

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ

*Фенотип иммунных клеток
опухолевой стромы при раке
предстательной железы*

*Полнотранскриптомный анализ
опухоли молочной железы
в процессе неоадъювантной
химиотерапии*

*Экспрессия REDD1 в клетках рака
молочной железы*

*Прогностическая значимость
аббераций хромосомы 8
у пациентов с увеальной
меланомой*

ТОМ 9 № 1
2022

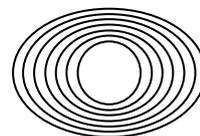


Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук. Журнал включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор, зарегистрирован в базе данных Scopus, в CrossRef, статьи индексируются с помощью идентификатора цифрового объекта (DOI).

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



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

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

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

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

Цель издания – дать читателям представление об актуальных направлениях современной молекулярной онкологии, 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.

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

1 Т О М 9
'22

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 О.В. Гончарук*

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

*Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых*

*коммуникаций (ПИ № ФС77-57560
от 08.04.2014)*

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

**Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых
рекламных материалов.**

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

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

Успехи молекулярной онкологии.
2022. Том 9. № 1. 1–64.
Сдано в печать: 00.00.2022.
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2022.

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562.
Отпечатано в типографии
«Мэйл Текнолоджи».
105082, Москва, Переведеновский
пер., 13, стр. 16.
Тираж 1000 экз. Бесплатно.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

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

Кжышкова 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 Минобрнауки России (Москва, Россия)

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

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

Щербakov 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)

Гуревич 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)

Зарилде 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)

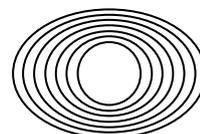
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

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 Scopus data base, CrossRef, its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

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

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

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



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

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

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

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

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

FOUNDED IN 2014

1 Vol. 9
'22

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, Bld. 15
24 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 O.V. Goncharuk

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

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

Technologies, and Mass Media
(III No. ΦС77-57560
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.
2022. Vol. 9 No. 1. 1–64.

Submitted: 00.00.2022.

© PH "ABV-Press", 2022
Pressa Rossii catalogue index: 93562.

Printed at the Mail Technology Ltd
Bld. 16, 13 Perevedensky lane,
Moscow 105082.

1000 copies.

Free distribution.

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

EXECUTIVE EDITOR

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

EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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)

Kzhyshevskaya 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)

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ж У Р Н А Л Ы

Scopus

ОНКОУРОЛОГИЯ

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Scopus

АНДРОЛОГИЯ И ГЕНИТАЛЬНАЯ ХИРУРГИЯ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Scopus

РУССКИЙ ЖУРНАЛ ДЕТСКОЙ НЕВРОЛОГИИ

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Scopus

Нервно-мышечные БОЛЕЗНИ

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ОНКОПАТОЛОГИЯ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

КЛИНИЦИСТ

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal

САРКОМЫ

костей, мягких тканей
и опухоли кожи

СА

A Cancer Journal
for Clinicians.
Русское издание

Scopus

Опухоли ГОЛОВЫ и ШЕИ

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
научно-практический
рецензируемый
журнал

Scopus

ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Scopus

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

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

Scopus

О П У Х О Л И ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

НЕЙРОХИРУРГИЯ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Тазовая хирургия И ОНКОЛОГИЯ

ИЗДАНИЕ
для специалистов в области
диагностики и лечения
колоректального рака

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Г А З Е Т Ы

Онкология Сегодня

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЕ ИЗДАНИЕ ДЛЯ ОНКОЛОГОВ

Урология сегодня

специализированное издание для урологов

СОВРЕМЕННАЯ
КАРДИОЛОГИЯ



ПЕДИАТРИЯ
СЕГОДНЯ | СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ГАЗЕТА
ДЛЯ ПЕДИАТРОВ



Акушерство
и гинекология
СЕГОДНЯ
www.abvpress.ru

Гастроэнтерология
СЕГОДНЯ

Московская
ЭНДОКРИНОЛОГИЯ
СЕГОДНЯ



НЕВРОЛОГИЯ
СЕГОДНЯ | СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ГАЗЕТА
ДЛЯ НЕВРОЛОГОВ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

