расположение – на рис. 1. Зонд SEPT9-R (27 оснований) взаимодействует с 2 CpG-динуклеотидами (chr17: 75369601–75369604, human hg19) – индикаторами метилирования *SEPT9*.

Асимметричную ПЦР вели в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Инкубационная смесь (25 мкл) содержала: 50 мМ Трис-HCl, pH 8,8; 50 мМ KCl; 4 мМ $MgCl_2$; 0,25 мМ каждого дНТФ; 0,2 мкМ зонда SEPT9-R; 0,08 мкМ праймера SEPT9-sense и 0,4 мкМ праймера SEPT9-antisense; 2,5 ед Hot-rescue

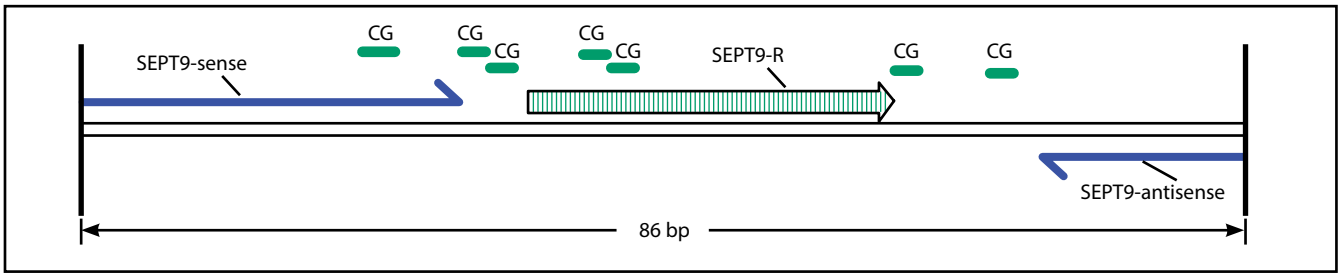


Рис. 1. *Схема расположения праймеров, зонда SEPT9-R (с флуорофором ROX) и CpG-динуклеотидов (отмечены зелеными штрихами) в ампликоне SEPT9*

Fig. 1. *Schematic presentation of primers, SEPT9-R TaqMan probe (with ROX fluorophore) and CpG dinucleotides (marked with green strokes) in the SEPT9 amplicon*

Таблица 2. *Последовательности праймеров и зонда TaqMan для ампликона SEPT9*

Table 2. *Sequences of primers and the TaqMan probe for the SEPT9 amplicon*

Праймеры, зонд Primers, probe	**Последовательности** Sequences
SEPT9-sense	5'-GTTGTTTATTAGTTATTATGTAGGATTT*
SEPT9-antisense	5'-AACCCAACACCCACC
SEPT9-R	5'-ROX-TTAATGTGTAGTTGGATGGGATTATTT-BHQ2**

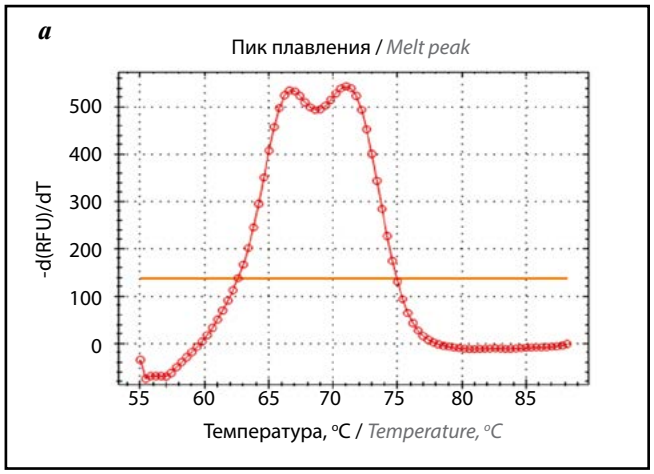
Неспаренное основание A в праймере выделено подчеркиванием.Основания T в зонде SEPT9-R, возникающие в результате бисульфитной конверсии неметилированных CpG-динуклеотидов, выделены жирным шрифтом.*

Mismatched base A in the primer is underlined. The T bases in the SEPT9-R probe resulting from bisulfite conversion of unmethylated CpG dinucleotides are shown in bold.*

Taq polymerase («Синтол», Москва); 3 мкл раствора ДНК. Условия ПЦР: начальная денатурация – 5 мин при 95 °C; 55 циклов по 13 с при 95 °C, 40 с при 58 °C, 30 с при 72 °C (с регистрацией флуоресценции).

Дуплексы зонд/ампликон плавили по завершении ПЦР: денатурация – 1 мин при 95 °C, ренатурация – 2 мин при 52 °C, плавление – от 35 до 75 °C (инкремент– 0,4 °C, выдержка – 6 с, скорость нагревания – 3,3 °C/с).

Количественный анализ плавления ДНК с использованием программы PeakFit (v. 4.12.00; SeaSolve Software Inc., Сан-Хосе, Калифорния, США) проводили, как описано ранее [17, 18]. Для измерения площадей под гауссовыми пиками плавления после вычитания фона использовали итеративную процедуру аппроксимации кривой методом наименьших квадратов (рис. 2).



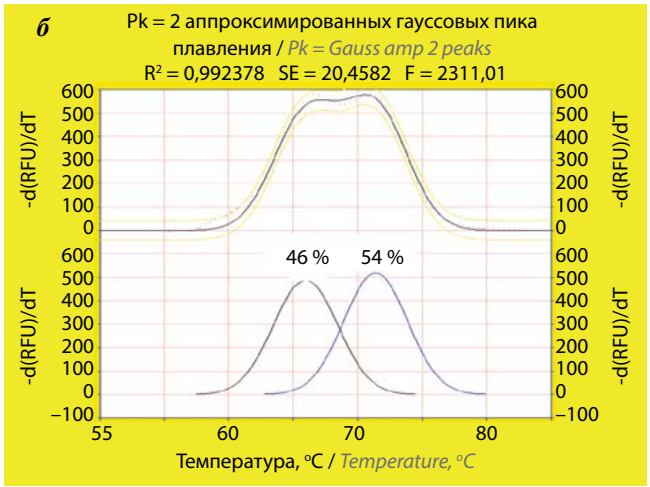


Рис. 2. *Количественный анализ плавления ДНК: а – показания модуля плавления CFX96; б – компьютерная обработка (над рисунком – статистические показатели аппроксимации кривой). Обработка сигнала включает удаление фона, разделение перекрывающихся пиков, определение площадей под гауссовыми пиками. SE – стандартная ошибка; R^2 – коэффициент детерминации*

Fig. 2. *Quantitative DNA melting analysis: a – readings of the CFX96 melting module; б – computer processing (above the figure – statistical indicators of curve approximation). Signal processing includes background removal, separation of overlapping peaks, determination of areas under Gaussian peaks. SE – standard error; R^2 – coefficient of determination*

Статистический анализ. Статистический анализ проведен с помощью GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США) и онлайн-сервера CombiROC [23]. Для сравнения уровня метилирования *SEPT9* в ДНК плазмы крови здоровых доноров и больных колоректальным раком использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Линейный регрессионный анализ проводили для оценки чувствительности qDMA, логистический регрессионный анализ – для построения ROC-кривых и определения AUC (area under curve – площади под ROC-кривой). Десятикратная перекрестная валидизация (10-fold cross-validation) была предпринята для исключения эффекта over-fitting и определения диагностической эффективности qDMA [23]. Все статистические тесты были двусторонними, статистически значимой принята величина $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для количественной оценки аберрантного метилирования в метод qDMA введен ряд модификаций, в частности: 1) дизайн максимально коротких ампликонов; 2) асимметричная ПЦР с «ручным» подбором метилнезависимых праймеров; 3) расположение зонда TaqMan над 2 CpG-динуклеотидами – «индикаторами» степени метилирования *SEPT9* (см. рис. 1); 4) замена в зонде оснований C на T; 5) количественный анализ пиков плавления, соответствующих метилированным и неметилированным аллелям *SEPT9* в исходном образце ДНК.

Указанные модификации основаны на следующих соображениях. ДНК плазмы крови фрагментирована, в силу чего амплификация происходит тем эффективнее, чем короче ампликон. Выбор метилнезависимых праймеров обусловлен необходимостью вовлечения в анализ всех (а не выборочных) аллелей *SEPT9*. Известные программы подбора праймеров и зондов, как правило, не справляются с этой задачей, что делает неизбежным «ручной» дизайн (имеются в виду «подгонка» величин Tm, контроль некомплементарности 3'-концов, отсутствия палиндромов, неспецифической амплификации, гашения флуоресценции и т.п.). Когда в процессе «подгонки» избежать присутствия CpG-динуклеотида в праймере не удавалось, основание C заменяли в нем неспаренным основанием A, «не различающим», судя по термодинамическим показателям, метилированные и неметилированные CpG-динуклеотиды. Что касается замены оснований C на T в зонде TaqMan, то они имели целью сделать его последовательность комплементарной неметилированным аллелям. Это должно было снизить эффект предпочтительного синтеза неметилированных аллелей [14, 24, 25].

Зонды TaqMan, изначально предложенные для ПЦР в реальном времени [26], нашли применение также в постамплификационном плавлении ДНК [27]. Оно становится возможным при условии проведения асимметричной ПЦР, когда оказавшаяся в избытке нить ампликона может взаимодействовать с зондом. Образующийся

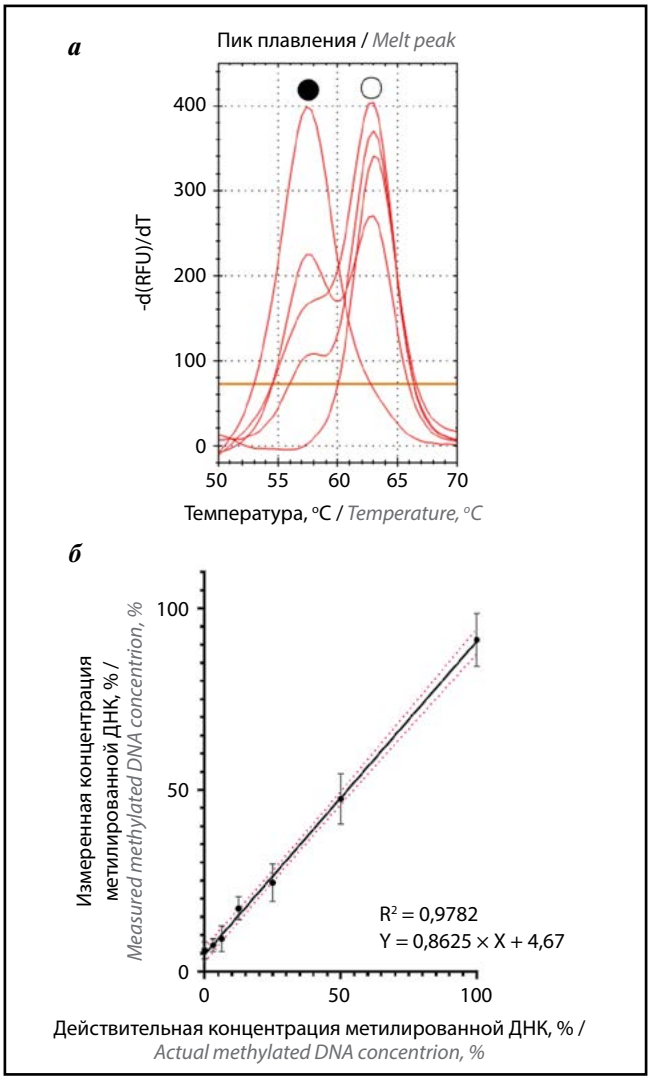


Рис. 3. *Определение аналитической чувствительности qDMA посредством серийных разведений метилированной ДНК (конечная концентрация 100, 50, 25, 12,5 и 0 % – 6 повторов) в неметилированной ДНК: а – пики плавления неметилированной и метилированной ДНК (указаны символами о и • соответственно); б – линейная регрессия фактической и измеренной концентраций метилированной ДНК. Планки погрешностей – средние с 95 % доверительным интервалом. R^2 – коэффициент детерминации*

Fig. 3. *Determination of the analytical sensitivity of qDMA by serial dilutions of methylated DNA (final concentration 100, 50, 25, 12.5 and 0 % – 6 repeats) in unmethylated DNA: a – melt peaks of unmethylated and methylated DNA (indicated by symbols o and •, respectively); б – linear regression of the actual and measured concentrations of methylated DNA. Error bars are means with 95 % confidence intervals. R^2 – coefficient of determination*

короткий гибрид крайне чувствителен к неспаренным основаниям и претерпевает при плавлении сильно выраженный температурный сдвиг, не требующий для визуализации и количественной оценки использования технологии HRMA [24, 27, 28].

Аналитическая чувствительность qDMA. Диагностический метод характеризуют 3 показателя: LoB (Limit of Blank) – предел негативного контроля, LoD (Limit of Detection) – предел обнаружения, LoQ (Limit of Quantitation) – предел количественного измерения [29].

LoB – наибольший ложноположительный результат, регистрируемый при повторных измерениях негативного (не содержащего исследуемое вещество) контроля. В 20 образцах неметилированной ДНК с помощью qDMA определяли процентное содержание метилированной ДНК. Показатели суммировали, находили среднее и стандартное отклонение (SD). Величина LoB, определяемая по формуле LoB = среднее + 1,645 × SD, составила 6,5 %.

LoD – минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно отличить от LoB. Величина LoD, определенная аналогично LoB, но по иной формуле (LoD = среднее + 3 × SD), составила 8,7 %.

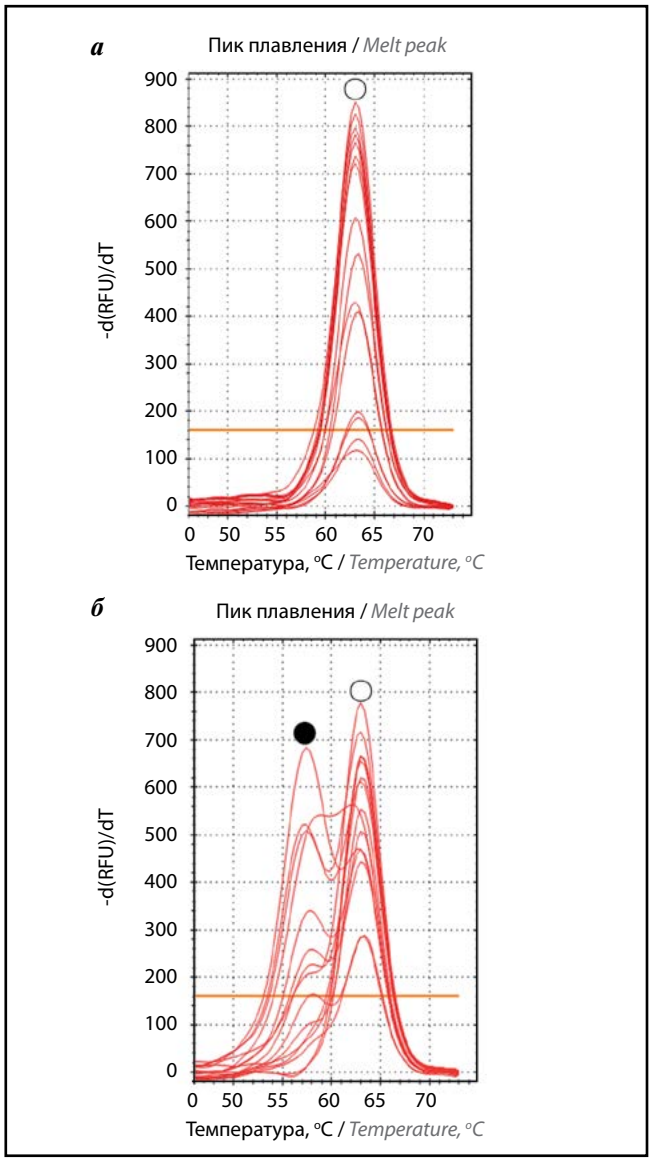


Рис. 4. *Профили плавления SEPT9: а – здоровые доноры (15 образцов), б – больные колоректальным раком (15 образцов). Пики плавления неметилированной и метилированной ДНК указаны символами о и • соответственно*

Fig. 4. *Patterns of SEPT9 melting: a – healthy donors (15 samples); б – colorectal cancer patients (15 samples). Melt peaks of unmethylated and methylated DNA are indicated by symbols o and •, respectively*

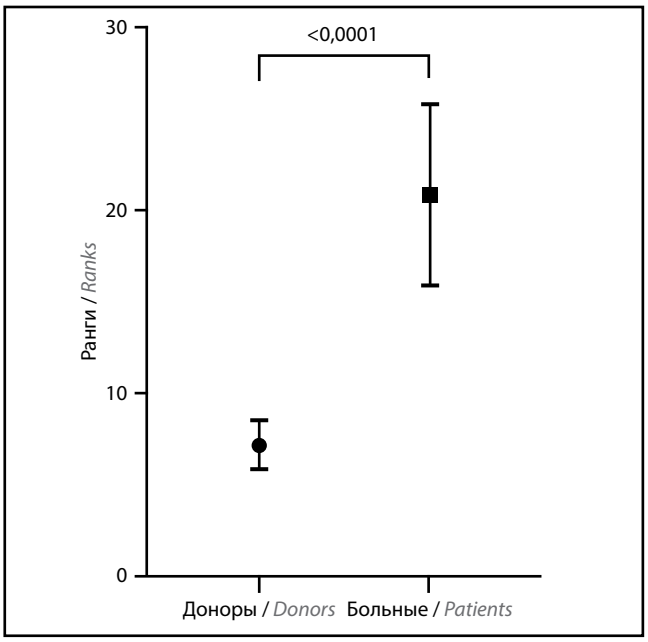


Рис. 5. *Сравнение степени метилирования SEPT9 в циркулирующей ДНК плазмы крови здоровых доноров и больных колоректальным раком (непараметрический критерий Манна–Уитни). Планки погрешностей – средние с 95 % доверительным интервалом*
Fig. 5. *Comparison of SEPT9 methylation in circulating DNA from healthy donors and colorectal cancer patients (nonparametric Mann–Whitney test). The bars indicate the mean with 95 % confidence interval*

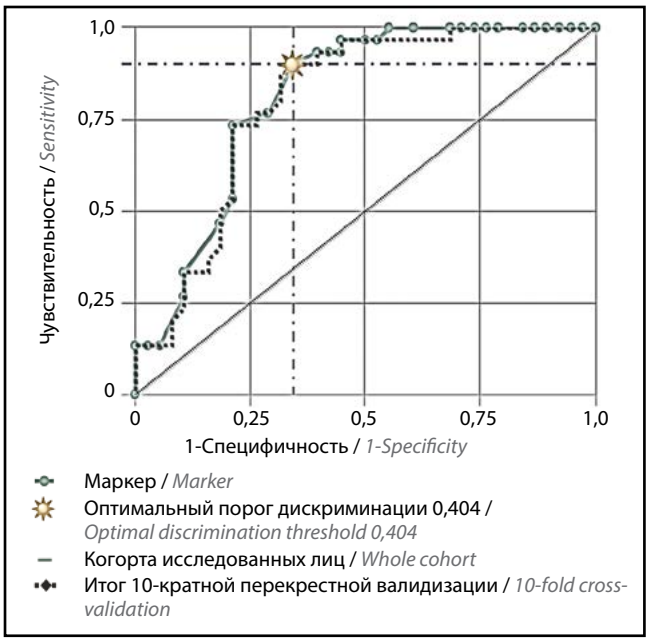


Рис. 6. *Диагностическая эффективность qDMA*
Fig. 6. *Diagnostic efficiency of qDMA*

LoQ – минимальная концентрация, при которой анализируемое вещество может быть не только обнаружено, но и количественно измерено. Для определения величины LoQ серийные разведения метилированной ДНК в неметилированной ДНК (по 6 параллелей каждого образца с конечной концентрацией метилированной ДНК – 100, 50, 25, 12,5 и 0 %) анализировали методом qDMA (рис. 3*а*). Регрессионный анализ выявляет хорошую корреляцию между реальным содержанием метилированной ДНК в исследованных образцах и результатами количественных измерений пиков плавления (рис. 3*б*). Величина LOQ составила 12 % метилированного SEPT9 как наименьшая процентная концентрация, определяемая с показателем CV (coefficient of variance) <20 % [29].

Диагностическая эффективность qDMA. Исследование проведено на когорте, включающей 41 здорового донора и 39 больных колоректальным раком. Выделенные из плазмы крови образцы ДНК обрабатывали бисульфитом, после чего подвергали асимметричной ПЦР с зондом SEPT9-R и последующим qDMA. На рис. 4 представлены профили плавления дуплексов SEPT9-R/ампликон здоровых и больных людей (по 15 образцов тех и других), демонстрирующие явные различия в степени метилирования *SEPT9*. Различия статистически достоверны (рис. 5).

Пригодность qDMA гена *SEPT9* для жидкостной биопсии колоректального рака оценивали посредством ROC-анализа (рис. 6). Величина AUC, определяющая эффективность диагностического теста, составила 0,812 (чувствительность – 90 %, специфичность – 66 %), что можно считать хорошим результатом, особенно учитывая первую попытку применения этого метода и использование лишь одного маркера, а не панели нескольких

Таблица 3. *Количественные показатели чувствительности и специфичности qDMA*
Table 3. *Quantitative indicators of sensitivity and specificity of qDMA*

Тип данных Dataset type	AUC	Чувствительность,% Sensitivity,%	Специфичность,% Specificity,%
Вся когорта Whole cohort	0,812	90,0	65,8
Десятикратная перекрестная валидизация 10-fold cross-validation	0,801	90,0	65,8

Примечание. *AUC – area under curve (площадь под кривой ROC).*
Note. *AUC – area under curve.*

маркеров. Указанные показатели сохранили свои прежние значения после процедуры 10-кратной перекрестной валидизации (cross-validation) (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании показана принципиальная возможность использования qDMA для оценки аберрантного метилирования клинически значимых генов. Учитывая малый размер зондируемой «мишени» (всего 2 CpG-динуклеотида), можно предположить, что, несмотря на известную гетерогенность паттернов метилирования CpG-островков [7], значительная масса CpG-динуклеотидов подвергается метилированию синхронно и координированно. Это наблюдение уравнивает шансы предлагаемого нами qDMA и общепринятого HRMA, использующего интеркалирующие красители и способного анализировать ампликон целиком (и, следовательно, десятки CpG-динуклеотидов) [5, 30–32].

Таким образом, хотя qDMA и уступает HRMA в размере анализируемой последовательности, он имеет преимущества в простоте исполнения, возможности мультиплексного анализа, специфичности и чувствительности. Последнее обусловлено дестабилизирующим эффектом неспаренных оснований, который тем сильнее, чем короче анализируемый дуплекс. Поэтому в qDMA значительно отчетливее, чем в HRMA (где часто имеет место суперпозиция плавления нескольких структурных доменов), выражены температурные сдвиги, и они легче поддаются количественному анализу. Таким образом, метод qDMA, не требующий необходимых для HRMA оборудования и программного обеспечения, имеет ряд преимуществ: он более прост в использовании и позволяет осуществлять одновременный количественный анализ нескольких маркеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод асимметричной ПЦР с использованием зондов TaqMan, метилнезависимых праймеров и постамплификационного количественного анализа плавления ДНК (qDMA), предлагаемый для количественной оценки аберрантно метилированных ДНК, реализуется в закрытом формате, прост в исполнении, не требует нормализации и построения стандартных кривых. Предполагается возможность повышения его диагностической эффективности посредством применения мультиплексного варианта для одновременного анализа нескольких маркеров. Кроме того, увеличение анализируемой «мишени» (т.е. числа зондируемых CpG-динуклеотидов) повышает эффективность теста (здесь не представлено). Прямое сопоставление на 1 когорте испытуемых лиц разных подходов – общепринятого (ПЦР в реальном времени с метилспецифическими праймерами) и оригинального (асимметричной ПЦР с метилнезависимыми праймерами, зондами TaqMan и qDMA) – является предметом дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Serrano M.J., Garrido-Navas M.C., Diaz Mochon J.J. et al. Precision prevention and cancer interception: the new challenges of liquid biopsy. Cancer Discovery 2020;10(11):1635–44. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-0466.
2. Cescon D.W., Bratman S.V., Chan S.M. et al. Circulating tumor DNA and liquid biopsy in oncology. Nature Cancer 2020;1:276–90. DOI: 10.1038/s43018-020-0043-5.
3. Xiong Z., Laird P.W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acids Res 1997;25(12):2532–4. DOI: 10.1093/nar/25.12.2532.
4. Worm J., Aggerholm A., Guldberg P. In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis. Clinical Chemistry 2001;47(7):1183–9.
5. Tse M.Y., Ashbury J.E., Zwingerman N. et al. A refined, rapid and reproducible high resolution melt (HRM)-based method suitable for quantification of global LINE-1 repetitive element methylation. BMC Research Notes 2011;4:565. DOI: 10.1186/1756-0500-4-565.
6. Quillien V., Lavenu A., Karayan-Tapon L. et al. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltranferase in a series of 100 glioblastoma patients. Cancer 2012;118(17):4201–11. DOI: 10.1002/cncr.27392.
7. Korshunova Y., Maloney R.K., Lakey N. et al. Massively parallel bisulphite pyrosequencing reveals the molecular complexity of breast cancer-associated cytosine-methylation patterns obtained from tissue and serum DNA. Genome Res 2008;18(1):19–29. DOI: 10.1101/gr.6883307.
8. Sepulveda A.R., Jones D., Ogino S. et al. CpG methylation analysis-current status of clinical assays and potential applications in molecular diagnostics: a report of the Association for Molecular Pathology. J Mol Diagn 2009;11(4):266–78. DOI: 10.2353/jmoldx.2009.080125.
9. Egger G., Wielscher M., Pulverer W. et al. DNA methylation testing and marker validation using PCR: diagnostic applications. Expert Rev Mol Diagn 2012;12(1):75–92. DOI: 10.1586/erm.11.90.
10. Dietrich D., Jung M., Puetzer S. et al. Diagnostic and prognostic value of SHOX2 and SEPT9 DNA methylation and cytology in benign, paramalignant and malignant pleural effusions. PLoS ONE 2013;8(12):e84225. DOI: 10.1371/journal.pone.0084225.
11. De Vos L., Gevensleben H., Schrock A. et al. Comparison of quantification algorithms for circulating cell-free DNA methylation biomarkers in blood plasma from cancer patients. Clin Epigenetics 2017;9(1):125. DOI: 10.1186/s13148-017-0425-4.
12. Pharo H.D., Honne H., Vedeld H.M. et al. Experimental factors affecting the robustness of DNA methylation analysis. Sci Rep 2016;6:33936. DOI: 10.1038/srep33936.
13. Pharo H.D., Andresen K., Berg K.C.G. et al. A robust internal control for high-precision DNA methylation analyses by droplet digital PCR. Clin Epigenetics 2018;10:24. DOI: 10.1186/s13148-018-0456-5.
14. Warnecke P.M., Stirzaker C., Melki J.R. et al. Detection and measurement of PCR

bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. Nucleic Acids Res 1997;25(21):4422–6. DOI: 10.1093/nar/25.21.4422.
15. Wojdacz T.K., Hansen L.L., Dobrovic A. A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. BMC Res Notes 2008;1:54. DOI: 10.1186/1756-0500-1-54.
16. Wojdacz T.K., Borgbo T., Hansen L.L. Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications. Epigenetics 2009;4(4):231–4. DOI: 10.4161/epi.9020.
17. Botezatu I.V., Kondratova V.N., Shelepov V.P. et al. Asymmetric mutant-enriched polymerase chain reaction and quantitative DNA melting analysis of KRAS mutation in colorectal cancer. Anal Biochem 2020;590:1–9. DOI: 10.1016/j.ab.2019.113517.
18. Kondratova V.N., Botezatu I.V., Shelepov V.P. et al. SLAM-MS: mutation scanning of stem-loop amplicons with TaqMan probes by quantitative DNA melting analysis. Sci Rep 2020;10:5476. DOI: 10.1038/s41598-020-62173-x.
19. Лазаревич Н.Л., Абрамов П.М., Федорова М.Д. и др. Идентификация нового сайта метилирования в промоторном районе гена *Sept9* для диагностики гепатоцеллюлярной карциномы. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(4):26–37. [Lazarevich N.L., Abramov P.M., Fedorova M.D. et al. Identification of a new methylation site in the Sept9 promoter region for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2019;6:26–37. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-26-37.
20. Sui J., Wu X., Wang C. et al. Discovery and validation of methylation signatures in blood-based circulating tumor cell-free DNA in early detection of colorectal carcinoma: a case-control study. Clin Epigenetics 2021;13:26. DOI: 10.1186/s13148-020-00985-4.
21. Wasserkort R., Kalmar A., Valcz G. et al. Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. BMC Cancer 2013;13:398. DOI: 10.1186/1471-2407-13-398.
22. Schutz E., von Ahsen N. Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. Biotechniques 1999;27(6):1218–22, 1224. DOI: 10.2144/99276bc04.
23. Mazzara S., Rossi R.L., Grifantini R. et al. CombiROC: an interactive web tool for selecting accurate marker combinations of omics data. Sci Rep 2017;7:45477. DOI: 10.1038/srep45477.
24. Botezatu I.V., Panchuk I.O., Stroganova A.M. et al. TaqMan probes as blocking agents for enriched PCR amplification and DNA melting analysis of mutant genes. Biotechniques 2017;62(2):62–8. DOI: 10.2144/000114515.
25. Montgomery J.L., Rejali N., Wittwer C.T. The influence of nucleotide sequence and temperature on the activity of thermostable DNA polymerases. J MolDiagn 2014;16(3):305–13. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2014.01.006.
26. Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J. et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl 1995;4(6):357–62. DOI: 10.1101/gr.4.6.357.
27. Huang Q., Liu Z., Liao Y. et al. Multiplex fluorescence melting curve analysis for mutation detection with dual-labeled, self-quenched probes. PLoS ONE 2011;6(4):e19206. DOI: 10.1371/journal.pone.0019206.
28. Botezatu I.V., Nechaeva I.O., Stroganova C.A. et al. Optimization of melting analysis with Taqman probes for detection of KRAS, NRAS and BRAF mutations. Anal Biochem 2015;491:75–83. DOI: 10.1016/j.ab.2015.09.005.
29. Armbruster D.A., Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. Clin Biochem Rev 2008;29(Suppl 1):S49–52.
30. Wojdacz T.K., Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS- HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. Nucleic Acids Res 2007;35(6):e41. DOI: 10.1093/nar/gkm013.
31. Malentacchi F., Forni G., Vinci S. et al. Quantitative evaluation of DNA methylation by optimization of a differential-high resolution melt analysis protocol. Nucleic Acids Res 2009;37(12):e86. DOI: 10.1093/nar/gkp383.
32. Spitzwieser M., Entfellner E., Werner B. et al. Hypermethylation of CDKN2A exon 2 in tumor, tumor-adjacent and tumor-distant tissues from breast cancer patients. BMC Cancer 2017;17:260. DOI: 10.1186/s12885-017-3244-2.

Вклад авторов
И.В. Ботезату, В.Н. Кондратова: разработка дизайна, проведение экспериментов;
А.М. Строганова: получение и характеристика клинических образцов;
С.Л. Дранко: получение клинических образцов;
А.В. Лихтенштейн: разработка концепции исследования, написание статьи.
Autrors' contributions
I.V. Botezatu, V.N. Kondratova: developing the concept design, conducting experiments;
A.M. Stroganova: obtaining and characterization of clinical samples;
S.L. Dranko: obtaining clinical samples;
A.V. Lichtenstein: developing the concept design, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors
И.В. Ботезату / I.V. Botezatu: https://orcid.org/0000-0002-0297-4963
В.Н. Кондратова / V.N. Kondratova: https://orcid.org/0000-0003-0614-8789
А.М. Строганова / A.M. Stroganova: https://orcid.org/0000-0002-7297-5240
С.Л. Дранко / S.L. Dranko: https://orcid.org/0000-0003-3315-0817
А.В. Лихтенштейн / A.V. Lichtenstein: https://orcid.org/0000-0002-0190-5069

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

Финансирование. Финансируется в рамках госбюджетной темы.
Financing. It is funded under the state budget theme.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 22.09.2021. **Принята к публикации:** 19.11.2021.
Article submitted: 22.09.2021. **Accepted for publication:** 19.11.2021.

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-61-66

CC BY

Иммуногистохимический анализ экспрессии белка PRAME как прогностический фактор у больных увеальной меланомой

С.В. Саакян[1], А.Ю. Цыганков[1], А.Г. Амирян[1], М.Р. Хлгатян[1], Д.А. Хоченков[2], В.А. Мисюрин[2]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России; Россия, 105062 Москва, ул. Садовая-Черногрязская, 14/19;

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

Контакты: Александр Юрьевич Цыганков *alextsygankov1986@yandex.ru*

Цель исследования – анализ прогностической значимости экспрессии белка PRAME у пациентов с увеальной меланомой с помощью иммуногистохимического исследования.

Материалы и методы. Были обследованы и пролечены 30 пациентов с увеальной меланомой, которым с марта по декабрь 2012 г. проведена терапия в стационаре Национального медицинского исследовательского центра глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России. Средний возраст больных на момент исследования составил 51,3 ± 11,8 года. Во всех случаях по показаниям выполнена энуклеация. Проведены рутинное клинико-морфологическое, молекулярно-генетическое и иммуногистохимическое исследования (n = 29). Иммуногистохимическое исследование выполнено с использованием антител к PRAME (клон 6H8, разведение 1 : 50). Медиана наблюдения составила 86,3 ± 2,9 мес.

Результаты. Из 29 исследованных образцов увеальной меланомы окрашивание определено в 16 (55,2 %). Слабая интенсивность окрашивания 1+ (от 10 до 20 % опухолевых клеток) выявлена в 7 образцах, средняя интенсивность 2+ (от 10 до 20 % опухолевых клеток) – также в 7, сильная интенсивность 3+ (30 % опухолевых клеток) – в 2 образцах. При оценке 7-летней выживаемости накопленная доля выживших в группе без экспрессии PRAME составила 0,857, в то время как в группе с наличием экспрессии PRAME она была значимо ниже и составила 0,357 (p = 0,0001). Показана значимая взаимосвязь экспрессии белка PRAME, эпителиоидноклеточного типа опухоли (p = 0,041) и полной и частичной моносомии хромосомы 3 (p = 0,013).

Заключение. В настоящей работе представлено первое в мировой практике исследование прогностической значимости экспрессии белка PRAME методом иммуногистохимического анализа у пациентов с увеальной меланомой. PRAME-положительный статус опухоли значимо ассоциирован с неблагоприятным витальным прогнозом.

Ключевые слова: увеальная меланома, иммуногистохимическое исследование, экспрессия, PRAME

Для цитирования: Саакян С.В., Цыганков А.Ю., Амирян А.Г. и др. Иммуногистохимический анализ экспрессии белка PRAME как прогностический фактор у больных увеальной меланомой. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(4):61–6. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-61-66.

Immunohistochemical analysis of prame expression as a prognostic factor in uveal melanoma patients

S.V. Saakyan[1], A.Yu. Tsygankov[1], A.G. Amiryan[1], M.R. Khlgatyan[1], D.A. Khochenkov[2], V.A. Misyurin[2]

[1]Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Ministry of Health of Russia; 14/19, Sadovaya-Chernogryazskaya St., Moscow 105062, Russia;

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

Contacts: Alexander Yuryevich Tsygankov *alextsygankov1986@yandex.ru*

The study objective is to analyze the prognostic significance of PRAME protein expression in patients with uveal melanoma using immunohistochemical assay.

Materials and methods. A total of 30 patients with uveal melanoma were examined and treated. The average age of patients at the time of treatment was 51.3 ± 11.8 years. In all cases, enucleation was performed according to the indications. A routine clinical-morphological, molecular-genetic, and immunohistochemical assay study was performed (n = 29). The immunohistochemical study was performed using antibodies to PRAME (clone 6H8, dilution 1: 50). The median follow-up period was 86.3 ± 2.9 months.

Results. Of the 29 samples studied, staining was determined in 16, which was 55.2 %. Weak intensity of 1+ staining (from 10 to 20 % of tumor cells) was detected in 7 uveal melanoma samples, medium intensity of 2+ (from 10 to 20 % of tumor cells) – also in 7, and strong intensity of 3+ (30 % of tumor cells) – in 2 tumor samples. When assessing the seven-year survival, the cumulative survival rate in the group without PRAME expression was 0.857, while in the group with PRAME expression it was significantly lower and amounted to 0.357 (p = 0.0001). The PRAME protein expression was significantly correlated with the epithelioid cell type of the tumor (p = 0.041) and with the total and partial monosomy of chromosome 3 (p = 0.013).

Conclusion. This paper presents the world's first study of the prognostic significance of PRAME protein expression by immunohistochemical analysis in patients with uveal melanoma. A significant association of PRAME-positive patients with an unfavorable vital prognosis was shown.

Key words: uveal melanoma, immunohistochemistry assay, expression, PRAME

For citation: Saakyan S.V., Tsygankov A.Yu., Amiryan A.G. et al. Immunohistochemical analysis of prame expression as a prognostic factor in uveal melanoma patients. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2021;8(4):61–6. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-61-66.

ВВЕДЕНИЕ

Увеальная меланома (УМ) – наиболее распространенная первичная внутриглазная злокачественная опухоль [1]. Частота встречаемости данной патологии составляет от 6 до 10 человек на 1 млн взрослого населения в год [2]. Эта опухоль ассоциирована с неблагоприятным витальным прогнозом: через 10 лет приводит к гибели 50 % больных (независимо от вида лечения) [3]. В литературе описаны клинические, патоморфологические и молекулярно-генетические факторы риска неблагоприятного течения УМ (размеры, локализация в цилиарном теле, смешанноклеточный и эпителиоидноклеточный типы опухоли, наличие экстрабульбарного роста, большого количества митозов, тучных клеток в микроокружении опухоли, моносомия хромосомы 3 и ряд других генетических аберраций) [4–6].

В последние годы в онкологии особое внимание уделяется анализу экспрессии гена *PRAME* (preferentially expressed antigen in melanoma). Показано, что кодируемый данным геном раково-тестикулярный белок аберрантно экспрессируется при целом ряде опухолей, включая рак почки, молочной железы, опухоли головы и шеи, нейробластому, остеосаркому и меланому кожи [7]. В.А. Мисюрин и соавт. показали, что экспрессия гена *PRAME* увеличивает химиорезистентность клеток меланомы кожи, что создает дополнительные сложности в подборе химиотерапии [8].

Метаанализ, проведенный J. Li и соавт., продемонстрировал, что экспрессия *PRAME* значимо ассоциирована со стадией опухолевого процесса (отношение шансов (ОШ) 1,99; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,48–2,67; p <0,001) и метастазированием опухоли в лимфатические узлы (ОШ = 3,14; 95 % ДИ 1,99–4,97; p <0,001). Показана положительная корреляция гиперэкспрессии *PRAME* с низкой выживаемостью без признаков заболевания (отношение рисков (ОР) 1,60; 95 % ДИ 1,36–1,88; p <0,001), беспрогрессивной выживаемостью (ОР 1,88; 95 % ДИ 1,02–3,46; p = 0,042), выживаемостью без метастазов (ОР 1,86; 95 % ДИ 1,05–3,31; p = 0,034) и общей выживаемостью (ОР 1,75; 95 % ДИ 1,53–1,99; p <0,001). Авторы делают вывод о значимой роли экспрессии PRAME в опухолевой прогрессии [9].

Первая работа, посвященная роли экспрессии гена *PRAME* в развитии УМ у пациентов с УМ, была опубликована в 2016 г. M.G. Field и соавт. проанализировали экспрессию матричной РНК (мРНК) *PRAME* в 389 образцах УМ и заключили, что наличие положительной экспрессии *PRAME* даже в опухолях, относящихся к классу I профиля экспрессии генов (GEP), увеличивает риск [10]. В дальнейшем эти же авторы показали, что данный ген можно оценивать как прогностический биомаркер и потенциальную мишень для иммунотерапии при УМ [11]. Крупное экспериментальное исследование, проведенное G. Gezgin и соавт., показало, что *PRAME* экспрессируется во многих первичных и метастатических УМ, а наличие *PRAME*-специфических Т-клеток может влиять на эффективность иммунотерапии у этой категории больных [12].

На сегодняшний день во всех описанных исследованиях анализ экспрессии гена *PRAME* [10–16] проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с учетом разделения опухолей на прогностические классы с использованием панели, предложенной в 2014 г. W. Harbour [13]. В повседневной клинической практике применение данного теста имеет определенные ограничения, обусловленные его высокой стоимостью. В связи с потенциальной значимостью анализа экспрессии белка *PRAME* мы осуществили поиск возможных решений к выполнению данного метода исследования по приемлемой цене в рутинной практике.

Цель исследования – анализ прогностической значимости экспрессии белка PRAME у пациентов с увеальной меланомой с помощью иммуногистохимического исследования (ИГХ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические данные. В рамках ретроспективного исследования были обследованы и пролечены 30 пациентов (12 мужчин и 18 женщин) с УМ, получавших терапию в стационаре Национального медицинского исследовательского центра глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России с марта по декабрь 2012 г. Средний возраст пациентов на момент исследования составил 51,3 ± 11,8 года (от 23 до 83 лет).

Всем больных проведено комплексное стандартное и специальное офтальмологическое обследование. По данным эхографического исследования проминенция УМ составила в среднем 8,6 ± 2,9 мм (от 2,6 до 13,8 мм), диаметр основания опухоли – 15,1 ± 3,4 мм (от 8,2 до 21,9 мм). У 2 пациентов было заболевание стадии T1N0M0, у 11 – стадии T2N0M0, у 17 – стадии T3N0M0. По показаниям во всех случаях проведена энуклеация пораженного глаза с морфологическим и молекулярно-генетическим исследованиями.

Критерием исключения из исследования было отсутствие данных динамического наблюдения за больными. Все клинико-морфологические исследования проведены на базе Национального медицинского исследовательского центра глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России и кафедры глазных болезней факультета дополнительного профессионального образования ФГБУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. И.А. Евдокимова» Минздрава России, молекулярно-генетические – на базе лаборатории молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», иммуногистохимические – на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Срок наблюдения составил от 84 до 89 мес (медиана – 86,3 ± 2,9 мес).

Методика иммуногистохимического исследования. Для проведения ИГХ-анализа были отобраны образцы опухолевой ткани УМ, имевшиеся в наличии в архиве отдела патологической анатомии и гистологии Национального медицинского исследовательского центра глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России в декабре 2019 г. (n = 29). В работе использованы антитела к PRAME (клон 6H8, разведение 1 : 50; производитель – ООО «Генотехнология», Российская Федерация) в растворе для разведения антител (Abcam), аналогично описанным Ю.П. Финашутиной и соавт. [17].

Микросрезы УМ депарафинировали и регидратировали при последовательной обработке в ксилоле и спирте. «Демаскировку» антигенов выполняли при нагревании срезов в течение 20 мин (95 °C) в цитратном буфере (pH 6,0, Abcam), после чего охлаждали при комнатной температуре в течение 10 мин и 5 мин промывали в дистиллированной воде. Срезы обводили парафиновым карандашом Super PAP Pen (Invitrogen) и 5 мин промывали в фосфатно-солевом буфере. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали в темноте в течение 5 мин с 3 %-ной перекисью водорода и промывали 5 мин в фосфатном буфере. Для блокирования неспецифического связывания антител срезы инкубировали 15 мин с 1 %-ным раствором бычьего сывороточного альбумина при комнатной температуре. После этого наносили первичные антитела к PRAME и инкубировали при +4 °C в течение 16 ч, а затем срезы промывали в фосфатно-солевом буфере (2 раза по 5 мин). Для проявки антител использовали набор REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+ Rabbit/Mouse (Dako). Срезы докрашивали гематоксилином Майера (Sigma), депарафинизировали при последовательной обработке в ксилоле и спирте и заключали под покровное стекло при помощи Shandon Mount solution (Thermo).

Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа Nikon Eclipse 50i (×200). Для каждого маркера определяли локализацию и интенсивность окрашивания. Количество положительных клеток оценивали в зонах, содержащих их максимальное количество, далее нормировали полученные данные на 1 мм^2 площади препарата. Для всех маркеров оценивали интенсивность окрашивания (0 – отсутствие окрашивания, 1+ – слабая, 2+ – средняя и 3+ – сильная интенсивность окрашивания), которую выражали в баллах, и количество положительных клеток, выражаемое

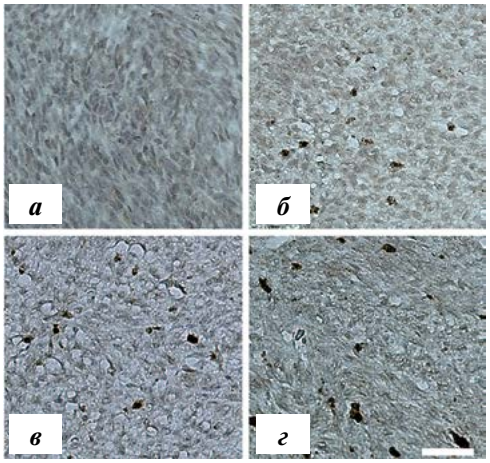


Рис. 1. *Иммуногистохимический анализ экспрессии белка PRAME при увеальной меланоме (окраска красителем DAB+): а – отсутствие окрашивания; б – слабая интенсивность окрашивания; в – средняя интенсивность окрашивания; г – сильная интенсивность окрашивания. ×200. Шкала 50 мкм*

Fig. 1. *Immunohistochemical analysis expression of the PRAME protein in uveal melanoma (with DAB+ staininh): a – no staining; б – weak intensity of staining; в – moderate intensity of staining; г – high intensity of staining. ×200. Scale 50 μm*

в процентах (0–100 %) (рис. 1). В качестве положительного контроля использовали ИГХ-окрашивание клеток линии K562 с высокой экспрессией PRAME. В качестве отрицательного контроля использовали окрашивание срезов опухоли проявочными антителами без нанесения первичных антител.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов исследования проводили методами вариационной статистики с определением средней арифметической (M), минимальных (min) и максимальных (max) значений, стандартного отклонения (σ) и медианы (Me). Анализ качественных признаков в таблицах сопряженности выполняли с помощью критерия χ^2, для малых выборок применялся точный критерий Фишера. Различия считались достоверными при $p < 0{,}05$.