| | |
|---|-----------|
| <i>П.А. Подлесная, О.В. Ковалева, М.А. Рашидова, Д.В. Самойлова, А.А. Петренко, В.В. Мочальникова, А.Н. Грачев</i> | |
| Клиническая значимость фенотипа иммунных клеток опухолевой стромы рака предстательной железы | 8 |
| <i>М.С. Князева, В.А. Загоруйко, А.В. Хохлова, И.В. Назарова, А.В. Шалаев, Е.И. Сидина, Л.М. Забегина, А.С. Артемьева, А.К. Носов, С.А. Проценко, А.В. Малек</i> | |
| Уровень экспрессии miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-367, miR-371, miR-372, miR-373, miR-10b, miR-21 и miR-93 клетками различных гистотипов герминогенных опухолей яичка | 20 |
| <i>М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов, Н.В. Литвяков</i> | |
| Полнотранскриптомный анализ опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии: связь с ответом на предоперационную химиотерапию | 33 |
| <i>Д.Д. Григорьева, Е.М. Жидкова, Е.С. Лылова, Д.В. Демина, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая</i> | |
| Ингибирование глюкокортикоидиндуцированной экспрессии REDD1 рапамицином в клетках рака молочной железы | 42 |
| <i>Л.М. Борисова, В.Н. Осипов, И.С. Голубева, М.П. Киселева, Д.А. Хоченков, А.А. Вартанян</i> | |
| Производные 3-гидроксихиназолина, аналоги эрастина, индуцируют ферроптоз в клетках карциномы молочной железы | 48 |
| <i>В.А. Яровая, А.А. Яровой, Л.В. Чудакова, И.А. Левашов, А.Р. Зарецкий</i> | |
| Комплексный анализ прогностической значимости аберраций хромосомы 8 у пациентов с увеальной меланомой | 57 |
| ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ | 64 |

EXPERIMENTAL REPORTS

| | |
|---|-----------|
| <i>P.A. Podlesnaya, O.V. Kovaleva, M.A. Rashidova, D.V. Samoiloova, A.A. Petrenko, V.V. Mochalnikova, A.N. Gratchev</i> | |
| Clinical significance of the phenotype of immune cells of the tumor stroma of prostate cancer | 8 |
| <i>M.S. Knyazeva, V.A. Zagoruiko, A.V. Khokhlova, I.V. Nazarova, A.V. Shalaev, E.I. Sidina, L.M. Zabegina, A.S. Artemyeva, A.K. Nosov, S.A. Protsenko, A.V. Malek</i> | |
| Expression of miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-367, miR-371, miR-372, miR-373, miR-10b, miR-21 and miR-93 in cells of different histotypes of testicular germ cell tumors | 20 |
| <i>M.K. Ibragimova, M.M. Tsyganov, N.V. Litviakov</i> | |
| Whole transcriptome analysis of breast tumors during neoadjuvant chemotherapy: association with response to preoperative chemotherapy | 34 |
| <i>D.D. Grigorieva, E.M. Zhidkova, E.S. Lylova, D.V. Demina, K.I. Kirsanov, G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, E.A. Lesovaya</i> | |
| Inhibition of glucocorticoid-induced <i>REDD1</i> expression by rapamycin in breast cancer cells | 42 |
| <i>L.M. Borisova, V.N. Osipov, I.S. Golubeva, M.P. Kiseleva, A.A. Vartanyan</i> | |
| 3-Hydroxyquinazoline derivatives, analogues of erastin, induced ferroptosis in breast cancer cells. | 48 |
| <i>V.A. Yarovaya, A.A. Yarovoy, L.V. Chudakova, I.A. Levashov, A.R. Zaretskiy</i> | |
| Comprehensive analysis of chromosome 8 abnormalities and its prognostic value in patients with uveal melanoma | 57 |
| INFORMATION FOR AUTHORS | 64 |

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-8-19



Клиническая значимость фенотипа иммунных клеток опухолевой стромы рака предстательной железы

П.А. Подлесная, О.В. Ковалева, М.А. Рашидова, Д.В. Самойлова, А.А. Петренко, 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: Полина Алексеевна Подлесная polina.pod@yandex.ru

Введение. Рак предстательной железы на сегодняшний день является наиболее часто диагностируемым онкологическим заболеванием среди мужского населения и занимает 5-е место в мире по показателям смертности среди злокачественных новообразований. Известно, что микроокружение опухоли играет большую роль в патогенезе заболевания. Накоплено много данных, свидетельствующих о том, что клетки воспалительного инфильтрата опухоли участвуют в возникновении, прогрессии и ответе на лечение в случаях рака предстательной железы. Однако их роль в контексте прогрессии заболевания еще не определена. В статье представлено исследование фенотипа воспалительного инфильтрата рака предстательной железы и его ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками пациентов.

Цель исследования – определение особенностей воспалительного инфильтрата рака предстательной железы и его ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками пациентов с данным заболеванием.