Для оценки выживаемости пациентов после лечения использовали статистический метод множительных оценок Каплана–Мейера. Расчеты проводили в пакетах программ для Windows (Microsoft Excel, IBM SPSS Statistics 23.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Окрашивание определено в 16 (55,2 %) из 29 исследованных образцов УМ. Слабая интенсивность окрашивания 1+ (от 10 до 20 % опухолевых клеток) выявлена в 7 образцах, средняя интенсивность 2+ (от 10 до 20 % опухолевых клеток) – в 7, сильная интенсивность 3+ (30 % опухолевых клеток) – в 2 образцах.

Семилетняя общая выживаемость пациентов составила 60 % (умерли в результате прогрессирования метастатической болезни 12 больных, живы на момент исследования или умерли по другим причинам 18 больных). Проведен анализ 7-летней выживаемости 29 пациентов в зависимости от наличия ИГХ-окрашивания образцов УМ (рис. 2).

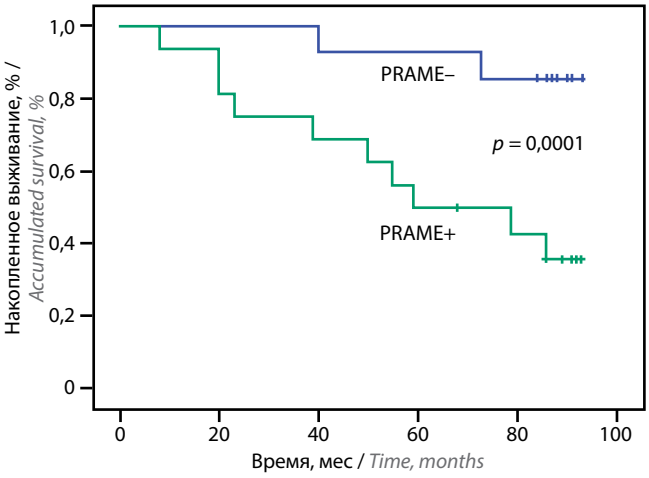


Рис. 2. *Взаимосвязь общей выживаемости пациентов с увеальной меланомой в зависимости от наличия (зеленая кривая) или отсутствия (синяя кривая) экспрессии белка PRAME*

Fig. 2. *Analysis of the relationship between the survival of patients with uveal melanoma depending on the presence (green curve) or absence (blue curve) of PRAME protein expression*

Накопленная доля выживших в группе без экспрессии *PRAME* составила 0,857, в то время как в группе с наличием данной экспрессии она была значимо ниже – 0,357 ($p = 0{,}0001$). Медиана общей выживаемости в группах с отсутствием и наличием экспрессии PRAME равна 89,3 ± 2,8 мес (95 % ДИ 41,9–88,2) и 36,3 ± 5,1 мес (95 % ДИ 10,9–86,4) соответственно (ОР 1,72; ОШ 1,98). Два пациента, у которых выявлена сильная степень окрашивания 3+ (30 % клеток), умерли от прогрессирования метастастической болезни. Таким образом, больные с *PRAME*-положительной УМ имеют значимо худший витальный прогноз при анализе 7-летней выживаемости.

Проведен анализ ассоциации наличия экспрессии белка PRAME с неблагоприятными клиническими, патоморфологическими и молекулярно-генетическими факторами. Выявлена ее значимая взаимосвязь с эпителиоидноклеточным типом опухоли ($p = 0{,}041$) и полной моносомией хромосомы 3 ($p = 0{,}013$). Ассоциации с другими прогностическими факторами (размерами опухоли, ее локализацией в цилиарном теле, наличием экстрабульбарного роста опухоли) выявить не удалось (см. таблицу).

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление новых прогностических факторов у пациентов с УМ остается одной из наиболее актуальных проблем в офтальмоонкологии в связи с неблагоприятным витальным прогнозом у более чем 50 % пациентов. A.C. Schefler и соавт. изучили экспрессию мРНК *PRAME* и профиль экспрессии генов (GEP) у 148 больных УМ [15]. Согласно полученным данным, в 37 % случаев определен *PRAME*-положительный статус пациентов. В нашей работе ИГХ-экспрессию PRAME удалось выявить более чем в половине (55,2 %) случаев. A.C. Schefler и соавт. не обнаружили значимых взаимосвязей экспрессии PRAME с возрастом, полом пациентов и толщиной опухоли. При этом диаметр основания УМ и более высокий GEP-класс были ассоциированы с PRAME-положительным статусом. Отсутствие взаимосвязи экспрессии PRAME с размерами опухоли (несмотря на высокую частоту PRAME-положительных пациентов в нашем исследовании) можно объяснить тем, что в работу включены больные, имевшие на момент обследования показания к удалению глаза (преимущественно заболевание стадии T3N0M0), в то время как в исследовании A.C. Schefler и соавт. участвовали также пациенты с УМ стадии T1N0M0 (34,5 %) и T2N0M0 (22,3 %).

В нашей работе не проводили оценку профиля экспрессии генов у пациентов в связи с низкой доступностью данной методики в Российской Федерации, однако хромосомный анализ показал значимую ассоциацию PRAME-положительного статуса с полной и частичной делецией хромосомы 3 и неблагоприятным витальным прогнозом. Сходные данные о взаимосвязи профиля экспрессии генов и экспрессии мРНК

Клинические, патоморфологические и молекулярно-генетические характеристики пациентов с увеальной меланомой

Clinical, pathomorphological, and molecular genetic characteristics of patients with uveal melanoma

Показатель Parameter	PRAME+ (*n* = 16)	PRAME– (*n* = 13)	*p*
Средний возраст, лет Mean age, years	48,1 ± 13,3 (23–70)	56 ± 12,6 (27–72)	>0,05
Пол, абс.: Gender, abs. мужской males женский females	 9 7	 3 10	>0,05
Средняя высота опухоли, мм Mean tumor height, mm	8,4 ± 2,8 (4,3–13)	9,1 ± 3,3 (2,6–13,8)	>0,05
Средний диаметр основания опухоли, мм Mean diameter of the tumor base, mm	14,6 ± 3,6 (8,2–20,4)	15,3 ± 3,4 (10,4–21,9)	>0,05
Локализация опухоли в цилиарном теле, абс. Localization of the tumor in the ciliary body, abs.	3	5	>0,05
Экстрабульбарный рост опухоли, абс. Extrabulbar tumor growth, abs.	3	1	>0,05
Клеточный тип опухоли, абс.: cell type of tumor, abs.: веретоклеточный spindle cell смешанноклеточный mixed cell эпителиоидноклеточный epithelioid cell	 3 4 9	 7 3 2	 >0,05 >0,05 **0,041**
Моносомия хромосомы 3, абс. Monosomy of chromosome 3, abs.	11	1	**0,013**

Примечание. *Жирным начертанием выделены статистически значимые различия.*
Note. *Statistically significant differences are highlighted in bold.*

PRAME представлены в работах L. Cai и соавт. [14] и Field M.G. и соавт. [10]. Мы проводили оценку экспрессии PRAME методом ИГХ, что позволило резко сократить стоимость исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе представлено первое в мировой практике исследование прогностической значимости экспрессии белка PRAME методом ИГХ у пациентов с УМ. PRAME-положительный статус опухоли значимо ассоциирован с неблагоприятным витальным прогнозом, морфологическими и молекулярно-генетическими прогностическими факторами. Представленный метод определения экспрессии белка PRAME является недорогим, легко воспроизводимым и значимым в связи с импортозамещением технологий в Российской Федерации. Полученные результаты могут быть использованы для разработки подходов к таргетной и иммунной терапии распространенной УВ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kaliki S., Shields C.L. Uveal melanoma: relatively rare but deadly cancer. Eye (Lond) 2017;31(2):241–57. DOI: 10.1038/eye.2016.275.
2. Гришина Е.Е., Лернер М.Ю., Гемджян Э.Г. Эпидемиология увеальной меланомы в г. Москве. Альманах клинической медицины 2017;45(4):321–5. [Grishina E.E., Lerner M.Yu., Gemdzhian E.G. Epidemiology of uveal melanomas in Moscow. Al'manah klinicheskoj mediciny = Almanac of Clinical Medicine 2017;45(4):321–5. (In Russ.)]. DOI: 10.18786/2072.
3. Aronow M.E., Topham A.K., Singh A.D. Uveal melanoma: 5-year update on incidence, treatment, and survival (SEER 1973–2013). Ocul Oncol Pathol 2018;4(3):145–51. DOI: 10.1159/000480640.
4. Саакян С.В., Захарова Г.П., Мякошина Е.Б. Тучные клетки в микроокружении увеальной меланомы. Архив патологии 2019;81(6):63–70. [Saakyan S.V., Zakharova G.P., Myakoshina E.B. Mast cells in the microenvironment of uveal melanoma. Arkhiv patologii = Archive of Pathology 2019;81(6):63–70. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/patol20198106163.
5. Саакян С.В., Амирян А.Г., Цыганков А.Ю. и др. Клинические, патоморфологические и молекулярно-генетические особенности увеальной меланомы с высоким риском метастазирования. Российский офтальмологический журнал 2015;8(2):47–52. [Saakyan S.V., Amiryan A.G., Tsygankov A.Yu. et al. Clinical, pathological and molecular genetic features of uveal melanoma with a high risk of metastasis. Rossiiskiy oftal'mologicheskiy zhurnal = Russian Ophthalmological Journal 2015;8(2): 47–52. (In Russ.)].
6. Нероев В.В., Саакян С.В., Амирян А.Г. и др. Выживаемость больных увеальной меланомой в отдаленные сроки после

энуклеации в зависимости от молекулярно-генетических аберраций. Альманах клинической медицины 2018;46(4):338–46. [Neroev V.V., Saakyan S.V., Amiryan A.G. et al. Long-term survival of uveal melanoma patients after enucleation, depending on molecular genetic aberrations. Al'manah klinicheskoj mediciny = Almanac of Clinical Medicine 2018;46(4):338–46. (In Russ.)]. DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-4-338-346.
7. Мисюрин В.А. Прогностическое значение экспрессии гена PRAME при солидных опухолях. Иммунология 2018;39(1):67–73. [Misurin V.A. Prognostic value of prame's gene expression in solid tumors. Immunologiya = Immunology 2018;39(1):67–73. (In Russ.)]. DOI: 10.18821/0206-4952-2018-39-1-67-73.
8. Мисюрин В.А., Калениченко Д.В., Рудакова А.А. и др. Проблема химиорезистентности PRAME-экспрессирующей клетки меланомы и способ ее преодоления с помощью бортезомиба. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):131–4. [Misyurin V.A., Kalenichenko D.V., Rudakova A.A. et al. Chemoresistance of PRAME-expressing melanoma cell can be resolved with help of bortezomib. Uspehi molekuljarnoj onkologii = Advances in molecular oncology 2018;5(4):131–4. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-131-134.
9. Li J., Yin J., Zhong J. et al. Clinicopathological and prognostic significance of PRAME overexpression in human cancer: a meta-analysis. Biomed Res Int 2020;2020:8828579. DOI: 10.1155/2020/8828579.
10. Field M.G., Decatur C.L., Kurtenbach S. et al. PRAME as an independent biomarker for metastasis in uveal melanoma. Clin Cancer Res 2016;22(5):1234–42. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2071.
11. Field M.G., Durante M.A., Decatur C.L. et al. Epigenetic reprogramming and aberrant expression of PRAME are associated with increased metastatic risk in Class 1 and Class 2 uveal melanomas. Oncotarget 2016;7(37):59209–19. DOI: 10.18632/oncotarget.10962.
12. Gezgin G., Luk S.J., Cao J. et al. PRAME as a potential target for immunotherapy in metastatic uveal melanoma. JAMA Ophthalmol 2017;135(6):541–9. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2017.0729.
13. Harbour J.W. A prognostic test to predict the risk of metastasis in uveal melanoma based on a 15-gene expression profile. Methods Mol Biol 2014;1102:427–40. DOI: 10.1007/978-1-62703-727-3_22.
14. Cai L., Paez-Escamilla M., Walter S.D. et al. Gene expression profiling and PRAME status versus tumor-node-metastasis staging for prognostication in uveal melanoma. Am J Ophthalmol 2018;195:154–60. DOI: 10.1016/j.ajo.2018.07.045.
15. Schefler A.C., Koca E., Bernicker E.H., Correa Z.M. Relationship between clinical features, GEP class, and PRAME expression in uveal melanoma. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2019;257(7):1541–5. DOI: 10.1007/s00417-019-04335-w.
16. Berkowitz S.T., Brock A.L., Reichstein D.A. An amelanotic choroidal melanoma arising in a young man with tattoo-associated sarcoidosis. Am J Ophthalmol Case Rep 2020;18:100655. DOI: 10.1016/j.ajoc.2020.100655.
17. Финашутина Ю.П., Мисюрин А.В., Ахлынина Т.В. и др. Получение рекомбинантного раково-тестикулярного белка PRAME и моноклональных антител к нему. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(3):29–36. Finashutina Yu.P., Misyurin A.V., Akhlynina T.V. et al. Production of purified human recombinant antigen PRAME and specific monoclonal antibodies. Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal = Russian Journal of Biotherapy. 2015;14(3):29–36. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2015-14-3-29-36.

Вклад авторов
С.В. Саакян: разработка концепции и дизайна исследования, редактирование;
А.Ю. Цыганков: разработка концепции и дизайна исследования, сбор и обработка данных (в том числе статистическая), написание текста статьи;
А.Г. Амирян: сбор и обработка данных, редактирование;
М.Р. Хлгатян: сбор и обработка данных;
Д.А. Хоченков: сбор и обработка данных, написание текста статьи;
В.А. Мисюрин: разработка концепции и дизайна исследования, написание текста статьи.
Autrors' contributions
S.V. Saakyan: development of the research concept and design, article editing;
A.Yu. Tsygankov: development of the research concept and design, obtaining data for analysis, analysis of the obtaining data, statistical data processing, article writing;
A.G. Amiryan: obtaining data for analysis, analysis of the obtaining data, article editing;
M.R. Khlgatyan: obtaining data for analysis, analysis of the obtaining data;
D.A. Khochenkov: obtaining data for analysis, analysis of the obtaining data, article writing;
V.A. Misyurin: development of the research concept and design, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors
С.В. Саакян / S.V. Saakyan: https ://orcid.org /0000-0001-8591-428 X
А.Ю. Цыганков / A.Yu. Tsygankov: https://orcid.org/0000-0001-9475-3545
А.Г. Амирян / A.G. Amiryan: https://orcid.org/0000-0002-9284-4838
М.Р. Хлгатян / M.R. Khlgatyan: https://orcid.org/0000-0001-7266-770X
Д.А. Хоченков / D.A. Khochenkov: https://orcid.org/0000-0002-5694-3492
В.А. Мисюрин / V.A. Misyurin: https://orcid.org/0000-0002-0762-5631

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. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 20.06.2021. **Принята к публикации:** 16.11.2021.
Article submitted: 20.06.2021. **Accepted for publication:** 16.11.2021.

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-67-74

CC BY

Прогностическая значимость комплексной оценки экспрессии Ki-67, фактора некроза опухоли α, CD20 и CD31 при немелкоклеточном раке легкого

О.В. Ковалева, М.А. Рашидова, П.А. Подлесная, Д.В. Самойлова, В.В. Мочальникова, А.Н. Грачев

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

Контакты: Ольга Владимировна Ковалева *ovkovaleva@gmail.com*

Введение. Немелкоклеточный рак легкого является распространенной онкологической патологией, характеризующейся неблагоприятным прогнозом. Сегодня проводится большое количество исследований, посвященных пониманию молекулярных механизмов прогрессии данного заболевания. Современные успехи иммунотерапии значительно улучшили прогноз пациентов с немелкоклеточным раком легкого, однако для контроля над его течением этого пока недостаточно.

Цель исследования – изучение опухолевых (Ki-67, фактор некроза опухоли α (TNF-α)) и стромальных (TNF-α, CD20 и CD31) маркеров немелкоклеточного рака легкого и их прогностической значимости.

Материалы и методы. В исследование были включены образцы опухолей, полученные от 100 больных немелкоклеточным раком легкого. С помощью иммуногистохимического метода проведена оценка экспрессии Ki-67, TNF-α, CD20 и CD31. Анализ выживаемости обсуществляли путем построения кривых дожития по методу Каплана–Майера. Для оценки ассоциации экспрессии исследуемых маркеров с клинико-морфологическими характеристиками использовали критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при p <0,05.

Результаты. Мы провели анализ экспрессии Ki-67, TNF-α, CD20 и CD31 в опухолевых клетках немелкоклеточного рака легкого. Экспрессия Ki-67 обнаруживалась в 99 % исследованных образцов и не наблюдалась в клетках стромы. В опухолевых и стромальных клетках экспрессия TNF-α наблюдалась в 100 % образцов. CD31+-клетки были также обнаружены во всех исследованных образцах, а CD20+-В-клетки присутствовали в 95 % случаев. Экспрессия TNF-α в опухолевых клетках и строме опухоли не ассоциирована с клинико-морфологическими характеристиками. В случае экспрессии CD20 в строме наблюдалась ассоциация с локализацией опухоли (p = 0,0435), со стадией заболевания (p = 0,0044), размером опухоли (p = 0,0017) и наличием регионарных метастазов (p = 0,0071). В случае экспрессии Ki-67 наблюдалась сильная ассоциация с гистологическим типом опухоли (p <0,0001), ее локализацией (p = 0,0012) и наличием регионарных метастазов (p = 0,0020). Анализ прогностической значимости показал, что экспрессия TNF-α в клетках опухолевой стромы является благоприятным прогностическим фактором (отношение рисков (ОР) 0,5547; p = 0,0139), в то время как высокое содержание CD31+-клеток – фактором неблагоприятного прогноза (отношение рисков 2,335; p = 0,0355). Затем мы провели комплексный анализ прогностической значимости комбинации 2 выявленных маркеров. Оказалось, что сочетание TNF-α/строма (высокая экспрессия)+CD31 (низкая экспрессия) является намного более значимым прогностическим фактором, в отличие от индивидуального анализа (отношение рисков 0,1966; p = 0,0048).

Заключение. Проведенное исследование показало, что комплексная, а не индивидуальная оценка прогностической значимости одновременно нескольких маркеров более эффективно отражает их предиктивную способность.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, воспаление, прогноз, фактор некроза опухоли, CD20, CD31

Для цитирования: Ковалева О.В., Рашидова М.А., Подлесная П.А. и др. Прогностическая значимость комплексной оценки экспрессии Ki-67, фактора некроза опухоли α, CD20 и CD31 при немелкоклеточном раке легкого. Успехи молекулярной онкологии. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(4):67–74. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-67-74.

Prognostic value of complex assessment of Ki-67, tumor necrosis factor α, CD20 and CD31 expression in non-small cell lung cancer

O.V. Kovaleva, M.A. Rashidova, P.A. Podlesnaya, D.V. Samoilova, V.V. Mochalnikova, A.N. Gratchev

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

Contacts: Olga Vladimirovna Kovaleva *ovkovaleva@gmail.com*

Introduction. Non-small cell lung cancer is a common cancer with a poor prognosis. Modern researchers conduct many studies devoted to understanding the molecular mechanisms of its pathogenesis. Modern advances in immunotherapy have significantly improved the prognosis of patients with this pathology, but this is still not enough to control the course of the disease.

Objective – to the study of tumor (Ki-67, tumor necrosis factor α (TNF-α)) and stromal (TNF-α, CD20 and CD31) markers in non-small cell lung cancer and their prognostic significance.

Materials and methods. The study included tumor samples obtained from 100 patients with non-small cell lung cancer. The expression of Ki-67, TNF-α, CD20 and CD31 was assessed by immunohistochemistry. Survival analysis was carried out by constructing survival curves using the Kaplan–Meier method. To analyze the association of the expression of studied markers with clinical and morphological characteristics, the Mann–Whitney test was used. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. We analyzed the expression of Ki-67, TNF-α, CD20 and CD31 in non-small cell lung cancer tumors. Ki-67 expression was detected in tumor cells in 99 % of the samples studied and was not observed in stromal cells. In tumor and stromal cells, TNF-α expression was detected in 100 % of the samples. CD31 positive cells were also found in all samples studied, and CD20+B cells were present in 95 % of cases. TNF-α expression in tumor cells and tumor stroma is not associated with clinical and morphological characteristics. For the expression of CD20 in the tumor stroma, there was an association with tumor localization ($p = 0.0435$), with the stage of the disease ($p = 0.0044$), tumor size ($p = 0.0017$), and the presence of regional metastases ($p = 0.0071$). For Ki-67, there was a strong association with the histological type of tumor ($p < 0.0001$), its localization ($p = 0.0012$) and the presence of regional metastases ($p = 0.0020$). The analysis of prognostic significance showed that TNF-α expression in tumor stroma cells is a favorable prognostic factor (hazard ratio 0.5547; $p = 0.0139$), while a high content of CD31+ cells is a factor of poor prognosis (hazard ratio 2.335; $p = 0.0355$). Next, we carried out a comprehensive analysis of the prognostic significance of the two identified markers simultaneously. It turned out that their combination of TNF-α/stroma (high expression)+CD31 (low expression) is a much more significant prognostic factor, in contrast to the individual analysis (hazard ratio 0.1966; $p = 0.0048$).

Conclusion. The study showed that a complex rather than an individual assessment of the predictive value of several markers simultaneously more effectively reflects their predictive ability.

Key words: non-small cell lung cancer, inflammation, prognosis, tumor necrosis factor, CD20, CD31

For citation: Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Podlesnaya P.A. et al. Prognostic value of complex assessment of Ki-67, tumor necrosis factor α, CD20 and CD31 expression in non-small cell lung cancer. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2021;8(4):67–74. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-67-74.

ВВЕДЕНИЕ

В ряде регионов патологией, занимающей 1-е место по встречаемости и смертности, является немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Это одно из самых распространенных, неблагоприятно протекающих (основные мишени метастазирования – кости и мозг) и сложно поддающихся лечению онкологических заболеваний. Как и в случае многих других злокачественных новообразований, к основным проблемам НМРЛ относятся ранняя диагностика и эффективное прогнозирование течения заболевания. Многие пациенты умирают в течение 1 года после постановки диагноза, поскольку в большинстве случаев НМРЛ выявляется уже на поздних стадиях.

В процессе развития заболевания низкие антигенность и гетерогенность опухоли приводят к пассивному избавлению от противоопухолевой иммунной защиты. Известно, что злокачественность первичной опухоли, с одной стороны, обеспечивают опухолевые клетки, а с другой – клетки опухолевой стромы. К основным клеточным популяциям, составляющим опухолевое микроокружение, относятся эндотелиальные и иммунные клетки [1], которые производят различные типы цитокинов и ростовых факторов, влияющих и/или определяющих развитие опухоли. В свою очередь, опухоль также может активно привлекать иммунокомпетентные клетки путем секреции различных хемокинов и цитокинов.

Одним из основных цитокинов, оказывающих влияние на развитие и прогрессию опухоли, является фактор некроза опухоли α (TNF-α). К особенностям данной молекулы относится способность к экспрессии как различными типами иммунных клеток (Т-клеток, В-клеток, макрофагов и NK-клеток (natural killer cell)), так и непосредственно опухолевыми клетками. Несмотря на то, что данный цитокин был описан почти 50 лет назад, анализ его дифференциальной экспрессии в отношении НМРЛ не проводился. Инфильтрация опухоли CD20+-В-клетками является благоприятным прогностическим фактором для изучаемой патологии [2], однако его прогностическая значимость остается противоречивой. Прогностическая значимость CD31 (а для некоторых нозологий и Ki-67) на сегодняшний день также неоднозначна.

Цель исследования – анализ экспрессии Ki-67, TNF-α, CD20 и CD31 и оценка их прогностической и клинической значимости в опухолях НМРЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены образцы тканей 100 пациентов с НМРЛ, которым в Научно-исследовательском институте клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» была выполнена резекция опухоли легкого. Все процедуры, выполненные в ходе исследования, соответствовали стандартам этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Образцы представлены 2 основными гистологическими типами: аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого (больные с мелкоклеточным раком легкого, саркомой и карциноидными новообразованиями были исключены). Для 80 пациентов были собраны данные по выживаемости. Среднее время наблюдения составило 39,0 мес. Весь материал прошел гистологическую верификацию в отделе патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» и был оценен в соответствии с классификацией Tumors, Nodus and Metastasis (TNM) 8-го пересмотра. Детальное описание выборки представлено в табл. 1.

Иммуногистохимия. Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) выполнено по стандартной методике на срезах опухолевой ткани. Для демаскировки антигена использовали Tris-EDTA буфер pH 9.0 («ПраймБиоМед», Москва). Первичные антитела к Ki-67 (клон GM010; «ПраймБиоМед», Москва), CD20 (клон PBM-12F1; «ПраймБиоМед», Москва), CD31 (клон GM006; «ПраймБиоМед», Москва) и TNF-α (клон M1-C4, Sigma, USA) инкубировали в течение 30 мин. Использовали систему детекции UltraVision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Fisher Scientific, USA) согласно инструкциям производителя.

Полученные препараты оценивали с помощью микроскопа Olympus BX53 (×400). Результаты анализа общей экспрессии TNF-α, CD31 и CD20 в строме опухоли и Ki-67 в опухолевых клетках выражали в баллах с учетом количества антигенпозитивных клеток (0 баллов – <1 %; 1 балл – <25 %; 2 балла – 25–50 %; 3 балла – >50 %). Для дальнейшего анализа формировали группы с низкой (0–1 балл) и высокой (2–3 балла) экспрессией.

Во всех исследованных образцах в опухолевых клетках наблюдалась экспрессия TNF-α, поэтому количественный анализ положительно окрашеннных клеток провести не представлялось возможным. Для анализа экспрессии TNF-α в опухолевых клетках оценивали интенсивность окрашивания по шкале от 1 (слабое окрашивание) до 2 (сильное окрашивание) баллов. Примеры окрашивания представлены на рис. 1.

Таблица 1. *Клинико-морфологические характеристики пациентов с немелкоклеточным раком легкого*

Table 1. *Clinical and morphological characteristics of patients with non-small cell lung cancer*

Показатель Parameter	Число случаев, абс. (%) Number of cases, abs. (%)
Гистология: Histology:	
аденокарцинома adenocarcinoma	51 (51)
плоскоклеточный рак squamous cell cancer	49 (49)
Стадия Stage	
I–II	49 (49)
III–IV	51 (51)
Локализация: Localization:	
центральная central	61 (61)
периферическая peripheral	39 (39)
Размер опухоли: Tumor size:	
T1–2	55 (55)
T3–4	45 (45)
Наличие регионарных метастазов Nodal status	
N0	35 (35)
N+	65 (65)
Степень дифференцировки Grade	
G1–2	60 (60)
G3	40 (40)

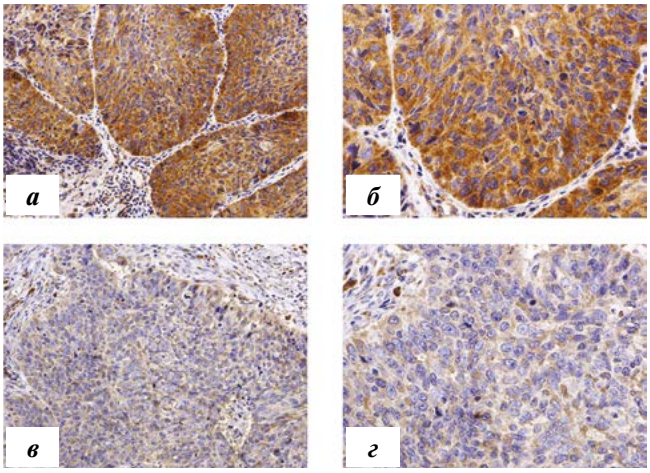
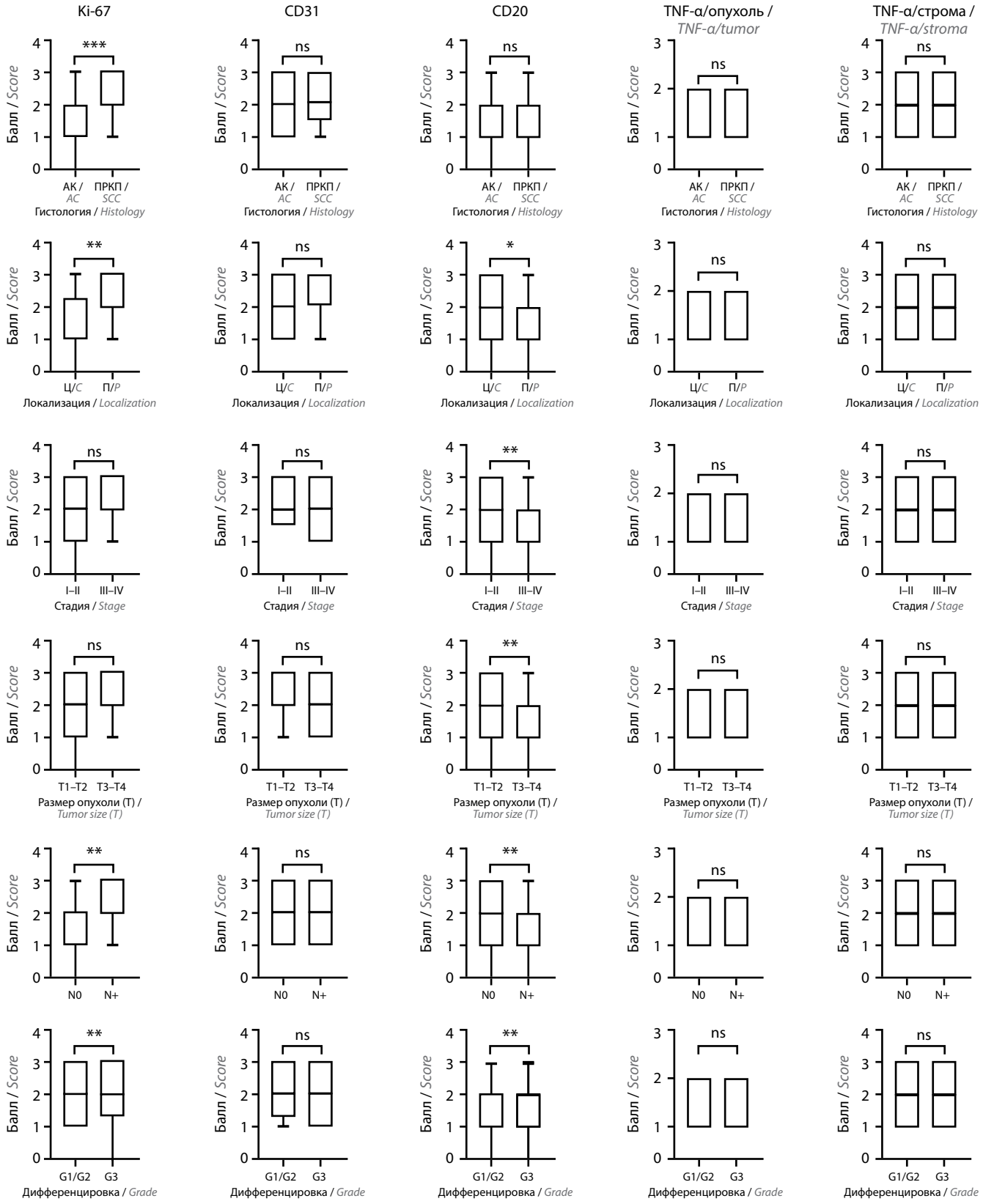


Рис. 1. *Экспрессия фактора некроза опухоли α различной интенсивности в ткани немелкоклеточного рака легкого (иммуногистохимическое окрашивание с антителами к фактору некроза опухоли α): а – выраженная цитоплазматическая и мембранная экспрессия, ×20; б – выраженная цитоплазматическая и мембранная экспрессия, ×40; в – слабая цитоплазматическая и мембранная экспрессия, ×20; г – слабая цитоплазматическая и мембранная экспрессия, ×40*

Fig. 1. *Expression of tumor necrosis factor α of varying intensity in non-small cell lung cancer tissue (immunohistochemical staining with antibodies against tumor necrosis factor α): а – pronounced cytoplasmic and membrane expression, ×20; б – pronounced cytoplasmic and membrane expression, ×40; в – weak cytoplasmic and membrane expression, ×20; г – weak cytoplasmic and membrane expression, ×40*



*p <0,05, **p <0,005, ***p <0,0001, ns – статистически незначимо / *p <0.05, **p <0.005, ***p <0.0001, ns – not statistically significant

Рис. 2. *Анализ ассоциации экспрессии Ki-67, фактора некроза опухоли α, CD20 и CD31 в образцах немелкоклеточного рака легкого и клинико-морфологических характеристик. N0/N+ – отсутствие/наличие регионарных метастазов; TNF-α – фактор некроза опухоли α; АК – аденокарцинома; ПКРЛ – плоскоклеточный рак легкого; Ц – центральное расположение; П – периферическое расположение*

Fig. 2. *Analysis of the association of Ki-67, tumor necrosis factor α, CD20 and CD31 expression in non-small cell lung cancer samples and clinical and morphological characteristics. N0/N+ – nodal status; TNF-α – tumor necrosis factor α; AC – adenocarcinoma; SCC – squamous cell lung cancer; C – central localization; P – peripheral localization*

Статистический анализ. Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программы GraphPad Prizm v. 9. При сравнении показателей и оценке их взаимосвязей применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Анализ выживаемости проводили путем построения кривых дожития по методу Каплана–Майера. Сравнение достоверности различий выполняли при помощи логарифмического рангового критерия. Различия считали статистически значимыми при $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия Ki-67, CD20, CD31 и TNF-α в опухолях легкого. Мы провели анализ экспрессии Ki-67, CD20, CD31 и TNF-α в опухолях НМРЛ. Экспрессия Ki-67 обнаруживалась в опухолевых клетках в 99 % исследованных образцов и не наблюдалась в клетках стромы. Также мы показали, что при НМРЛ TNF-α экспрессируется как в стромальных, так и в опухолевых клетках (рис. 1). В опухолевых клетках экспрессия TNF-α обнаруживалась в 100 % образцов. В стромальных клетках TNF-α экспрессировался также во всех исследованных случаях. CD31+-клетки были обнаружены в различном количестве во всех исследованных образцах. CD20+-В-клетки присутствовали в строме опухолей легкого в 95 % случаев.

Далее мы провели анализ ассоциации экспрессии исследуемых маркеров с клинико-морфологическими характеристиками. Результаты представлены на рис. 2.

Согласно представленным результатам для экспрессии TNF-α в опухолевых клетках и строме опухоли не наблюдалось ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками. Экспрессия CD20 в строме опухоли ассоциирована с локализацией опухоли ($p = 0{,}0435$), со стадией заболевания (p = 0,0044), размером опухоли ($p = 0{,}0017$) и наличием регионарных метастазов ($p = 0{,}0071$). На более ранних стадиях при меньшем размере опухоли и отсутствии метастазов в лимфатических узлах наблюдалось более высокое содержание CD20+-В-клеток в опухолевой строме. Для Ki-67 характерна сильная ассоциация с гистологическим типом опухоли ($p < 0{,}0001$), ее локализацией ($p = 0{,}0012$) и наличием регионарных метастазов ($p = 0{,}0020$).

Прогностическая значимость Ki-67, CD20, CD31 и TNF-α в опухолях легкого. Для определения прогностической значимости экспрессии Ki-67, CD20, CD31 и TNF-α в опухолях легкого для пациентов с НМРЛ мы проанализировали выживаемость путем построения кривых дожития по методу Каплана–Майера и сравнили достоверность различий при помощи логарифмического рангового критерия. Результаты представлены на рис. 3.

Согласно данным, представленным на рис. 3, экспрессия TNF-α в клетках опухолевой стромы является благоприятным прогностическим фактором НМРЛ. В отношении Ki-67 и TNF-α в опухолевых клетках и CD20 в строме прогностической значимости не наблюдается. Высокая экспрессия CD31 в строме опухоли легкого

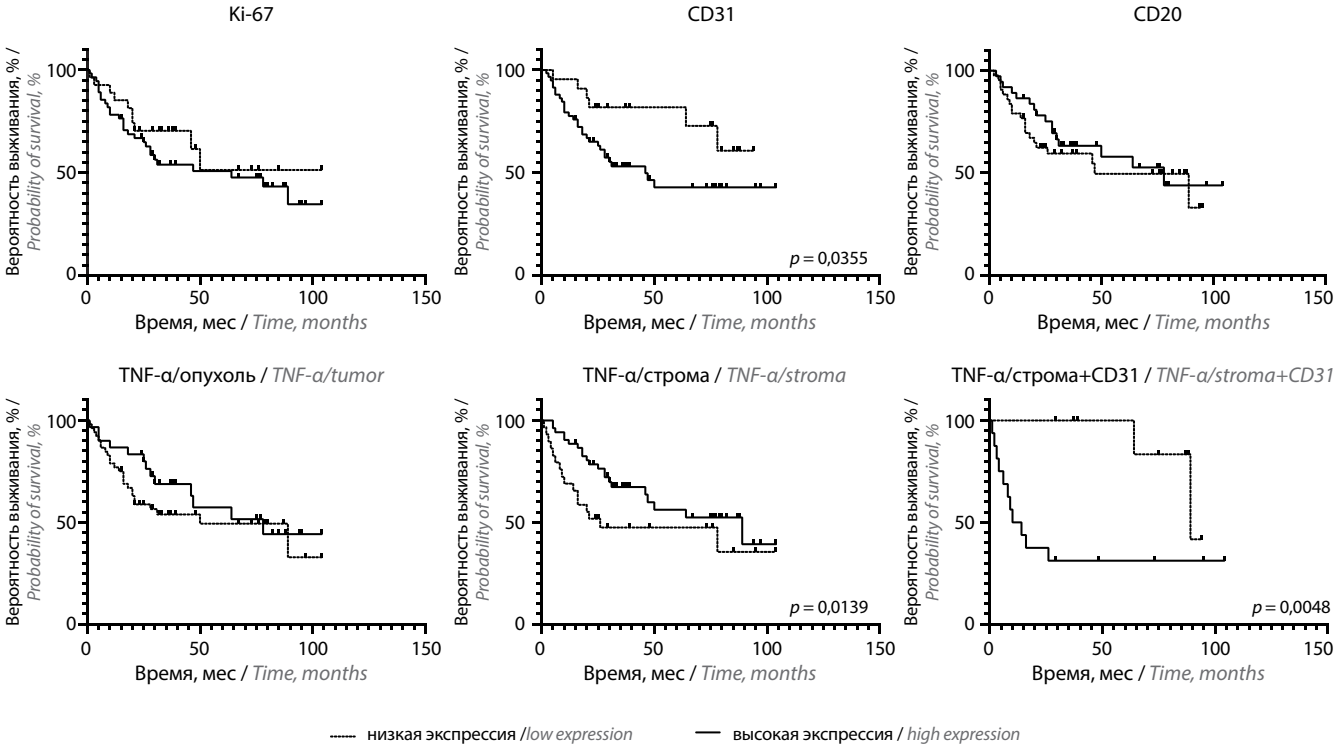


Рис. 3. *Прогностическая значимость Ki-67, фактора некроза опухоли α, CD20 и CD31 при немелкоклеточном раке легкого*
Fig. 3. *Prognostic significance of Ki-67, tumor necrosis factor α, CD20 and CD31 in non-small cell lung cancer*

Таблица 2. *Статистический анализ прогностической значимости Ki-67, фактора некроза опухоли α, CD20 и CD31*
Table 2. *Statistical analysis of prognostic significance Ki-67, tumor necrosis factor α, CD20 and CD31*

Показатель Parameter	Однофакторный анализ Univariate analysis		
	Отношение рисков Hazard ratio	95 % доверительный интервал 95 % confidence interval	*p*
Ki-67 (высокая экспрессия/низкая экспрессия) Ki-67 (high expression/low expression)	1,400	(0,713–2,748)	0,3238
CD31 (высокая экспрессия/низкая экспрессия) CD31 (high expression/low expression)	2,335	(1,151–4,734)	0,0355*
CD20 (высокая экспрессия/низкая экспрессия) CD20 (high expression/low expression)	0,791	(0,411–1,520)	0,3020
TNF-α/опухоль (высокая экспрессия/низкая экспрессия) TNF-α tumor (high expression/low expression)	0,723	(0,378–1,393)	0,1752
TNF-α/строма (высокая экспрессия/низкая экспрессия) TNF-α/stroma (high expression/low expression)	0,555	(0,274–1,123)	0,0139*
TNF-α/строма+CD31 (высокая экспрессия/низкая экспрессия) TNF-α/stroma+CD31 (high expression/low expression)	0,197	(0,066–0,583)	0,0048*

**Статистически значимо.*
Примечание. *TNF-α – фактор некроза опухоли α.*
**Statistically significant.*
Note. *TNF-α – tumor necrosis factor α.*

является фактором неблагоприятного прогноза. Статистический анализ прогностической значимости исследованных маркеров представлен в табл. 2.

Таким образом, высокое содержание CD31+-клеток в опухолевой строме является неблагоприятным прогностическим фактором, в то время как экспрессия TNF-α в этих клетках служит показателем хорошего прогноза НМРЛ. Затем мы провели анализ прогностической значимости комбинации 2 выявленных маркеров. Оказалось, что их сочетание TNF-α/строма (высокий)+CD31 (низкий) является намного более значимым прогностическим фактором, чем каждый из этих маркеров в отдельности.

ОБСУЖДЕНИЕ

Злокачественность первичной опухоли может быть обусловлена большим количеством факторов. С одной стороны, на прогрессию заболевания влияют определенные особенности непосредственно опухолевых клеток (такие как повышенная способность к пролиферации, отсутствие контактного торможения и др.). С другой стороны, сильное влияние на распространение опухолевого процесса оказывает микроокружение опухоли. Так, повышенное содержание эндотелиальных клеток способствует неоангиогенезу, иммуносупрессорных клеток – уходу от иммунологического надзора, макрофагов, ассоциированных с опухолью, – подавлению нормальной воспалительной реакции. В данном исследовании проведен анализ прогностической значимости как маркеров опухолевых клеток (Ki-67, TNF-α), так и некоторых маркеров стромальных клеток (CD20, CD31 и TNF-α).

Ki-67 экспрессируется в пролиферирующих клетках и традиционно используется в клинической практике для оценки пролиферативной активности клеток опухолей различных нозологий. Несмотря на, казалось бы, очевидную связь экспрессии данного белка с неблагоприятным прогнозом, его прогностическая значимость продолжает оставаться предметом дискуссий. Немелкоклеточному раку легких посвящено несколько исследований. В некоторых из них продемонстрирована ассоциация его экспрессии с прогнозом, в то время как в других такой закономерности не обнаружено. Возможно, это связано с отсутствием стандартного порога оценки, и исследователи используют различные критерии для формирования групп сравнения с низкой и высокой экспрессией [3]. Наше исследование показало, что экспрессия Ki-67 в опухолевых клетках НМРЛ достоверно ассоциирована с гистологическим типом опухоли и наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах. Более высокое содержание Ki-67+-клеток встречается при плоскоклеточном варианте опухолей и наличии регионарных метастазов. Однако анализ выживаемости не выявил прогностической значимости Ki-67 в опухолях НМРЛ как в целом, так и по каждой гистологической группе (данные не представлены), что согласуется с некоторыми опубликованными данными [4].

Еще одной основополагающей особенностью процесса канцерогенеза является способность клеток опухоли и ее микроокружения к модулированию процесса ангиогенеза. CD31 (PECAM-1) – трансмембранный гликопротеин, являющийся маркером эндотелиальных клеток и участвующий в миграции лейкоцитов в воспалительный очаг (осуществляющий регуляцию проницаемости и целостности капилляров) [5]. Его экспрессия наблюдается во многих видах опухолей, таких как гепатоцеллюлярная карцинома [6, 7], рак почки [8], легкого [9], колоректальный рак [10], рак яичников [11] и др. Мы показали, что содержание CD31+-клеток в опухоли не ассоциировано с клинико-морфологическими характеристиками, однако является неблагоприятным прогностическим фактором НМРЛ. Полученные данные согласуются с тем, что повышенная васкуляризация опухоли часто свидетельствует о ее прогрессировании и плохом прогнозе заболевания. Для некоторых других типов опухолей, например для колоректального рака, показано, что экспрессия CD31 коррелирует с низким показателем выживаемости [10]. Эти данные согласуются с результатами другого исследования [12]. Однако также имеются сведения об отсутствии прогностической значимости CD31 на примере рака яичников [11]. Кроме того, исследования показывают, что высокий уровень CD31 в опухоли коррелирует с большим ее размером [10, 13], высокими показателями злокачественности [10, 14] и более поздней стадией заболевания [10]. Неоднозначные данные имеются по поводу связи экспрессии CD31 и метастатического статуса опухолей (наличие метастазов в регионарные лимфатические узлы [13] или отдаленных метастазов при отсутствии регионарных метастазов [10]). Однако согласно результатам ряда исследований высокий уровень экспрессии CD31 в образцах рака почки коррелирует с лучшими показателями общей выживаемости [8].

Известно, что риск развития онкологических заболеваний часто ассоциирован с хроническим воспалением [15–17]. Одним из первых цитокинов, описанных как важнейший воспалительный медиатор опухолевых клеток, является TNF-α – ключевой хемокин воспаления, участвующий в активации клеточной пролиферации, дифференцировке и апоптозе. Основными источниками этого цитокина являются макрофаги и Т-клетки, а также NK-клетки и нейтрофилы. Связывание TNF-α с рецепторами приводит либо к индукции апоптоза, опосредованного активацией каспаз, либо к развитию воспаления, обусловленного запуском антиапоптотических путей и повышением экспрессии провоспалительных цитокинов, основными драйверами которых становятся активированные NF-kB, AP-1 и MAP-киназный каскад. Такие полярные биологические эффекты TNF-α опосредуют его противоречивое значение в канцерогенезе.