Материалы и методы. В исследование были включены образцы опухолей, полученные от 31 пациента с раком предстательной железы. С помощью иммуногистохимического исследования проанализирована экспрессия CD3, CD8, FoxP3, CD68, PU.1, CD204, CD163, IDO1 и PD-L1 (лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1). Для определения взаимосвязи маркеров и клинико-морфологических характеристик пациентов использовались непараметрический критерий Манна–Уитни и точный критерий Фишера. Для анализа корреляций между содержанием клеток различных фенотипов применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Во всех анализах значение $p \leq 0,05$ считалось статистически значимым.

Результаты. В ходе исследования определены особенности стромы рака предстательной железы. Было продемонстрировано, что повышенное содержание CD204+клеток ассоциировано с более старшим возрастом пациентов ($p = 0,0026$), а количество CD163+ и CD8+клеток – с отсутствием метастазов в регионарные лимфатические узлы ($p = 0,0067$ и $p = 0,0069$ соответственно). Показано, что PU.1 может быть использован как общий маркер макрофагов. Также мы выявили достоверные корреляции уровня PU.1 с PD-L1 в строме ($r = 0,421$; $p = 0,018$), IDO1 в строме ($r = 0,557$; $p = 0,001$) и опухолевых клетках ($r = 0,393$; $p = 0,029$), а также CD68 с IDO1 ($r = 0,535$; $p = 0,002$) и CD163 с PD-L1 и IDO1 в строме ($r = 0,399$; $p = 0,026$ и $r = 0,220$; $p = 0,026$ соответственно).

Заключение. Были исследованы характеристики стромы рака предстательной железы. Полученные данные указывают на то, что основными клетками, экспрессирующими PD-L1 и IDO1 в строме опухоли, в случае рака предстательной железы являются макрофаги, инфильтрирующие опухоль. Повышенная экспрессия IDO1 в опухолевой ткани ассоциирована с иммуносупрессорным фенотипом воспалительного инфильтрата. Тот факт, что количество макрофагов прямо коррелирует с количеством Т-лимфоцитов в строме рака предстательной железы, а уровень содержания макрофагов 2-го типа – с цитотоксическими Т-клетками, свидетельствует о взаимодействии механизмов врожденного и приобретенного иммунитета в процессе прогрессии опухоли.

Ключевые слова: рак предстательной железы, микроокружение опухоли, воспалительный инфильтрат, строма, Т-лимфоциты, макрофаги

Для цитирования: Подлесная П.А., Ковалева О.В., Рашидова М.А. и др. Клиническая значимость фенотипа иммунных клеток опухолевой стромы рака предстательной железы. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(1):8–19. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-8-19.

Clinical significance of the phenotype of immune cells of the tumor stroma of prostate cancer

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

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

Contacts: Polina Alekseevna Podlesnaya polina.pod@yandex.ru

Introduction. Prostate cancer is by far the most frequently diagnosed cancer among the male population and ranks fifth in the world in terms of mortality rates among malignant neoplasms. Today it is known that the tumor microenvironment plays an important role in the pathogenesis of the disease. Abundant data has accumulated indicating that cells of the inflammatory infiltrate of the tumor are involved in the onset, progression and response to treatment in cases of prostate cancer. However, their role in the context of disease progression has not yet been determined. In this work, we studied the phenotype of inflammatory infiltrate of prostate cancer and its association with the clinical and morphological characteristics of patients.

The study objective is to determine the features of the inflammatory infiltrate of prostate cancer and its association with the clinical and morphological characteristics of patients with this disease.

Materials and methods. The study included tumor samples obtained from 31 patients with prostate cancer. The expression of CD3, CD8, FoxP3, CD68, PU.1, CD204, CD163, IDO1, PD-L1 (programmed death-ligand 1) was assessed by immunohistochemistry. The relationship between markers and clinical and morphological characteristics was assessed using the nonparametric Mann–Whitney test and Fisher’s exact test. Spearman’s rank correlation coefficient was used to analyze the correlations between contents of cells of different phenotypes. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. This study describes the features of the stroma of prostate cancer. We have shown that an increased content of CD204+ cells is associated with an older age of patients ($p = 0.0026$), and the number of CD163+ and CD8+ cells with no metastases to regional lymph nodes ($p = 0.0067$ and $p = 0.0069$, respectively). It has been shown that PU.1 can be used as a general marker of macrophages. We also found significant correlations between the level of PU.1 and PD-L1 in the stroma ($r = 0.421$; $p = 0.018$) and IDO1 in the stroma ($r = 0.557$; $p = 0.001$) and in tumor cells ($r = 0.393$; $p = 0.029$), CD68 with IDO1 in the stroma ($r = 0.535$; $p = 0.002$), CD163 with PD-L1 and IDO1 in the stroma ($r = 0.399$; $p = 0.026$ and $r = 0.220$; $p = 0.026$, respectively).