Также необходимо отметить, что многие опухолевые клетки сами начинают экспрессировать TNF-α. Его экспрессия описана для рака яичников, молочной железы, эндометрия, желудка, поджелудочной железы, печени, предстательной железы, мочевого пузыря, колоректального рака и др.[18]. При оценке экспрессии данного белка необходимо учитывать тип клеток, которые его производят. Мы провели анализ экспрессии TNF-α в образцах НМРЛ и показали, что во всех исследованных случаях его экспрессию можно было обнаружить в опухолевых клетках. Помимо этого, его экспрессия была выявлена в строме всех исследованных опухолей. Мы оценили ассоциацию экспрессии TNF-α с клинико-морфологическими параметрами и его прогностическую значимость. Ни для стромальной, ни для опухолевой экспрессии TNF-α ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками опухоли выявлено не было. При оценке прогностической значимости оказалось, что экспрессия данного белка в опухолевых клетках не является прогностически значимой. Однако анализ экспрессии TNF-α в стромальных клетках показал, что он может быть маркером благоприятного прогноза при НМРЛ. Опубликовано крайне мало исследований, посвященных данной проблеме. Поиск прогностически значимых молекул для НМРЛ продолжает оставаться актуальной научной задачей.

Поскольку одной из клеточных популяций, продуцирующих TNF-α, являются В-клетки, на следующем этапе исследования мы оценили прогностическую значимость их количества в опухолевой строме. Было выявлено, что для экспрессии CD20 в строме опухоли наблюдалась ассоциация с локализацией опухоли ($p = 0{,}0435$), ее размером ($p = 0{,}0017$), стадией заболевания ($p = 0{,}0044$) и наличием регионарных метастазов ($p = 0{,}0071$). На более ранних стадиях при меньшем объеме опухоли и отсутствии метастазов в лимфатических узлах обнаружено более высокое содержание CD20+-В-клеток в опухолевой строме. Это свидетельствует о том, что содержание В-клеток ассоциировано с более благоприятными клиническими характеристиками. Однако при оценке прогностической значимости оказалось, что содержание В-клеток в опухолевой строме не коррелирует с прогнозом заболевания.

На последнем этапе работы мы провели комплексный анализ прогностической значимости стромальной экспрессии TNF-α и CD31, так как именно эти маркеры по отдельности продемонстрировали прогностическую значимость. Оказалось, что их сочетание, а именно высокое содержание TNF-α+-клеток в строме опухоли и низкое содержание CD31+-клеток является намного более значимым прогностическим фактором (отношение рисков 0,1966), чем данные маркеры по отдельности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что для более точной оценки прогноза заболевания необходимо учитывать комплекс маркеров, индивидуально подобранный под определенный тип опухоли. Именно такие анализы в перспективе могут быть мощным инструментом в арсенале клинических онкологов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Li H., Fan X., Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. J Cell Biochem 2007;101(4):805–15. DOI: 10.1002/jcb.21159.
2. Al-Shibli K.I., Donnem T., Al-Saad S. et al. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2008;14(16):5220–7. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0133.
3. Jakobsen J.N., Sorensen J.B. Clinical impact of Ki-67 labeling index in non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2013;79(1):1–7. DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.10.008.
4. Yoo J., Jung J.H., Lee M.A. et al. Immunohistochemical analysis of non-small cell lung cancer: correlation with clinical parameters and prognosis. Journal of Korean medical science 2007;22(2):318–25. DOI: 10.3346/jkms.2007.22.2.318.
5. Lertkiatmongkol P., Liao D., Mei H. et al. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). Curr Opin Hematol 2016;23(3):253–9. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000239.
6. Qian H., Yang L., Zhao W. et al. A comparison of CD105 and CD31 expression in tumor vessels of hepatocellular carcinoma by tissue microarray and flow cytometry. Exp Ther Med 2018;16(4):2881–8. DOI: 10.3892/etm.2018.6553.
7. Bosmuller H., Pfefferle V., Bittar Z. et al. Microvessel density and angiogenesis in primary hepatic malignancies: differential expression of CD31 and VEGFR-2 in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. Pathol Res Pract 2018;214(8):1136–41. DOI: 10.1016/j.prp.2018.06.011.
8. Virman J., Bono P., Luukkaala T. et al. VEGFR3 and CD31 as prognostic factors in renal cell cancer. Anticancer Res 2015;35(2):921–7.
9. Emmert A.O., Oellerich A., Füzesi L. et al. Waldmann-Beushausen R. et al. Prognostic significance of CD31 Expression in patients with non-small-cell-lung cancer. Advances Lung Cancer 2016;5(3):21–9. DOI: 10.4236/alc.2016.53003.
10. Mohamed S.Y., Mohammed H.L., Ibrahim H.M. et al. Role of VEGF, CD105, and CD31 in the prognosis of colorectal cancer cases. J Gastrointest Cancer 2019;50(1):23–34. DOI: 10.1007/s12029-017-0014-y.
11. Rask L., Hogdall C.K., Kjaer S.K. et al. Association of CD31 and p53 with survival of ovarian cancer patients. Anticancer Res 2019;39(2):567–76. DOI: 10.21873/anticanres.13149.
12. Gulubova M., Vlaykova T. Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer. J Gastroenterol Hepatol 2009;24(7):1265–75. DOI: 0.1111/j.1440-1746.2007.05009.x.
13. Saad R.S., Liu Y.L., Nathan G. et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. Mod Pathol 2004;17(2):197–203. DOI: 10.1038/modpathol.3800034.
14. Cammarota R., Bertolini V., Pennesi G. et al. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. J Transl Med 2010;8:112. DOI: 10.1186/1479-5876-8-112.
15. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer. Nature 2002;420(6917):860–7. DOI: 10.1038/nature01322.
16. Furman D., Campisi J., Verdin E. et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. Nat Med 2019;25(12):1822–32. DOI: 10.1038/s41591-019-0675-0.
17. Taniguchi K., Karin M. NF-kB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. Nat Rev Immunol 2018;18(5):309–24. DOI: 10.1038/nri.2017.142.
18. Mercogliano M.F., Bruni S., Elizalde P.V., Schillaci R. Tumor necrosis factor alpha blockade: an opportunity to tackle breast cancer. Front Oncol 2020;10:584. DOI: 10.3389/fonc.2020.00584.

Вклад авторов
О.В. Ковалева: анализ литературных данных, статистическая обработка данных, написание текста статьи;
М.А. Рашидова, П.А. Подлесная, Д.В. Самойлова: получение экспериментальных данных;
В.В. Мочальникова: сбор материала для исследования, получение экспериментальных данных;
А.Н. Грачев: разработка концепции исследования, написание текста статьи.
Autrors' contributions
O.V. Kovaleva: analysis of literary data, statistical data processing, article writing;
M.A. Rashidova, P.A. Podlesnaya, D.V Samoilova: obtaining experimental data;
V.V Mochalnikova: collecting material for research, obtaining experimental data;
A.N. Gratchev: development of the research concept, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors
О.В. Ковалева / O.V. Kovaleva: https://orcid.org/0000-0001-6132-9924
М.А. Рашидова / M.A. Rashidova: https://orcid.org/0000-0002-3267-4232
Д.В. Самойлова / D.V Samoilova: https://orcid.org/0000-0001-5639-0835
П.А. Подлесная / P.A. Podlesnaya: https://orcid.org/0000-0003-2312-5546
В.В. Мочальникова / V.V Mochalnikova: https://orcid.org/0000-0001-5275-7134
А.Н. Грачев / A.N. Gratchev: https://orcid.org/0000-0003-2137-1866

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

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-09069).
Financing. The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 18-29-09069).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 26.08.2021. **Принята к публикации:** 16.11.2021.
Article submitted: 26.08.2021. **Accepted for publication:** 16.11.2021.

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-75-83

CC BY

Изучение действия куркумина на эксцизионную репарацию ДНК в клетках U251 мультиформной глиобластомы

Т.И. Кушнир[1], Н.Е. Арноцкая[1], И.А. Кудрявцев[1], А.А.Митрофанов[1], А.Х. Бекяшев[1], В.Г. Згода[2], В.Е. Шевченко[1]

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

[2]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»; Россия, 119121 Москва, Погодинская ул., 10, стр. 8

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко *vshev2015@yandex.ru*

Введение. В значительной степени резистентность мультиформной глиобластомы к генотоксической терапии связана с нарушением регуляции реакций на повреждение и репарацию ДНК. Таким образом, подавление механизмов репарации ДНК – приоритетный путь для увеличения выживаемости больных с данной патологией. Куркумин повышает эффективность стандартных химиотерапевтических препаратов, однако его воздействие на системы репарации ДНК недостаточно изучено.

Цель исследования – изучение молекулярных механизмов действия куркумина на эксцизионную репарацию ДНК в клетках U251 мультиформной глиобластомы.

Материалы и методы. Протеомная масс-спектрометрия высокого разрешения, клеточные технологии.

Результаты. В протеомах 2 типов клеток мультиформной глиобластомы (контроля и опыта) в целом идентифицированы 2757 белков, из которых 39 % были дифференциально экспрессированными. Обнаружены значительные изменения во многих сигнальных каскадах, играющих большую роль в канцерогенезе.

Заключение. Куркумин супрессирует эксцизионную репарацию ДНК, снижая экспрессию детерминант APEX1, MSH6, PARP1. PCNA, POLD1, POLE3, RFC2 и RPA.

Ключевые слова: мультиформная глиобластома, куркумин, протеом, эксцизионная репарация ДНК, масс-спектрометрия

Для цитирования: Кушнир Т.И., Арноцкая Н.Е., Кудрявцев И.А. и др. Изучение действия куркумина на эксцизионную репарацию ДНК в клетках U251 мультиформной глиобластомы. Успехи молекулярной онкологии. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(4):75–83. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-75-83.

Study of the effect of curcumin on excision DNA repair in U251 glioblastoma multiforme cells

T.I. Kushnir[1], N.E. Arnotskaya[1], I.A. Kudryavtsev[1], A. A. Mitrofanov[1], A.K. Bekyashev[1], V.G. Zgoda[2], V.E. Shevchenko[1]

[1]N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; Bld. 15, 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

[2]V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, 10 Bld. 8, Pogodinskaya St., Moscow 119121, Russia

Contacts: Valeriy Evgenievich Shevchenko *vshev2015@yandex.ru*

Introduction. To a large extent, the resistance of glioblastoma multiforme to genotoxic therapy is associated with a dysregulation of responses to DNA damage and repair. Thus, suppression of DNA repair mechanisms is a priority pathway for increasing the survival rate of glioblastoma multiforme patients. Curcumin enhances the effectiveness of standard chemotherapy drugs, but its effect on DNA repair systems is not well understood.

The study objective – to study the molecular mechanisms of curcumin action on excisional DNA repair in U251 glioblastoma multiforme cells.

Materials and methods. high-resolution proteomic mass spectrometry, cell technologies.

Results. In the proteomes of two types of glioblastoma multiforme cells (control and experiment), a total of 2757 proteins were identified, of which 39 % were differentially expressed. Significant changes have been found in many signaling cascades that play an important role in carcinogenesis.

Conclusion. Curcumin suppressed excisional DNA repair by decreasing the expression of determinants APEX1, MSH6, PARP1. PCNA, POLD1, POLE3, RFC2, RPA.

Key words: curcumin, glioblastoma multiforme, curcumin, proteome, excision DNA repair, mass spectrometry

For citation: Kushnir T.I., Arnotskaya N.E., Kudryavtsev I.A. et al. Study of the effect of curcumin on excision DNA repair in U251 glioblastoma multiforme cells. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2021;8(4):75–83. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-75-83.

ВВЕДЕНИЕ

Мультиформная глиобластома (МГБ) является наиболее распространенной первичной высокоинвазивной глиальной опухолью головного мозга человека [1]. При выполнении стандартного протокола комплексного лечения данного заболевания медиана выживаемости больных составляет 12–15 мес. Отчасти это объясняется тем, что МГБ имеет высокую степень внутриопухолевой гетерогенности как на клеточном, так и на генетическом уровне, что является препятствием для преодоления резистентности к лечению. К сожалению, таргетная терапия в этом случае неэффективна [2]. Методами лечения, улучшающими выживаемость при МГБ, по-прежнему остаются радикальное удаление опухоли, лучевая терапия (ЛТ) и химиотерапия (ХТ) с использованием темозоломида или его комбинации с другими препаратами [3].

Одно из перспективных направлений повышения эффективности нехирургических методов лечения онкологических больных – разработка методов повышения чувствительности опухолевых клеток к ЛТ и ХТ, которые базируются на использовании дефектов в системе репарации для достижения наиболее результативного противоопухолевого эффекта.

Устранение повреждений нативной ДНК требует согласованных действий ряда генов репарации для поддержания целостности генома, включая восстановление двунитевых разрывов ДНК, эксцизионную репарацию (ЭР) и прямую репарацию повреждений. Эксцизионная репарация – сложный, многоэтапный процесс. Известны три типа ЭР: неспаренных оснований (mismatch repair, MMR), оснований (base excision repair, BER) и нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER). Все типы ЭР имеют общие этапы действия, но принципиально различаются между собой [4].

Под воздействием ЛТ и ХТ в клетках МГБ происходит повреждение генома, активирующее различные механизмы репарации ДНК [5]. Полиморфизм молекулярно-генетических нарушений в клетках МГБ в ответ на генотоксическую терапию порождает разновекторный отклик на повреждение ДНК (ОПД), что является одним из механизмов формирования резистентности к лечению. Лучшее понимание механизмов, регулирующих ОПД при МГБ, поможет прояснить роль основных детерминант ОПД в ответе на ХТ и ЛТ и способствовать разработке персонифицированного метода лечения данной патологии на основе ингибиторов ОПД [6].

В последние десятилетия активно изучают природные соединения и их производные для усиления эффективности ЛТ и ХТ злокачественных новообразований [7]. Куркумин (ККМ) и другие куркуминоиды представляют собой природные полифенольные соединения (рис. 1), выделенные из куркумы (*Curcuma longa*). Доклинические и клинические исследования продемонстрировали химиотерапевтический потенциал ККМ при различных видах рака [8, 9]. Куркумин воздействует на канцерогенные сигнальные пути, связанные с клеточной пролиферацией, апоптозом, аутофагией, ангиогенезом, иммунным ответом, инвазией и метастазированием через факторы транскрипции, рецепторы, киназы, цитокины, ферменты и факторы роста [10]. Куркумин модулирует различные сигнальные каскады, которые обычно дисрегулируемы при МГБ, включая Hedgehog [11], STAT3 [12], PI3K/AKT/mTOR [13], P53 [14] и другие, однако его действие на процессы репарации ДНК изучены недостаточно. Тем не менее, способность ККМ повышать эффективность стандартных ХТ-препаратов оправдывает его использование в качестве потенциального адъюванта на основе нутрицевтиков для лечения МГБ. Хотя такие проблемы, как биодоступность, плохая абсорбция и быстрое системное выведение, могут снизить его эффективность, мультимодальная модуляция сигнальных путей при нанодоставке ККМ имеет большие перспективы в терапии МГБ.

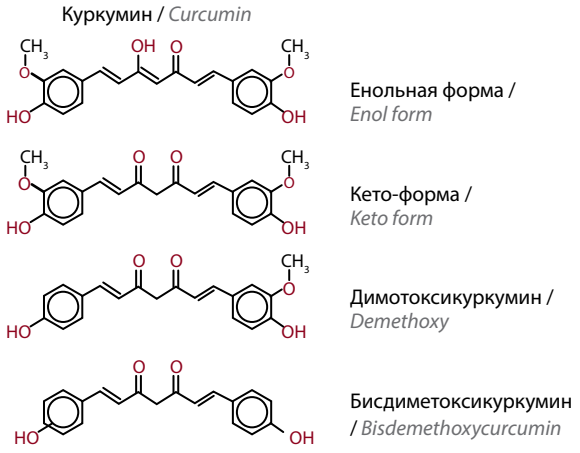


Рис. 1. *Структура енольной формы и кето-формы куркумина, диметоксикуркумина и бисдиметоксикуркумина*

Fig. 1. *The structure of the enol form and the keto form of curcumin, dimethoxycurcumin and bisdimethoxycurcumin*

В этом исследовании основное внимание уделялось изучению молекулярных механизмов действия ККМ на ЭР, от которых во многом зависит эффект темозоломида, в том числе резистентность к этому препарату. Мы использовали методы протеомной масс-спектрометрии для изучения действия ККМ на линию клеток U251 МГБ человека. Куркумин оказывал существенное влияние на протеом клеток U251 МГБ. Так, из 2757 идентифицированных протеинов 39 % составляли дифференциально экспрессированные белки (ДЭБ). Обнаружены значительные изменения во многих сигнальных каскадах, играющих важную роль в канцерогенезе. В частности, под действием ККМ в клетках U251 наблюдалась супрессия репарации ДНК, на что указывало уменьшение экспрессии более чем в 2 раза детерминант сигналингов, ответственных за ЭР ДНК (APEX1, MSH6, PARP1, PCNA, POLD1, POLE3, RFC2, RPA2). Полученные данные могут использоваться в дальнейшем при разработке терапевтических схем с участием ККМ для лечения МГБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. Клетки линии U251 МГБ человека культивировали при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5 % CO_2 в среде DMEM/F12 (Gibco, Life Technologies, Россия) [15]. При достижении 70 % монослоя опухолевые клетки двукратно отмывали бессывороточной средой и культивировали в ней в течение 24 ч при 37 °C без и в присутствии 10 мкМ ККМ (Sigma Aldrich, США). Куркумин растворяли в DMSO и добавляли к клеткам, а 0,1 %-ный раствор DMSO использовали в качестве контроля. Опытные и контрольные клетки выращивали в 3 экземплярах, независимо обрабатывали и анализировали. После инкубации опухолевые клетки 3 раза отмывали фосфатно-буферным раствором на центрифуге BIOSAN LMC-3000 (Biosan Ltd, Латвия) со скоростью 1500 об/мин в течение 10 мин и замораживали при –80 °C.

Приготовление образцов для масс-спектрометрии. Размороженные клетки U251 лизировали на шейкере Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf, Германия) 15 мин при 4 °C с помощью Mammalian Cell Lysis Kit (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с рекомендациями производителя, центрифугировали на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf, Германия) в течение 10 мин при 12000 об/мин и 4 °C. Надосадочную жидкость подвергали ультрафильтрации для удаления низкомолекулярных соединений [16]. После трипсинолиза белков образцы упаривали при 30 °C в центрифужном концентраторе Labconco CentriVap (Labconco Corporation, США). Продукты трипсинолиза лизатов опухолевых клеток (100 мкг) растворяли в 50 мкл фазы А (20 мМ NH_4OH, pH 10) и фракционировали на колонке Zorbax 300 Extend-C18 (2,1 × 500 мм; 3,5 мкм, Agilent) на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1100 (Agilent, США), оборудованном коллектором фракций и ультрафиолетовым детектором [15]. Фракции упаривали досуха при 30 °C в центрифужном испарителе Labconco CentriVap (Labconco Corporation, США) и повторно растворяли в 100 мкл 0,1 %-ной муравьиной кислоты для масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрический анализ. Хроматомасс-спектрометрический анализ проводили для каждой пробы в 3 технических повторах с помощью масс-спектрометра Q Exactive HF-X (Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-OrbitrapTM Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific, США) [17]. Масс-спектрометрические данные загружали в программное обеспечение MaxQuant 1.6.17.0 (Biochemistry Computational Systems, Biochemistry Max Planck, Martinsried, Германия). Для идентификации белков использовали встроенный в программное обеспечение MaxQuant поисковый алгоритм Andromeda и базу данных UniprotKB (http://www.uniprot.org/) [17]. Количественный анализ осуществляли на основании площади под пиком родительского иона с вычислением величины LFQ с помощью встроенного в MaxQuant алгоритма [18]. Статистический анализ выполняли в программном обеспечении Perseus 1.6.0.7 (Max Planck Institute of Biochemistry, Германия).

Биоинформатический анализ. Биоинформатический анализ проводили с помощью программ DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; https://david.ncifcrf.gov), PANTHER (http://www.pantherdb.org/), а также открытых баз данных Swiss-Prot (www.uniprot.org/uniprot), Gene Ontology (GO, geneontology.org), PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) и KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (www.genome.jp/kegg), белок-белковые взаимодействия анализировали с помощью базы данных STRING v11.0 (https://string-db.org) с комбинированным скором >0,4.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Масс-спектрометрический анализ. Мы использовали label-free (без метки) количественный протеомный нано-ВЭЖХ–МС/МС метод для детектирования и сравнения белкового профиля в лизатах линии клеток U251 МГБ без обработки их куркумином (10 мкМ) и после нее. Анализ триптических пептидов, проведенный с помощью программы MaxQuant, идентифицировал в общей сложности 2757 белков при сопоставлении 155329 МС/МС спектров с пептидными последовательностями в базе данных UniProtKB_2021 с ложным уровнем обнаружения (FDR) 1 % для тройных повторов 2 видов образцов. В результате обработки данных в исследуемых образцах с использованием программы Perseus были идентифицированы:

— в 1-м образце (U251) – 2553 белка по 13 497 пептидам;

— во 2-м образце (U251+ККМ) – 2421 белок по 13 313 пептидам.

По 2 или более пептидным совпадениям идентифицированы 2194 протеина, по 1 пептидному совпа-

дению – 563 протеина. Из них 1080 белков были дифференциально экспрессированными, присутствовали во всех образцах клеток и имели статистически значимые изменения экспрессии в клеточной линии U251 ($p < 0,05$) по сравнению с U251 + ККМ с кратностью изменения >2 или <0,5. Экспрессия 662 белков повышалась, а экспрессия 418 белков снижалась в клетках U251 по сравнению с клетками U251, обработанных куркумином.

Распределение и онтологический анализ дифференциально экспрессированных белков. Анализ GO показал, что ДЭБ присутствовали во многих категориях субклеточных локализаций, включая цитоплазму (16 %), клеточную мембрану (12 %), митохондрии (12 %), ядро (7 %) и цитоскелет (7 %). Дифференциально экспрессированные белки оказались вовлеченными в различные биологические процессы и проявляли следующие функции: связывающую (46,0 %), каталитическую (33,2 %), молекулярно-регуляторную (8,0 %), транспортную активность (4,7 %), структурно-молекулярную активность (4,4 %).

Основная часть ДЭБ представлена метаболическими ферментами (16 %), протеинмодифицирующими энзимами (14,6 %), протеинами метаболизма нуклеиновых кислот (11,8 %), цитоскелетными белками (9,3 %), трансляционными протеинами (8,1 %), транспортерами (7,4 %), модуляторами протеинсвязывающей активности (5,8 %), протеинами мембранного трафика (5,4 %).

Дифференциально экспрессированные белки принимали участие более чем в 100 сигнальных каскадах. Далее представлены наиболее значимые сигнальные пути. Согласно данным, представленным в табл. 1, ДЭБ в основном включены в сигнальные каскады, связанные с процессом развития МГБ.

С помощью сервиса DAVID получена группа генов, продукты которых участвуют в сигнальных каскадах, связанных с репарацией ДНК (табл. 2). Согласно представленным данным 8 генов кодируют белки, участвующие в ЭР ДНК [19].

ОБСУЖДЕНИЕ

В значительной степени резистентность опухолевых клеток к ЛТ и ХТ связана с нарушением регуляции реакции на повреждение и репарацию ДНК. Эти компенсаторные механизмы могут приводить к повышению устойчивости данных клеток к ДНК-повреждающим агентам, влияя на клеточный ответ и результаты генотоксической терапии [20]. Таким образом, подавление механизмов репарации ДНК – приоритетный путь для увеличения выживаемости больных МГБ. Арсенал ингибиторов репарации ДНК пока невелик [21], что связано с их чрезмерной токсичностью в эффективных дозах и/или резистентностью к терапии через компенсаторные пути, которые ограничивают их эффективность. В этом отношении ККМ имеет ряд преимуществ: низкую токсичность и многофакторное действие. Кроме того, он может эффективно подавлять множественную лекарственную устойчивость опухоли и улучшать терапевтический эффект ХТ-препаратов [22].

Противоопухолевый эффект ККМ отмечен для различных типов злокачественных новообразований, включая МГБ [23]. Куркумин действует одновременно на несколько молекулярных мишеней, поэтому его воздействие на опухоль связано с разными сигнальными каскадами [24]. Полученные нами данные подтверждают этот тезис. Куркумин модулировал в клетках U251 важнейшие сигналинги, связанные с патогенезом МГБ, включая сигнальный каскад интегринов, рецептора EGF (epidermal growth – эпидермальный фактор роста), PDGF (platelet-derived growth factor – фактор роста тромбоцитов), VEGF (vascular endothelial growth factor – фактор роста эндотелия сосудов), Wnt, TGF-β (transforming growth factor β – трансформирующий фактор роста β) и др. (см. табл. 1). На данный момент ККМ является перспективным адъювантом для текущих ЛТ и ХТ МГБ [25].

В нашем исследовании ККМ в концентрации 10 мкМ существенно влиял на протеом клеток U251 МГБ, на что указывало довольно большое количество ДЭБ (39 %), которые являлись детерминантами различных сигнальных каскадов. Наиболее значимые из них представлены в табл. 1.

В соответствии с анализом GO, 1080 ДЭБ входили в состав почти всех категорий субклеточной локализации, участвовали во многих биологических процессах, обладали широким спектром молекулярных функций и включали различные виды белков.

Протеомный анализ идентифицировал 8 ДЭБ, участвующих в процессах ЭР, включая детерминанты (APEX1, MSH6, PARP1, PCNA, POLD1, POLE3, RFC2, RPA2) сигнальных каскадов MMR, BER и NER. Согласно данным, представленным в табл. 2, все 8 ДЭБ заметно снижают экспрессию при действии ККМ, указывая на уменьшение репарационной активности клеток U251 МГБ. Для получения более полной картины выполняли подробный биоинформатический анализ по 8 идентифицированным белкам. В дополнение к анализу GO и KEGG мы использовали базу данных STRING v11 при построении сети белок-белковых взаимодействий для выявления ассоциации между этими белками. Сетевая визуализация идентифицированного списка белков, участвующих в процессах репарации ДНК, показана на рис. 2. Результаты, основанные на функциональной ассоциации между 8 белками, показали, что все они тесно связаны друг с другом через скоординированную интерактивную сеть белок-белковых взаимодействий.

Ответ на ТМЗ варьируется у разных пациентов с МГБ. В случае МГБ, резистентных к ТМЗ, трудно предотвратить прогрессирование или рецидив опухоли [26]. Ранее проведенные исследования показали, что резистентность к ТМЗ возникает в результате

Таблица 1. *Сигнальные каскады клеток U251 мультиформной глиобластомы, на которые воздействовал куркумин*

Table 1. *Signaling cascades of U251 glioblastoma multiforme cells affected by curcumin*

Индекс KEGG KEGG Index	Сигнальный каскад Pathway	Количество дифференциально экспрессированных белков Number of differentially expressed proteins
P00034	Сигнальный каскад интегринов Integrin signalling pathway	23
P00031	Воспаление, опосредованное хемокинами и цитокинами Inflammation mediated by chemokine and cytokine	15
P00018	Сигнальный каскад рецептора EGF EGF receptor signaling pathway	14
P00047	Сигнальный каскад PDGF PDGF signaling pathway	13
P00005	Ангиогенез Angiogenesis	12
P00021	Сигнальный каскад FGF FGF signaling pathway	11
P00006	Сигнальный каскад апоптоза Apoptosis signaling pathway	9
P00056	Сигнальный каскад VEGF VEGF signaling pathway	8
P00057	Сигнальный каскад Wnt Wnt signaling pathway	8
P00036	Интерлейкиновый сигнальный каскад Interleukin signaling pathway	8
ko03420	Эксцизионная репарация ДНК DNA excisional repair	8
P04393	Сигнальный каскад Ras Ras Pathway	7
P00052	Сигнальный каскад TGF-β TGF-β signaling pathway	7

Примечание. *KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; EGF – эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor); PDGF – фактор роста тромбоцитов (platelet-derived growth factor); FGF – факторы роста фибропластов (fibroblast growth factor); VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor); TGF-β – трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor β).*

Note. *KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; EGF – epidermal growth factor; PDGF – фактор роста тромбоцитов (platelet-derived growth factor); FGF – fibroblast growth factor; VEGF – vascular endothelial growth factor; TGF-β – transforming growth factor β.*

действия систем репарации ДНК (MGMT, MMR и BER), других механизмов, таких как аутофагия и присутствие опухолевых стволовых клеток [27, 28]. Учитывая снижение множественной лекарственной устойчивости под действием ККМ, становится актуальным изучение на модельной клеточной системе U251 МГБ его эффекта на ЭР ДНК.

Эксцизионная репарация неспаренных оснований (MMR). Ошибочно вставленные основания – мисмэтчи (mismatches) – уникальный тип повреждений ДНК, состоящих из неизмененных оснований. Такие повреждения являются исключительно дефектами структуры. Также мишенью MMR выступают петли делеции/вставки. Основным белком-инициатором MMR является MSH2, обнаруживающий ошибку в структуре нити ДНК и в зависимости от типа повреждения образующий гетеродимер либо с MSH6, либо с MSH3 (комплексы-MutSα или MutSβ). Куркумин не оказывал действия на экспрессию MSH2. Для коррекции мисмэтча требуется MSH6, а для исправления петель делеции/вставки необходимо участие и MSH6, и MSH3 [29]. Полагают, что мутации MSH6 играют большую роль в возникновении рецидива глиомы, приобретенной устойчивости к алкилирующим агентам и нестабильности генома [30]. После действия ККМ экспрессия MSH6 понижалась в 7,3 раза.

Другим идентифицированным детерминантом MMR процесса является PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток, proliferating cell nuclear antigen), который необходим для активации эндонуклеазной активности комплекса MutLα, состоящего из белков MLH1 и PMS2. Комплекс MutLα объединяет и координирует взаимодействие между белками, распознающими несоответствия, и другими белками MMR. На ДНК он загружается с помощью специального загрузчика RFC2 (replication factor C2), что приводит

Таблица 2. *Дифференциально экспрессированные белки, участвующие в сигнальных каскадах эксцизионной репарации ДНК*

Table 2. *Differentially expressed proteins involved in signaling cascades of DNA excisional repair*

Ген Gene	Белок Protein	Контр/ККМ Contr/CUR p <0,05	Сигнальный путь Pathway
APEX1	Нуклеаза APEX1 APEX nuclease 1	5,5	B
MSH6	MutS гомолог 6 MutS homolog 6	7,3	M
PARP1	Поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 Poly(ADP-ribose)polymerase 1	2,1	B
PCNA	Ядерный антиген пролиферирующих клеток Proliferating cell nuclear antigen	2,3	M, N, B
POLD1	ДНК-полимераза, дельта 1, каталитическая субъединица Polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit	18,1	M, N, B
POLE3	ДНК-полимераза, эпсилон 3 (субъединица p17) Polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	25,8	N, B
RFC2	Фактор репликации C (активатор 1) 2 Replication factor C (activator 1) 2	19,4	M, N
RPA2	Белок репликации A2, 32 кДа Replication protein A2, 32kDa	15,1	M, N

Примечание. *B – эксцизионная репарация оснований (base excision repair); M – эксцизионная репарация неспаренных оснований (mismatch repair); N – эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair).*
Note. *B – base excision repair; M – mismatch repair; N – nucleotide excision repair.*

к активации скрытой эндонуклеазной активности MutLα и образованию дополнительных разрывов по обе стороны мисмэтча [31].

Куркумин снижает экспрессию PCNA и RFC2 в 2,3 и 19,4 раза соответственно. Восстановление структуры дочерней нити ДНК выполняет POLD1 (ДНК-полимераза дельта 1). Для надежной фиксации POLD1 на цепи также необходимы комплексы PCNA и RFC2 [32]. Под действием ККМ экспрессия POLD1 уменьшается в 18,1 раза. Завершает процесс MMR ДНК-лигаза 1, соединяющая концы сахарофосфатного остова репарированной дочерней нити ДНК с помощью фосфодиэфирной связи [33].

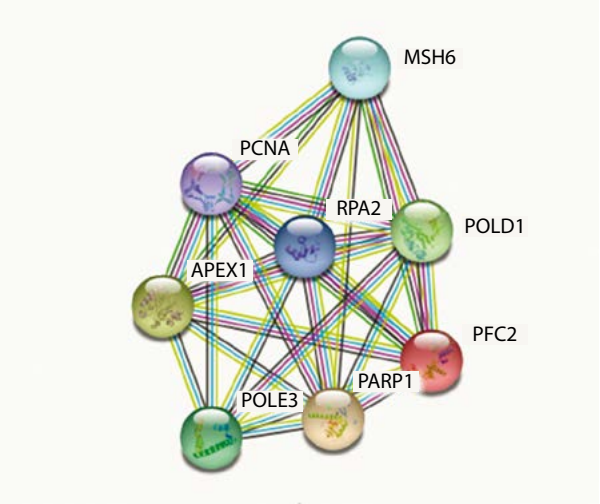


Рис. 2. *Белок-белковые взаимодействия 8 дифференциально экспрессированных белков – участников эксцизионной репарации ДНК, полученные с помощью вебсайта STRING*
Fig. 2. *Protein-protein interactions of 8 differentially expressed proteins – participants in DNA excision repair, obtained using the STRING website*

Эксцизионная репарация оснований (BER). Объектом BER служат неправильно спаренные, алкилированные, окисленные и тому подобные основания. Эта система состоит из мультикаталитических реакций, вызванных ДНК-гликозилазой, эндонуклеазой, полимеразой и ДНК-лигазой. Метилирование N^7-гуанина и N^3-аденина представляют более 90 % метилирования, вызванного ТМЗ, и быстро репарируются BER, способствуя выживанию клеток МГБ [34]. После гликозилазы 1-го типа разрез фосфодиэфирной связи совершает специальная апуриновая/апиримидиновая эндодезоксирибонуклеаза (APEX1) [35]. Согласно данным, представленным в табл. 2, ККМ дезактивирует APEX1, снижая ее экспрессию в 5,5 раза. Среди компонентов системы BER мы идентифицировали белок поли(АДФ-рибоза)полимераза-1 (PARP1), известный как важный фермент с двойным действием. Ингибирование PARP1 приводит к накоплению дефектных ДНК в опухолевых клетках и их гибели. Таким образом, регуляция активности BER будет способствовать лечению резистентных к темозоломиду МГБ [36]. Под действием ККМ экспрессия PARP1 уменьшалась в 2,1 раза.

На следующем этапе BER происходит заполнение разрыва посредством синтеза ДНК. Он осуществляется по 2 путям – короткозаплаточному (short-patch) и длиннозаплаточному (long-patch) – в зависимости от того, вставляется в ДНК 1 нуклеотид или несколько. Короткозаплаточная BER составляет 80–90 % всей BER.

Для длиннозаплаточного BER-пути дополнительно к POLD1, о которой уже упоминалось выше, мы идентифицировали ДНК-полимеразу, эпсилон 3 (POLE3). Являясь PCNA-зависимыми, обе полимеразы осуществляют репарацию ДНК длинными фрагментами [37]. Куркумин оказывает заметное влияние на экспрессию POLE3, снижая ее в 25,8 раза.

Репликационный белок А2 (RPA2). Этот белок является субъединицей комплекса гетеротримерного белка репликации А (RPA), важного для репарации и репликации ДНК. Отмечено, что RPA2 сверхэкспрессируется при различных формах рака [38]. Экспрессия RPA2 понижалась в 15,1 раза после действия ККМ на опухолевые клетки U251 МГБ (см. табл. 2).

Полученные нами данные о действии ККМ на экспрессию белков APEX1, MSH6, PARP1, PCNA, POLD1, POLE3, RFC2 и RPA2 указывают на супрессию эксцизионной репарации ДНК, что, по нашему мнению, может быть использовано при разработке терапевтических схем с участием ККМ для лечения больных МГБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучены молекулярные механизмы действия КММ на протеом линии клеток U251 МГБ человека. Куркумин оказывал существенное влияние на опухолевые клетки. Из 2757 идентифицированных белков 1080 были дифференциально экспрессированными. Обнаружены значительные изменения во многих сигнальных каскадах, играющих большую роль в канцерогенезе. В частности, под действием ККМ в клетках U251 наблюдалось снижение эксцизионной репарации ДНК, на что указывало уменьшение экспрессии более чем в 2 раза детерминант сигналингов, ответственных за эксцизионную репарацию ДНК (APEX1, MSH6, PARP1, PCNA, POLD1, POLE3, RFC2 и RPA2). Полученные данные могут использоваться в дальнейшем при разработке терапевтических схем с участием ККМ для повышения эффективности стандартных методов лечения больных МГБ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Arvold N.D., Reardon D.A. Treatment options and outcomes for glioblastoma in the elderly patient. Clin Interv Aging 2014;9:357–67. DOI: 10.2147/CIA.S44259.
2. Chinnaiyan P., Won M., Wen P.Y. et al. A randomized phase II study of everolimus in combination with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma: results of NRG Oncology RTOG 0913. Neuro Oncol 2018;20:666–73. DOI: 10.1093/neuonc/nox209.
3. Fabian D., Eibl M.D.P.G.P., Alnahhas I. et al. Treatment of glioblastoma (GBM) with the addition of tumor-treating fields (TTF): a review. Cancers 2019;11:1–12. DOI: 10.3390/cancers11020174.
4. Kocaadam B., Sanlier N. Curcumin, an active component of turmeric (Curcuma longa), and its effects on health. Crit Rev Food Sci Nutr 2015;57(13):2889–95. DOI: 10.1080/10408398.2015.1077195.
5. Kaina B., Christmann M. DNA repair in personalized brain cancer therapy with temozolomide and nitrosoureas. DNA Repair (Amst) 2019;78:128–41. DOI: 10.1016/j.dnarep.2019.04.007.
6. Ferri A., Stagni V., Barilà D. et al. Targeting the DNA damage response to overcome cancer drug resistance in glioblastoma. Int J Mol Sci 2020;21(14):4910. DOI: 10.3390/ijms21144910.
7. Kotha R.R., Luthria D.L. Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. Molecules 2019;24(16):2930. DOI: 10.3390/molecules24162930.
8. Luthra P.M., Lal N. Prospective of curcumin, a pleiotropic signaling molecule from Curcuma longa in the treatment of glioblastoma. Eur J Med Chem 2016;109:23–35. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.11.049.
9. Hosseini A., Hosseinzadeh H. Antidotal or protective effects of Curcuma longa (turmeric) and its active ingredient, curcumin, against natural and chemical toxicities: a review. Biomed Pharmacother 2018;99:411–21. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.072.
10. Amalraj A., Pius A., Gopi S. et al. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives: a review. J Tradit Complement Med 2016;7(2):205–33. DOI: 10.1016/j.jtcme.2016.05.005.
11. Meng X., Cai J., Liu J. et al. Curcumin increases efficiency of γ-irradiation in gliomas by inhibiting Hedgehog signaling pathway. Cell Cycle 2017;16(12):1181–92. DOI: 10.1080/15384101.2017.1320000.
12. Park K.S., Yoon S.Y., Park S.H. et al. Antimigration and anti-invasion effects of curcumin via suppression of fascin expression in glioblastoma cells. Brain Tumor Res Treat 2019;7(1):16–24. DOI: 10.14791/btrt.2019.7.e28.
13. Maiti P., Scott J., Sengupta D. et al. Curcumin and solid lipid curcumin particles induce autophagy, but inhibit mitophagy and the PI3K-Akt/mTOR pathway in cultured glioblastoma cells. Int J Mol Sci 2019;20(2):399. DOI: 10.3390/ijms20020399.
14. Trotta T., Panaro M.A., Prifti E. et al. Modulation of biological activities in glioblastoma mediated by curcumin. Nutr Cancer 2019;71(8):1241–53. DOI: 10.1080/01635581.2019.1604978.
15. Кушнир Т.И., Арноцкая Н.Е., Кудрявцев И.А. и др. Влияние гипоксии на секретом клеток мультиформной глиобластомы человека. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(1):32–40. [Kushnir T.I., Arnotskaya N.E., Kudryavtsev I.A. et al. The effect of hypoxia on the secretome of human glioblastoma multiforme cells. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2021;8(1):32–40. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-32-40.
16. Bryukhovetskiy A., Shevchenko V., Kovalev S. et al. To the novel paradigm of proteome-based cell therapy of tumors: through comparative proteome mapping of tumor stem cells and tissue-specific stem cells of humans. Cell Transplant 2014;23(1):151–70. DOI: 10.3727/096368914X684907.
17. Громова О.А., Торшин И.Ю., Згода В.Г. и др. Комплексный протеомный анализ «легкой» пептидной фракции препарата церебролизин. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 2019;119(8):75–83 [Gromova O.A., Torshin Y.U., Zgoda V.G. et al. An analysis of the peptide composition of a “light” peptide fraction of Cerebrolysin. S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry 2019;119(8):75–83. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/jnevro201911908175.
18. Cox J., Hein M.Y., Luber C.A. et al. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. Mol Cell Proteomics

2014;13(9):2513–26. DOI: 10.1074/mcp.M113.031591.
19. Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res 2009;37(1):1–13. DOI: 10.1093/nar/gkn923.
20. Lee S.Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. Genes Dis 2016;3:198–210. DOI: 10.1016/j.gendis.2016.04.007.
21. Fulton B., Short S.C., James A. et al. PARADIGM-2: two parallel phase I studies of olaparib and radiotherapy or olaparib and radiotherapy plus temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma, with treatment stratified by MGMT status. Clin Transl Radiat Oncol 2017;8:12–6. DOI: 10.1016/j.ctro.2017.11.003.
22. Xu T., Guo P., He Y. et al. Application of curcumin and its derivatives in tumor multidrug resistance Phytother Res 2020;34(10):2438–58. DOI: 10.1002/ptr.6694.
23. Alexandru O., Georgescu A.M., Ene L. et al. The effect of curcumin on low-passage glioblastoma cells *in vitro*. J Cancer Res Ther 2016;12(2):1025–32. DOI: 10.4103/0973-1482.167609.
24. Tomeh M.A., Hadianamrei R., Zhao X. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents. Int J Mol Sci 2019;20(5):1033. DOI: 10.3390/ijms20051033.
25. Rodriguez G.A., Shah A.H., Gersey Z.C. et al. Investigating the therapeutic role and molecular biology of curcumin as a treatment for glioblastoma. Ther Adv Med Oncol 2016;8(4):248–60. DOI: 10.1177/1758834016643518.
26. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med 2005;352(10):987–96. DOI: 10.1056/NEJMoa043330.
27. Nakada M., Furuta T., Hayashi Y. et al. The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma. Front Oncol 2012;2:98. DOI: 10.3389/fonc.2012.00098.
28. Atkins R.J., Ng W., Stylli S.S. et al. Repair mechanisms help glioblastoma resist treatment. J Clin Neurosci 2015;22(1):14–20. DOI: 10.1016/j.jocn.2014.09.003.
29. Gu Y., Parker A., Wilson T.M. et al. Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins humanMutS homolog 2/humanMutS homolog 6. J Biol Chem 2002;277(13):11135–42. DOI: 10.1074/jbc.M108618200.
30. Xie C., Sheng H., Zhang N. et al. Association of MSH6 mutation with glioma susceptibility, drug resistance and progression. Mol Clin Oncol 2016;5(2):236–40. DOI: 10.3892/mco.2016.907.
31. Pluciennik A., Modrich P. Protein roadblocks and helix discontinuities are barriers to the initiation of mismatch repair. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104(31):12709–13. DOI: 10.1073/pnas.0705129104.
32. Longley M.J., Pierce A.J., Modrich P. DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. J Biol Chem 1997;272(16):10917–21. DOI: 10.1074/jbc.272.16.10917.
33. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7(5):335–46. DOI: 10.1038/nrm1907.
34. Jiapaer S., Furuta T., Tanaka S. et al. Potential strategies overcoming the temozolomide resistance for glioblastoma. Neurol Med Chir (Tokyo) 2018;58(10):405–21. DOI: 10.2176/nmc.ra.2018-0141.
35. Li M., Wilson D.M. Human apurinic/apyrimidinic endonuclease. Antioxid Redox Signal 2014;20(4):678–707. DOI: 10.1089/ars.2013.5492.
36. Erasimus H., Gobin M., Niclou S. et al. DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. Mutat Res Rev Mutat Res 2016;769:19–35. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.05.005.
37. Matsumoto Y., Kim K., Hurwitz J. et al. Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/apyrimidinic sites with purified human proteins. J Biol Chem 1999;274(47):33703–8. DOI: 10.1074/jbc.274.47.33703.
38. Chen C.C., Juan C.W., Chen K.Y. et al. Upregulation of RPA2 promotes NF-κB activation in breast cancer by relieving the antagonistic function of menin on NF-κB-regulated transcription. Carcinogenesis 2017;38(2):196–206. DOI: 10.1093/carcin/bgw123.

Благодарность. Масс-спектрометрические исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Протеом человека» ИБМХ им. В.Н. Ореховича

Acknowledgment. Mass-spectrometry measurements were performed using the equipment of “Human Proteome” Core Facilities of the Institute of Biomedical Chemistry (Russia)

Вклад авторов

Т.И. Кушнир: подготовка образцов для анализа;
Н.Е. Арноцкая: статистический анализ данных, редактирование черновика рукописи;
И.А. Кудрявцев: получение протеома клеток мультиформной глиобластомы;
А.А. Митрофанов: обзор публикаций по теме статьи;
А.Х. Бекяшев: научное редактирование статьи;
В.Г. Згода: получение масс-спектрометрических данных;
В.Е. Шевченко: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи.

Autrors’ contributions

T.I. Kushnir: preparation of samples for analysis;
N.E. Arnotskaya: statistical data analysis, draft editing manuscripts;
I.A. Kudryavtsev: obtaining proteome of glioblastoma multiforme cells;
A.A. Mitrofanov: review of publications on the topic of the article;
A.K. Bekyashev: scientific editing of the article;
V.G. Zgoda: obtaining mass spectrometric data;
V.E. Shevchenko: developing the research design, analysis of the received data, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors
Т.И. Кушнир / T.I. Kushnir: https://orcid.org/0000-0001-9626-6847
Н.Е. Арноцкая / N.E. Arnotskaya: https://orcid.org/0000-0002-0154-8604
И.А. Кудрявцев / I.A. Kudryavtsev: https://orcid.org/0000-0001-7588-1066
А.А. Митрофанов/ A.A. Mitrofanov: https://orcid.org/0000-0002-4125-7342
А.Х. Бекяшев/ A.K. Bekyashev: https://orcid.org/0000-0002-4160-9598
В.Г. Згода / V.G. Zgoda: https://orcid.org/ 0000-0002-4532-4274
В.Е. Шевченко /V.E. Shevchenko: https://orcid.org/0000-0002-0401-9900

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

Финансирование. Финансируется в рамках госбюджетной темы № 2021-76.
Funding. It is funded under the state budget theme No. 2021-76.

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: 18.06.2021. **Принята к публикации:** 25.11.2021.
Article submitted: 18.06.2021. **Accepted for publication:** 25.11.2021.

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-84-93

CC BY

Распространенность мутации c.5161C>T гена *BRCA1* у пациентов с онкологическими заболеваниями из Республики Башкортостан

М.А. Бермишева[1], Г.Ф. Зиннатуллина[2], И.Р. Гилязова[1], Е.А. Иванова[1], Д.Д. Асадуллина[1], С.О. Потапов[2], А.Т. Мустафин[3], Р.Р. Ишемгулов[3], В.Н. Павлов[3], Ш.Х. Ганцев[3], Э.К. Хуснутдинова[1]

[1]Институт биохимии и генетики ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр» Российской академии наук; Россия, 450054 Уфа, пр-т Октября, 71;
[2]ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Республики Башкортостан; Россия, 450054 Уфа, пр-т Октября, 73/1;
[3]ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 450008 Уфа, ул. Ленина, 3

Контакты: Марина Алексеевна Бермишева *marina_berm@mail.ru*

Введение. На основании многочисленных эпидемиологических и лабораторных исследований в области молекулярной эпидемиологии достигнуты существенные успехи в изучении генетической предрасположенности злокачественных новообразований, но еще остается ряд нерешенных вопросов. Применение современных технологий секвенирования позволило получить новые данные, которые необходимо проанализировать с использованием популяционного подхода с вовлечением в работу больших по численности исследуемых групп.
Цель исследования – оценить частоту мутации *BRCA1**c.5161C>T у пациентов с раком молочной, железы, яичников и предстательной железы, проживающих в Республике Башкортостан.
Материалы и методы. В представленной статье проанализирована встречаемость мутации *BRCA1**c.5161C>T у пациентов с раком молочной железы, яичников и предстательной железы татарской и башкирской этнической принадлежности, проживающих в Республике Башкортостан (n = 696).
Результаты. Мутация *BRCA1**c.5161C>T встречается у пациентов татарской этнической принадлежности с раком молочной железы, яичников и предстательной железы примерно в 1,3 % случаев (6/449); у пациентов-башкир она не обнаружена. Данная мутация также определена в контрольной выборке (2/700). Полученные результаты не подтверждают высокую частоту мутации *BRCA1**c.5161C>T у башкир.
Заключение. В перспективе необходимы дальнейшие исследования для оценки частоты распространения данного варианта в других популяциях, населяющих Волго-Уральский регион России.

Ключевые слова: рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, ген, мутация, генетическая предрасположенность, этническая принадлежность, *BRCA1*

Для цитирования: Бермишева М.А., Зиннатуллина Г.Ф., Гилязова И.Р. и др. Распространенность мутации c.5161C>T гена *BRCA1* у пациентов с онкологическими заболеваниями из Республики Башкортостан. Успехи молекулярной биологии 2020;8(4):84–93. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-84-93.

Prevalence of *BRCA1* c.5161C>T mutation in cancer patients from Bashkortostan

M.A. Bermisheva[1], G.F. Zinnatullina[2], I.R. Gilyazova[1], E.A. Ivanova[1], D.D. Asadullina[1], S.O. Potapov[2], A.T. Mustafin[3], R.R. Ishemgulov[3], V.N. Pavlov[3], Sh.K. Gantcev[3], E.K. Khusnutdinova[1]

[1]Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Center of Russian Academy of Sciences; 71 prospekt Oktyabrya, Ufa 450054, Russia;
[2]Republican Clinical Oncological Center, Ministry of Health of Republic of Bashkortostan; 73/1 prospekt Oktyabrya, Ufa 450054, Russia;
[3]Bashkir State Medical University; 3 Lenin St., Ufa 450008, Russia

Contacts: Marina Alekssevna Bermisheva *marina_berm@mail.ru*

Introduction. Despite the significant progress in investigation of genetic susceptibility to cancers, there are still unclear questions in the field of molecular epidemiology. Numerous new data obtained using modern sequencing technologies require large case/control studies in different populations.

The study objective – to investigate the prevalence of *BRCA1**c.5161C>T mutation in unselected breast, ovarian and prostate cancer patients from Bashkortostan.

Materials and methods. In the presented study, the prevalence of the *BRCA1**c.5161C>T mutation was assessed in breast cancer, ovarian cancer and prostate cancer patients (n = 696). The study cohorts includes individuals of Tatar and Bashkir ethnic origin living in Bashkortostan Republic.

Results. The *BRCA1* mutation c.5161C>T was detected in patients with breast cancer, ovarian cancer and prostate cancer in individuals of Tatar ethnic origin with a frequency of ~1,3 % (6/449), but not in Bashkirs. This mutation was also detected in two individuals of control group (2/700). We conclude that the contribution of the *BRCA1* mutation c.5161C>T to hereditary breast, ovarian and prostate cancers, is likely to be small in Bashkortostan Republic.

Conclusion. Further research will be required to investigate whether this mutation also plays a role in other populations of Turkic origin.

Key words: breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer, genes, mutation, genetic predisposition, ethnic, *BRCA1*

For citation: Bermisheva M.A., Zinnatullina G.F., Gilyazova I.R. et al. Prevalence of *BRCA1* c.5161C>T mutation in cancer patients from Bashkortostan. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2021;8(4):84–93. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-84-93.

ВВЕДЕНИЕ

По данным проекта GLOBOCAN 2020, рак молочной железы (РМЖ) и рак яичников (РЯ) входят в десятку самых распространенных онкологических заболеваний у женщин во всем мире [1]. Уровень заболеваемости РМЖ в некоторых развитых регионах (Австралии, Новой Зеландии, Северной Америке) почти в 3 раза выше, чем в развивающихся (Южной и Центральной Азии, Средней и Восточной Африке) [2]. Кроме того, РМЖ занимает 1-е место по уровню смертности у женщин (15,5 % случаев смерти от рака в мире ежегодно) [1].

По данным Минздрава Республики Башкортостан, злокачественные новообразования молочных желез диагностированы у более чем 14 тыс. жительниц региона. Только в 2019 г. диагноз «РМЖ» впервые установлен у 1810 женщин. В Республике Башкортостан в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями данное заболевание с 2011 г. занимает 1-е место [3].

Рак яичников – гетерогенная группа заболеваний, которые характеризуются бессимптомным течением на раннем этапе развития и диагностируются на более распространенной стадии болезни. В отношении данной патологии отсутствуют эффективные методы активного скрининга для выявления злокачественного процесса на ранних стадиях. По состоянию на 2020 г. в глобальном масштабе РЯ занимает 7-е место среди онкологических заболеваний у женщин [2]. Рак яичников характеризуется худшим прогнозом течения заболевания по сравнению со всеми видами злокачественных новообразований репродуктивной системы у женщин.

Согласно мировой статистике за 2020 г., уровень смертности от отданной патологии составляет 4,2 % [4]. Более 70 % случаев рака яичников диагностируются на III или IV стадии опухолевого процесса, при этом 5-летняя выживаемость составляет менее 45 %. В Республике Башкортостан отмечается тенденция к росту заболеваемости РЯ: с 14,3 случая на 100 тыс. женского населения в 2012 г. до 16,1 случая в 2020 г. В 2019 г. злокачественные новообразования яичников были диагностированы у 365 женщин [3]. Если в структуре смертности женщин Башкортостана злокачественные новообразования молочной железы имеют наибольший удельный вес (18,4 %), то РЯ занимает 6-е место (6,2 %).

Рак предстательной железы (РПЖ) является вторым по распространенности у мужчин после рака легких и составляет 7 % от впервые установленных злокачественных новообразований у мужчин (15 % в развитых странах). Ежегодно в мире выявляется более 1,2 млн новых случаев РПЖ. Число случаев смерти от данного заболевания превышает 350 000 [5]. В Республике Башкортостан за 2019 г. было выявлено 1045 пациентов с РПЖ [3]. Риск возникновения и развития этой патологии тесно связан с семейным анамнезом. Заболеваемость РПЖ в семьях, у членов которых были обнаружены злокачественные новообразования, считается одной из самых высоких [6].

Генетическая предрасположенность – один из важных факторов развития онкологических заболеваний. Так, около 5–10 % случаев РМЖ являются наследственными. Патогенные варианты в генах предрасположенности к РМЖ – *BRCA1* и *BRCA2* – составляют лишь 25–40 % случаев семейного РМЖ. Унаследованные патогенные варианты этих генов обусловливают высокий риск возникновения не только злокачественных новообразований молочных желез, но и серозной карциномы яичников, маточных труб и брюшины. Риск развития других видов рака, таких как РПЖ, рак поджелудочной железы, меланома, также повышается при наличии мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Патогенные варианты этих генов обладают высокой пенетрантностью и наследуются по аутосомно-доминантному типу. У гетерозиготных носителей мутации в гене *BRCA1* риск развития РЯ на протяжении жизни выше на 39–44 %, РМЖ – на 55–72 % [7]. Известно, что дефекты генов *BRCA1* и *BRCA2* являются факторами риска агрессивного РПЖ, а также РМЖ у мужчин. Кумулятивный

риск развития РПЖ к возрасту 85 лет составляет 29 % для носителей мутаций в гене *BRCA1* и 60 % — для носителей мутаций в гене BRCA2 [8].

Во многих странах скрининг на мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* давно перешел из исследовательской лаборатории в клиническую практику как рутинное генетическое тестирование. Паттерн молекулярных BRCA-изменений варьирует среди этнических групп и регионов, что усложняет процесс выбора подходящих мутаций для тестирования. В российских лабораториях часто используется ПЦР-панель (полимеразная цепная реакция), позволяющая выявить 8 мутаций, включающих c. 5266dupC (5382insC), c. 181T>G (300T>G), c.4034delA (4153delA), c.1961del (2080delA), c.68_69del (185delAG), c. 3700_3704del (3819delGTAAA) и c.3756_3759del (3875delGTCT) в гене *BRCA1* и c. 5946delT (6174delT) в гене *BRCA2*, которая, согласно ряду исследований, не отражает истинной картины распространения мутаций *BRCA1/BRCA2* в разных популяциях России [9, 10]. Актуально создание диагностических тест-систем, включающих адаптированную для жителей РФ панель мутаций в генах, ассоциированных с РМЖ или РЯ.

В ходе исследования А.Г. Никитина и соавт. у пациенток с РМЖ и РЯ, проходивших обследование и лечение в Республиканском клиническом онкологическом диспансере Минздрава Республики Татарстан (Казань), была выявлена высокая частота мутации c.5161C>T в гене *BRCA1* у женщин башкирского происхождения [10]. Анализ данного патогенного варианта в нашей группе больных РМЖ и РЯ не проводился, поэтому мы оценили частоту мутации c.5161C>T в гене *BRCA1* у проживающих в Республике Башкортостан пациентов с BRCA-ассоциированными онкологическими заболеваниями.

Многочисленные исследования показывают, что генетическая структура популяций отражается на генетической архитектуре наследственных заболеваний [11]. В этом плане Республика Башкортостан представляет особый интерес. В регионе проживают народы, относящиеся к разным лингвистическим группам и антропологическим типам и имеющие сложную

Таблица 1. *Характеристика выборки больных раком молочной железы, яичников и предстательной железы*

Table 1. *Characteristics of breast, ovarian and prostate cancer patients*

Показатель Parameter	**Пациенты с раком молочной железы (*n* = 384), абс. (%)** Breast cancer patients (*n* = 384), abs. (%)	**Пациенты с раком яичников (*n* = 97), абс. (%)** Ovarian cancer patients (*n* = 97), abs. (%)	**Пациенты с раком предстательной железы (*n* = 215), абс. (%)** Prostate cancer patients (*n* = 215), abs. (%)
Возраст, лет: Age, years:			
≤30	4 (1,0)	0 (0)	0 (0)
31–40	55 (14,3)	7 (7,2)	3 (1,4)
41–50	134 (34,9)	33 (34,0)	18 (8,4)
51–60	102 (26,6)	40 (41,2)	45 (20,9)
61–70	66 (17,2)	14 (14,4)	102 (47,4)
≥71	23 (6,0)	3 (3,1)	47 (21,9)
Этническая принадлежность: Ethnic group:			
татары tatars	246 (64,1)	78 (80,4)	125 (58,1)
башкиры bashkirs	123 (32,0)	16 (16,5)	90 (41,9)
метисы mixed origin patients	15 (3,9)	3 (3,1)	0 (0)
Семейная история рака: Family history:			
отягощена yes	27 (7,0)	7 (7,2)	6 (2,8)
не отягощена no	347 (90,4)	87 (89,7)	209 (97,2)
нет информации not available	10 (2,6)	3 (3,1)	0 (0)
Стадия: Stage:			
I	33 (8,6)	10 (10,3)	15 (6,9)
II	235 (61,2)	31 (32,0)	17 (7,9)
III	101 (26,3)	41 (42,3)	159 (74)
IV	15 (3,9)	15 (15,4)	24 (11,2)

историю формирования и развития. Основными этническими группами, населяющими территорию республики, являются русские, башкиры и татары (90 % населения республики). В Башкортостане проживает около 4 млн человек. Большое значение в исследовании генетической эпидемиологии наследственных форм онкологических заболеваний имеет популяционный подход.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 384 пациентки с РМЖ, 97 больных РЯ, 215 пациентов с РПЖ и 700 человек без онкологических заболеваний на момент опроса и забора крови, которые составили контрольную группу. Забор биологического материала у больных со злокачественными новообразованиями проводили на базе Клинического онкологического диспансера Минздрава Республики Башкортостан (Уфа), онкологического отделения городской клинической больницы № 1 (Стерлитамак), а также клиники Башкирского государственного медицинского университета (Уфа) в период с 2007 по 2021 г. Образцы периферической крови онкологических пациентов были взяты в пробирки с консервантом этилендиаминтетрауксусной кислоты. ДНК выделяли из лейкоцитов крови методом последовательной фенольно-хлороформной экстракции.

Выборка пациентов с РМЖ, РЯ и РПЖ сформирована без учета семейной истории онкологических заболеваний. В ходе исследования уточнялись данные об этнической принадлежности больных путем опроса и определения национальности родителей в 3 поколениях. В данное исследование были включены лица татарской и башкирской этнической принадлежности, а также метисы от смешанных браков (татары/башкиры, татары/русские, башкиры/русские). Краткая характеристика исследуемых групп представлена в табл. 1. Ранее в группе пациенток с РМЖ и РЯ был проведен анализ мутаций c. 5266dupC, c. 181T>G и c.4035delA в гене *BRCA1* [9]. Контрольная группа собрана в период с 2007 по 2021 г. В нее вошли неродственные практически здоровые индивиды (без онкологической патологии на момент забора крови), которые по полу, возрасту, этнической принадлежности и территории проживания соответствовали группе больных. Средний возраст женщин контрольной группы составил 46 ± 10,3 года (от 18 до 84 лет), мужчин – 68,4 ± 7,3 года (от 40 до 82 лет).

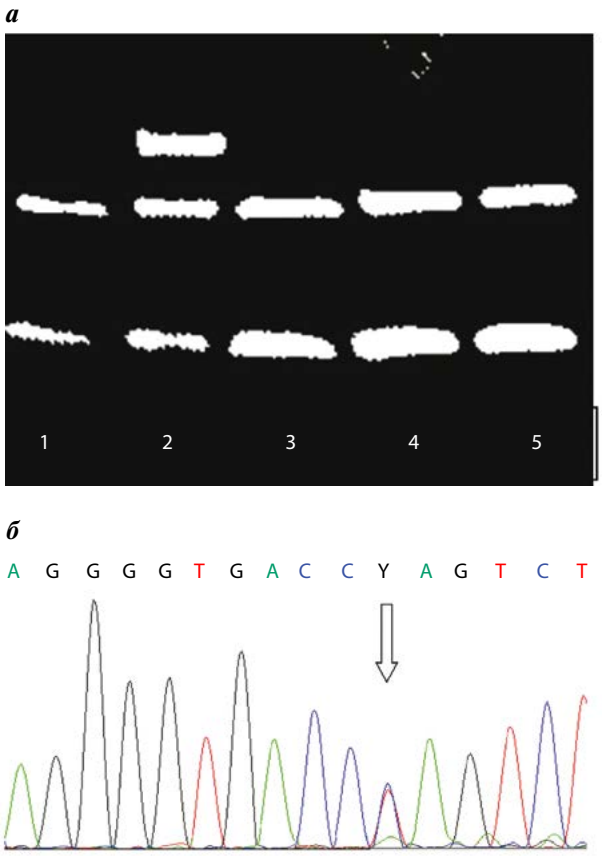
АНАЛИЗ МУТАЦИИ

Праймеры были синтезированы в НПК «Синтол». Поиск мутации *BRCA1**c.5161C>T выполнен методом ПДРФ-анализа (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) с использованием эндонуклеазы рестрикции Bse1I (SibEnzyme). Амплифицированный фрагмент (209 п.н.) гена, содержащий мутантный аллель, после рестрикции не расщепляется. Все случаи наличия мутации в гене подтверждены прямым ресеквенированием (см. рисунок). Очищенные фрагменты ДНК секвенировали с использованием набора для секвенирования BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, Калифорния, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Вариант NM_007294.4: c.5161C>T (BIC-номенклатура — 5280C>T) в 19-м экзоне гена *BRCA1* приводит к формированию преждевременного стоп-кодона p.Gln1721Ter и синтезу укороченного белка, вследствие чего происходит потеря функции BRCA1. Вариант *BRCA1**c.5161C>T является клинически патогенным (ClinVar) и ассоциирован с развитием злокачественных новообразований, в частности РМЖ, РЯ и РПЖ.

В изученной группе пациентов с РМЖ выявлены 3 гетерозиготных носителя *BRCA1**c.5161C>T-варианта



Детекция мутации c.5161C>T в гене BRCA1: а – определение мутации c.5161C>T в гене BRCA1 методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов; б – секвенирование 19-го экзона гена BRCA1 (фрагмента нуклеотидной последовательности ДНК). Мутация выявлена в гетерозиготном состоянии у пациентки с раком молочной железы. Дорожки 1, 3, 4, 5 – пробы с генотипом norm/norm, 2 – гетерозигота c.5161C>T/norm

Detection of the c.5161C>T mutation in the BRCA1 gene: a – identification of the BRCA1 mutation c.5161C>T using restriction fragment length polymorphism; б – direct sequencing of exon 19 in the BRCA1 gene. Breast cancer patient is heterozygous for c.5161C>T mutation. Tracks 1, 3, 4, 5 – samples with genotype norm/norm, 2 – heterozygote c.5161C>T/norm

(табл. 2). У 2 из них РМЖ установлен в пременопаузальном возрасте (до 42 лет). Все женщины принадлежат к татарской этнической группе. В 1 случае у матери пробанда диагностирован РЯ, а также отягощенный онкологический анамнез у других членов семьи. У 1 пациентки было заболевание стадии I, у 2 – стадии II (см. табл. 2). Опухоли не имели рецепторов к эстрогену, прогестерону и HER2. Во всех случаях отмечен высокий уровень пролиферативной активности. Как известно, у носительниц мутации в гене *BRCA1* чаще всего развиваются опухоли трижды негативного РМЖ, характеризующегося агрессивным течением и отсутствием рецепторов для терапевтического воздействия. Мутация определена и в группе женщин с эпителиальным РЯ. Так, у носительницы *BRCA1**c.5161C>T в возрасте 46 лет диагностирован РЯ (гистологический тип – серозная карцинома высокой степени злокачественности), что свидетельствует об агрессивном течении опухолевого процесса. Информации об онкологическом анамнезе близких родственников данной пациентки нет. Женщина принадлежит к татарской этнической группе.

В группе РПЖ выявлены 2 носителя варианта *BRCA1**c.5161C>T – оба татарской этнической принадлежности. Заболевание диагностировано в возрасте 56 и 57 лет (уровень простатического специфического антигена – 17,98 нг/мл и 26,4 нг/мл соответственно). Отягощенный онкологический анамнез у других членов семьи пациенты отрицают. Обоим больным выполнена радикальная простатэктомия. Гистологический тип опухоли – ацинарная аденокарцинома. По классификации TNM (Tumor, Nodus and Metastasis), у 1-го пациента было заболевание T3N0M0, у 2-го – T3bN1M0; индекс Глисона – 9 (5 + 4) и 8 (4 + 4) соответственно. На фоне проводимой терапии у больных отмечалось агрессивное течение заболевания.

В контрольной группе также выявлены 2 носителя патогенного варианта *BRCA1**c.5161C>T: у 1 мужчины татарской этнической принадлежности в возрасте 61 года выявлено злокачественное новообразование правого легкого (гистологический тип – плоскоклеточный неороговевающий рак T3N0M0). После радикальной операции (пульмонэктомии) адъювантная химиотерапия не была проведена в связи с возникшими послеоперационными осложнениями. Через 2 года после хирургического вмешательства установлено прогрессирование заболевания: выявлены множественные метастазы в легких, печени, костях. После проведения 4 курсов химиотерапии в режиме гемцитабин + карбоплатин получен частичный ответ опухоли. Второй носитель патогенного варианта *BRCA1**c.5161C>T – мужчина татарской этнической принадлежности – входил в контрольную группу, находился под динамическим наблюдением по поводу болезни Паркинсона. В возрасте 67 лет заболел вирусной пневмонией, имеющей осложненное течение, которая привела к летальному исходу. За период наблюдения злокачественного процесса выявлено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ген опухолевого супрессора *BRCA1* – один из ключевых генов предрасположенности к развитию РМЖ и РЯ. Его важнейшей функцией является сохранение стабильности генома. Общая распространенность мутаций зародышевой линии в гене *BRCA1* у здоровых женщин составляет 0,11 % [12]. На сегодняшний день в этом гене идентифицировано множество мутаций, некоторые из которых обнаружены в не связанных близким родством семьях, а также в разных географических регионах и популяциях. В этом случае мутация имеет так называемый эффект основателя и встречается с более высокой частотой в определенной популяции вследствие дрейфа генов. Мутации с эффектом основателя в гене *BRCA1* определены у евреев ашкенази, поляков, белорусов, японцев, чилийцев и др. [13–17]. В российской популяции также выявлены мутации, которые чаще встречаются у индивидов славянского происхождения. В настоящее время многочисленные исследовательские группы ведут активный поиск нарушений в генах, ассоциированных с онкологическими заболеваниями в разных этнических группах, проживающих в России.

В одной из работ 2020 г. представлены данные о том, что мутация *BRCA1**c.5161C>T часто встречается у пациенток с наследственным РМЖ / РЯ башкирской этнической принадлежности (6,9 % случаев), тогда как у татар ее частота снижается до 0,8 % [10]. К сожалению, нет информации о размере исследуемой группы женщин башкирского происхождения. Мы предположили, что это была малочисленная по объему выборка, поэтому представленные значения частоты встречаемости данного мутантного варианта могут искажать истинную картину его распространенности в Волго-Уральском регионе. Татары и башкиры принадлежат к одной языковой группе. Они длительное время проживают на смежных территориях этого региона, имеют тесные исторические, культурные и политические контакты. По данным генетических исследований, наиболее близки к татарам северо-западные башкиры. Необходимо отметить, что сами башкиры различаются между собой и для них характерен высокий уровень внутрипопуляционного разнообразия, а у некоторых субэтнических групп четко прослеживается эффект основателя [18]. В Башкортостане наиболее многочисленными национальными группами являются башкиры и татары.

Мы провели генотипирование мутации *BRCA1** c.5161C>T у больных РМЖ, РЯ, РПЖ и здоровых индивидов татарской и башкирской этнической принадлежности, проживающих в Башкортостане. Гетерозиготные носители данного варианта выявлены во всех 3 выборках пациентов с онкологическими заболеваниями (у женщин и мужчин татарской

Таблица 2. *Клинические характеристики больных раком молочной железы, яичников и предстательной железы – носителей мутации c.5161C>T в гене BRCA1*

Table 2. *Clinical characteristics of BRCA1 mutation c.5161C>T carriers among patients with breast, ovarian or prostate cancer*

Пациент Patient	Диагноз/ID Diagnosis/ID	Пол Gender	Возраст, лет Age, years	Стадия по TNM TNM stage	Гистологический тип Histology	Степень злокачественности Grade	Статус рецепторов Receptor status	Семейная история онкологических заболеваний Family history of oncological diseases	Этническая принадлежность Ethnic origin
1	РМЖ/188bc BC/188bc	Ж F	40	T2N1M0	Инвазивная карцинома Invasive carcinoma	G3	ER– PR– HER2–	Не отягощена Negative	Татарка Tatar
2	РМЖ/465bc BC/465bc	Ж F	51	T1N0M0	Инвазивная карцинома Invasive carcinoma	G3	ER– PR– HER2–	Мать –РЯ, сестра – рак щитовидной железы, отец – рак легкого Mother –OC, sister – thyroid cancer, father – lung cancer	Татарка Tatar
3	РМЖ/615bc BC/615bc	Ж F	41	T2N0M0	Инвазивная карцинома Invasive carcinoma	G2	ER– PR– HER2–	Не отягощена Negative	Татарка Tatar
4	РЯ/312oc OC/312oc	Ж F	46	T3cN2M0	Высокозлокачественная серозная карцинома High-grade serous carcinoma	G3	Нет данных No data	Нет данных No data	Татарка Tatar
5	РПЖ/345pc PC/345pc	М M	56	T3N0M0	Ацинарная аденокарцинома Acinar adenocarcinoma	G3	–	Не отягощена Negative	Татарин Tatar
6	РПЖ/274pc PC274pc	М M	57	T3bN1M0	Ацинарная аденокарцинома Acinar adenocarcinoma	G3	–	Не отягощена Negative	Татарин Tatar

Примечание. *ID – идентификационный номер образца; РМЖ – рак молочной железы; РЯ – рак яичников; РПЖ – рак предстательной железы; Ж – женщина, М – мужчина; ER – рецептор эстрогена, Pr – рецептор прогестерона, HER2 – рецептор эпидермального фактора роста.*

Note. *ID – the identification number of the sample; BC – breast cancer; OC – ovarian cancer; PC – prostate cancer; F – woman, M – man; ER – estrogen receptor, Pr – progesterone receptor, HER2 – epidermal growth factor receptor.*

Таблица 3. *Частота мутации c.5161C>T в гене BRCA1 у пациентов с раком молочной железы и яичников (по данным литературы)*

Table 3. *Carrier frequency for BRCA1 mutation c.5161C>T in different breast/ovarian cancer studies*

Исследуемая группа Study cohort	Этническая группа/регион Ethnic group/or region	Размер выборки/ общее число пациентов, абс. Sample size/total number of patients, abs.	Частота,% Frequency,%	Метод Method	Источник Reference
Пациенты с наследственными онкологическими синдромами (Казань, Россия) Patients with hereditary oncological syndromes (Kazan, Russia)	Башкиры Bashkirs Татары Tatars Русские Russians В целом Total	Нет данных No data Нет данных No data Нет данных No data 1644	6,9 0,8 0 0,5	NGS (34 гена) NGS (34 genes)	А.Г. Никитин и соавт. [10] A.G. Nikitin et al. [10]
Пациенты с наследственными РЯ и РМЖ (Казань, Москва, Россия) Patients with hereditary ovarian and breast cancer (Kazan, Moscow, Russia)	Татары Tatars Славяне Slavs	2/139 0/67	1,4 0	NGS (34 гена) NGS (34 genes)	О.И. Бровкина и соавт. [26] O.I. Brovkina et al. [26]
Пациенты с высоким риском развития РЯ и РМЖ Patients at high risk of developing ovarian and breast cancer	Арабские мусульмане (Палестина) Arab muslims (Palestine)	1/45	2,2	Секвенирование гена *BRCA1*, гетеродуплексный анализ *BRCA1* sequencing, heteroduplex analysis	Y. Laitman и соавт. [19] Y. Laitman et al. [19]
Пациенты с семейным РМЖ Patients with familial breast cancer	Восточный Китай East China	1/62	1,6	Секвенирование гена *BRCA1* *BRCA1* sequencing	W. Cao и соавт. [20] W. Cao et al. [20]
Пациентки с трижды негативным РМЖ Patients with triple negative BC	Германия Germany	2/100	2,0	Секвенирование гена *BRCA1* *BRCA1* sequencing	A. Muendlein и соавт. [21] A. Muendlein et al. [21]
Женщины с РМЖ до 40 лет Women with breast cancer before 40 years of age	Иордания Jordan	1/616	0,16	NGS *BRCA1 /BRCA2*	H. Abdel-Razeq и соавт. [22] H. Abdel-Razeq et al. [22]
Пациентки с РМЖ и РЯ с отягощенным семейным анамнезом Patients with breast cancer and breast cancer with a burdened family history	Иордания Jordan	1/180	0,5	NGS *BRCA1/BRCA2*	M. Abu-Helal и соавт. [23] M. Abu-Helal et al. [23]
Пациентки с РМЖ Patients with breast cancer	Россия, Москва Russia, Moscow	2/4440	0,04	ONCOBRCA-панель и NGS *BRCA1/ BRCA2* ONCOBRCA panel and NGS *BRCA1/BRCA2*	Г.П. Снигирева и соавт. [27] G.P. Snigireva et al. [27]
Пациентки с РМЖ и РЯ Patients with breast/ovarian cancer	Россия, Санкт-Петербург Russia, Saint-Petersburg	0/785	0	Секвенирование генов *BRCA1* и *BRCA2* по Сэнгеру или NGS Full-length sequencing of the entire *BRCA1* and *BRCA2* coding region	A.P. Sokolenko и соавт. [25] A.P. Sokolenko и et al. [25]

Примечание. *NGS – секвенирование следующего поколения.*
Note. *NGS – next-generation sequencing.*

этнической принадлежности): у пациентов с РМЖ – в 3 из 246 (1,2 %) случаев, с РЯ – в 1 из 78 (1,3 %) случаев, с РПЖ – в 2 из 125 (1,6 %) случаев. В выборках больных и здоровых индивидов – башкир – данная мутация не обнаружена.

Анализ данных литературы показал, что мутация *BRCA1**c.5161C>T имеет широкий географический ареал (табл. 3). Одно из первых сообщений о выявленной замене 5280C>T в 19-м экзоне гена *BRCA1* было представлено израильскими авторами: мутация выявлена у женщины арабского происхождения с РМЖ [19]. В работе китайских исследователей эта мутация обнаружена у пациентки с РМЖ 32 лет, у матери которой РЯ, а у сестры – билатеральный РМЖ [20]. Названная мутация выявлена и у 2 пациенток с трижды негативным РМЖ из Германии, у 1 из них в семье встречался РМЖ [21]. В группах женщин молодого возраста с РМЖ и пациенток с РЯ из Иордании также был определен вариант *BRCA1**c.5161C>T [22, 23]. Многочисленные российские исследования показали, что в западной части России он встречается редко [24, 25] и его частота увеличивается в Волго-Уральском регионе [10, 26].

Интересным фактом стало обнаружение варианта *BRCA1**c.5161C>T у 2 мужчин из контрольной группы. У 1 из них через 10 лет с момента забора биологического материала был диагностирован рак легкого. Данное заболевание в основном связано с воздействием окружающей среды, особенно с курением, в то время как роль генетических факторов с высокой пенетрантностью в развитии данной патологии неизвестна. В ряде исследований показано, что у носителей патогенных вариантов (наследственных/соматических) в генах *BRCA1* и *BRCA2* встречается рак легкого. Также продемонстрировано, что у пациентов с этим заболеванием, которые являются носителями мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, наблюдаются высокие показатели частоты ответа на лечение (препараты платины) и общей выживаемости [28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования показывают, что наличие варианта *BRCA1**c.5161C>T объясняет около 1,3 % случаев РМЖ, РЯ и РПЖ у татар. У башкир данная мутация не выявлена, что значительно отличается от данных, представленных в работе А.Г. Никитина с соавт.

Скрининг специфических мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, которые встречаются с высокой частотой в определенных группах населения, может быть неоценимым инструментом для выявления здоровых людей, которые в настоящее время не имеют онкологического заболевания, но находятся в группе повышенного риска развития данной патологии. Важно отметить, что исследования в области молекулярной эпидемиологии злокачественных новообразований важны не только для профилактики и диагностики, но и для выбора тактики лечения. Продемонстрировано, что у пациенток с BRCA-ассоциированным РЯ применение олапариба повышает общую выживаемость без прогрессирования и значительно снижает риск развития рецидивов. В одной из новых работ опубликованы результаты международного исследования, в котором анализировалось лечение больных РМЖ с наследственными BRCA-мутациями.

Было продемонтрировано значительное снижение риска рецидива РМЖ у пациентов с высоким риском при применении препаратов, блокирующих восстановление ДНК опухолевых клеток. A.N.J. Trutt с соавт. представили результаты международного исследования по лечению BRCA-ассоциированного РМЖ на ранней стадии заболевания. Пациенты были рандомизированы после радикального лечения в 2 группы: перорального приема олапариба (PARP-ингибитора) в течение года и плацебо в соотношении 1: 1. Терапия олапарибом в адъювантном режиме в течение 1 года привела к значительному снижению риска развития рецидива РМЖ [29].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview. Int J Cancer 2021. DOI: 10.1002/ijc.33588.
2. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660.
3. Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. Moscow: P.A. Herzen Moscow State Medical Research Institute – a branch of the Federal State Budgetary Institution «NMIC of Radiology» of the Ministry of Health of Russia, 2020. 252 с. [Malignant neoplasms in Russia in 2019 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskij, A.O. Shakhzadova. Moscow: 2020. 252 p. (In Russ.)].
4. Cancer fact sheets. Cancer today. Avaliable at: https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers.
5. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2018;68(6):394–424. DOI: 10.3322/caac.21492.
6. Hemminki K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. World J Urol 2012;30(2):143–8. DOI: 10.1007/s00345-011-0801-1.
7. Kuchenbaecker K.B., Hopper J.L., Barnes D.R. et al. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. JAMA 2017;317(23):2402–16. DOI: 10.1001/jama.2017.7112.
8. Nyberg T., Frost D., Barrowdale D. et al. Prostate cancer risks for male BRCA1

and BRCA2 mutation carriers: a prospective cohort study. EurUrol 2020;77(1):24–35. DOI: 10.1016/j.eururo.2019.08.025.

9. Бермишева М.А., Богданова Н.В., Гилязова И.Р. и др. Этнические особенности формирования генетической предрасположенности к развитию рака молочной железы. Генетика 2018;54(2):233–42. [Bermisheva M.A., Bogdanova N.V., Gilyazova I.R. et al. Ethnic features of genetic susceptibility to breast cancer. Genetika = Genetics 2018;54(2):226–34. (In Russ.)].
10. Никитин А.Г., Бровкина О.И., Ходырев Д.С. и др. Опыт создания публичной базы данных мутаций ONCOBRCA: биоинформационные проблемы и решения. Клиническая практика 2020;11(1):21–9. [Nikitin A.G., Brovkina O.I., Khodyrev D.S. et al. Creating a public mutation database oncoBRCA: bioinformatic problems and solutions. Klinicheskaya praktika = Clinical Practice 2020;11(1):21–9. (In Russ.)]. DOI: 10.17816/clinpract25860.
11. Этногеномика народов Центральной Евразии: структура генофонда и молекулярно-генетические основы наследственной патологии. Под ред. проф. Е.К. Хуснутдиновой. Уфа: Гилем, 2014. 488 с. [Ethnogenomics of the peoples of Central Eurasia: the structure of the gene pool and the genetics of hereditary pathology. Ufa: Gilem, 2014. 488 p. (In Russ.)].
12. Hu C., Hart S.N., Gnanaolivu R. et al. A Population-based study of genes previously implicated in breast cancer. N Engl J Med 2021;384(5):440–51. DOI: 10.1056/NEJMoa2005936.
13. Levy-Lahad E., Catane R., Eisenberg S. et al. Founder *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Ashkenazi Jews in Israel: frequency and differential penetrance in ovarian cancer and in breast-ovarian cancer families. Am J Hum Genet 1997;60(5):1059–67.
14. Cybulski C., Kluźniak W., Huzarski T. et al. The spectrum of mutations predisposing to familial breast cancer in Poland. Int J Cancer 2019;145(12):3311–20. DOI:10.1002/ijc.32492.
15. Savanevich A., Ashuryk O., Cybulski C. et al. *BRCA1* and *BRCA2* mutations in ovarian cancer patients from Belarus: update. Hereditary Cancer in Clinical Practice 2021;19:13. DOI: 10.1186/s13053-021-00169-y.
16. 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.
17. Alvarez C., Tapia T., Perez-Moreno E. et al. BRCA1 and BRCA2 founder mutations account for 78 % of germline carriers among hereditary breast cancer families in Chile. Oncotarget 2017;8(43):74233–43. DOI: 10.18632/oncotarget.18815.
18. Юсупов Ю.М., Схаляхо Р.А., Агджоян А.Т. и др. Анализ генофонда юго-восточных башкир в контексте их родовой структуры (по данным о полиморфизме ɣ-хромосомы). Вестник Московского университета. Серия 23: Антропология 2019;4:54–66. [Yusupov Y.M., Skhalyakho R., Agdzhoyan A.T. et al. Analysis of the gene pool of the south eastern bashkirs in the context of their clan structure (according to the ɣ chromosome polymorphism). Moscow University Anthropology Bulletin. Anthropology 2019;4:54–66. (In Russ.)]. DOI: 10.32521/2074-8132.2019.4.054-066.
19. Laitman Y., Borsthein R.T., Stoppa-Lyonnet D. et al. Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 genes in ethnically diverse high risk families in Israel Breast Cancer Res Treat 2011;127(2):489–95. DOI: 10.1007/s10549-010-1217-0.
20. Cao W., Wang X., Gao Y. et al. BRCA1 Germ-line mutations and tumor characteristics in eastern chinese women with familial breast cancer. Anat Rec (Hoboken) 2013;296(2):273–8. DOI: 10.1002/ar.22628.
21. Muendlein A., Rohde B.H., Gasser K. et al. Evaluation of *BRCA1/2* mutational status among German and Austrian women with triple-negative breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol 2015;141(11):2005–12. DOI: 10.1007/s00432-015-1986-2.
22. Abdel-Razeq H., Abujamous L., Abunasser M. et al. Prevalence and predictors of germline *BRCA1* and *BRCA2* mutations among young patients with breast cancer in Jordan. Sci Rep 2021;11:14906. DOI: 10.1038/s41598-021-94403-1.
23. Abu-Helalah M., Azab B., Mubaidi R. et al. BRCA1 and BRCA2 genes mutations among high risk breast cancer patients in Jordan. Sci Rep 2020;10:17573. DOI: org/10.1038/s41598-020-74250-2.
24. Новикова Е.И., Кудинова Е.А., Боженко В.К., Солодкий В.А. Характеристика BRCA-ассоциированного рака молочной железы в российской популяции. Вестник РГМУ 2021;1:26–32. [Novikova E.I., Kudinova E.A., Bozhenko V.K., Solodkiy V.A. Characteristics of BRCA-associated breast cancer in the population of the Russian Federation. Vestnik RGMU 2021;1:26–32. (In Russ.)]. DOI: 10.24075/vrgmu.2021.006.
25. Sokolenko A.P., Sokolova T.N., Ni V.I. et al. Frequency and spectrum of founder and non-founder BRCA1 and BRCA2 mutations in a large series of Russian breast cancer and ovarian cancer patients. Breast Cancer Res Treat 2020;184(1):229–35.DOI: 10.1007/s10549-020-05827-8.
26. Бровкина О.И., Гордиев М.Г., Еникеев Р.Ф. и др. Гены системы репарации: популяционные различия наследственных типов рака яичников и молочной железы, выявляемые методом секвенирования нового поколения. Опухоли женской репродуктивной системы 2017;2(13):61–7. [Brovkina O.I., Gordiev M.G., Enikeev R.F. et al. Reparation system genes: population differences in hereditary ovarian and breast cancer determined by next-generation sequencing. Tumors of female reproductive system 2017;2(13):61–7. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1994-4098-2017-13-2-61-67.
27. Снигирева Г.П., Румянцева В.А., Новикова Е.И. и др. Алгоритм молекулярно-генетического обследования для выявления наследственного *RCA*-ассоциированного рака молочной железы. Альманах клинической медицины 2019;47(1): 54–65. [Snigireva G.P., Rumyantseva V.A., Novikova E.I. et al. Algorithm of molecular genetic investigation to identify hereditary *BRCA*-associated breast cancer. Al'manah klinicheskoj mediciny = Almanac of Clinical Medicine 2019;47(1):54–65. (In Russ.)]. DOI:10.18786/2072-0505-2019-47-002.
28. Kadouria L., Rottenberga Y., Zicka A. et al. Homologous recombination in lung cancer, germline and somatic mutations, clinical and phenotype characterization. Lung Cancer 2019;137:48–51. DOI: 10.1016/j.lungcan.2019.09.008.
29. Tutt A.N.J., Garber J.E., Kaufman B. et al. Adjuvant olaparib for patients with BRCA1- or BRCA2-mutated breast cancer. N Engl J Med 2021;384(25):2394–405. DOI: 10.1056/NEJMoa2105215.

Вклад авторов
М.А. Бермишева: разработка дизайна исследования, проведение экспериментальных исследований, обработка полученных данных, анализ научной литературы по теме статьи, редактирование статьи;
Г.Ф. Зиннатуллина: сбор материала, клиническая характеристика пациентов, обработка полученных данных, написание текста статьи;
И.Р. Гилязова: обработка полученных данных;
Е.А. Иванова, Д.Д. Асадуллина: проведение экспериментальных исследований;
С.О. Потапов: сбор материала;
А.Т. Мустафин, Р.Р. Ишемгулов: сбор материала, клиническая характеристика пациентов;
В.Н. Павлов, Ш.Х. Ганцев, Э.К. Хуснутдинова: редактирование статьи.
Authors' contribution
M.A. Bermisheva: development of research design, experimental research, processing of the data obtained, review of publications on the topic of the article, article editing;
G.F. Zinnatullina: collection of material, clinical characteristics of patients, processing of the data obtained, article writing;
I.R .Gilyazova: processing of the received data;
E.A. Ivanova, D.D. Asadullina: conducting experimental studies;
S.O. Potapov: collecting material;
A.T. Mustafin, R.R. Ishemgulov: collection of material, clinical characteristics of patients;
V.N. Pavlov, Sh.K. Gantsev, E.K. Khusnutdinova: article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors
М.А. Бермишева / M.A. Bermisheva: https://orcid.org/0000-0002-0584-3969
Г.Ф. Зиннатуллина / G.F. Zinnatullina: https://orcid.org/0000-0001-8369-3399
И.Р. Гилязова / I.R. Gilyazova: https://orcid.org/0000-0001-9499-5632
Е.А. Иванова / E.A. Ivanova: https://orcid.org/0000-0002-7853-8658
Д.Д. Асадуллина / D.D. Asadullina: https://orcid.org/0000-0003-4911-8037
С.О. Потапов / S.O. Potapov: https://orcid.org/0000-0001-6494-0446
А.Т. Мустафин / A.T. Mustafin: https://orcid.org/0000-0001-9497-5244
Р.Р. Ишемгулов / R.R. Ishemgulov: https://orcid.org/0000-0001-9521-4957
Ш.Х. Ганцев / Sh.K. Gantcev: https://orcid.org/ 0000-0003-2047-963X
В.Н. Павлов / V.N. Pavlov: https://orcid.org/ 0000-0003-2125-4897
Э.К. Хуснутдинова / E.K. Khusnutdinova: https://orcid.org/0000-0003-2987-3334

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (№ АААА-А16-116020350032-1), Программы развития биоресурсных коллекций (№ 007-030164/2), а также с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Биомика» и Уникальной научной установки «КОДИНК».
Financing. The work was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Education and Science of Russia (No. AAAAA16-116020350032-1), the Program for the development of Bioresource collections (No. 007-030164/2), and also with the use of the equipment of the Biomika Collective Use Center and the Unique scientific installation "KODINK".

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биоэтике Института биохимии и генетики ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр» Российской академии наук. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the bioethical committee of the Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Center of Russian Academy of Sciences. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 27.09.2021. **Принята к публикации:** 24.11.2021.
Article submitted: 27.09.2021. **Accepted for publication:** 24.11.2021.

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. **Бланк сопроводительного письма** (заполненный, подписанный всеми авторами, с подписью руководителя и круглой печатью учреждения) отсканировать и загрузить как дополнительный файл при подаче рукописи в редакцию (в формате *.pdf или *.jpg). Файл назвать «... (фамилия, инициалы) первого автора. Сопроводительное письмо». Для каждой указанной в рукописи организации необходимо представить отдельное сопроводительное письмо.

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 (бóльший 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 подрисуночными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «*а*», «*б*» и т. д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т. д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подрисуночной подписи. Подписи к рисункам даются на русском и английском языках на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле. Все надписи на рисунках также должны быть переведены на английский язык.

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

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

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

9. Список литературы

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

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

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

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

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

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

При ссылке на **статьи из журналов** после авторов указывают название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы, DOI статьи (при наличии). При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания, число страниц. В ссылках на русскоязычные источники необходимо дополнительно указывать информацию для цитирования на латинице.

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

Общие положения:

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

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

Полная версия требований представлена на сайте журнала.