Conclusion. In this work, the characteristics of the stroma of prostate cancer were investigated. Our data indicate that tumor associated macrophages are the main cells expressing PD-L1 and IDO1 in the tumor stroma in the case of prostate cancer. Increased expression of IDO1 in tumor tissue is associated with the immunosuppressive phenotype of the inflammatory infiltrate. The fact that the number of macrophages directly correlates with the number of T-lymphocytes in the prostate stroma, and the number of M2 macrophages with cytotoxic T-cells indicates the interaction of the mechanisms of innate and acquired immunity during the progression of prostate cancer.

Key words: prostate cancer, microenvironment, inflammatory infiltrate, stroma, T-lymphocytes, macrophages

For citation: Podlesnaya P.A., Kovaleva O.V., Rashidova M.A. et al. Clinical significance of the phenotype of immune cells of the tumor stroma of prostate cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(1): 8–19. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-8-19.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день рак предстательной железы (РПЖ) занимает 5-е место в мире среди причин смертности, связанных с онкологическими заболеваниями, и 1-е место по частоте встречаемости среди злокачественных новообразований у мужчин [1]. Он относится к гормонозависимым формам опухолей, появление и прогрессирование которых связано с активностью рецепторов андрогенов и увеличением концентрации мужских половых гормонов [2]. Наиболее распространенным гистологическим типом опухолей предстательной железы (ПЖ) является аденокарцинома. Другие подтипы встречаются довольно редко и включают в себя уротелиальную, мелкоклеточную, плоскоклеточную и базально-клеточную карциномы.

Развитие РПЖ начинается с формирования интраэпителиальной неоплазии, которая в большинстве случаев служит отправной точкой развития аденокарциномы. Выделяют андрогенозависимую и не зависящую от гормонов формы аденокарциномы ПЖ, при этом последняя относится к наиболее поздним стадиям заболевания [3]. Основными путями прогресси-

рования РПЖ считаются экстракапсулярное расширение, метастазирование в тазовые лимфатические узлы, являющиеся регионарными для данной локализации, а также отдаленное метастазирование в легкие и кости [4]. Кроме того, для РПЖ характерна перинеуральная инвазия. Ее наличие у пациентов после радикальной простатэктомии повышает риск прогрессирования заболевания в 2 раза [5].

Диагностика РПЖ включает в себя определение уровня простатического специфического антигена (ПСА) в сыворотке крови и ультразвуковое исследование. Для подтверждения диагноза проводят биопсию ПЖ, что на сегодняшний день является «золотым стандартом» выявления злокачественных новообразований данной локализации [6]. Пациенты с установленным на основании биопсии диагнозом РПЖ проходят обследование для определения клинической стадии заболевания в соответствии с международной классификацией Tumor, Nodus and Metastasis (TNM) и гистопатологической градацией (степенью дифференцировки) данной опухоли по шкале Глисона. Эта шкала используется исключительно для аденокарциномы

и плоскоклеточной карциномы. Индекс Глисона является суммой степени дифференцировки клеток преобладающего и 2-го по распространенности компонента опухоли. Более высокому значению этого индекса соответствует опухоль большей степени злокачественности, обладающая выраженным метастатическим потенциалом [7]. Поскольку РПЖ относится к гормоночувствительным злокачественным новообразованиям, стандартом лечения этого заболевания является андрогенная депривация. Однако данные литературы свидетельствуют о том, что длительная гормонотерапия зачастую приводит к возникновению фенотипа кастрационно-резистентного РПЖ, отличающегося повышенной степенью злокачественности и ассоциированного с плохим прогнозом [8].

К оперативным способам терапии РПЖ относятся радикальная простатэктомия и брахитерапия (введение в ткань ПЖ радиоактивных зерен ^{125}I , ^{103}Pd или ^{192}Ir). Успех лечения во многом зависит от природы опухолевой ткани. На сегодняшний день известно, что большую роль в патогенезе заболевания играет микроокружение опухоли [9]. Имеется большое количество данных, свидетельствующих о том, что клетки воспалительного инфильтрата опухоли, особенно макрофаги и Т-клетки, участвуют в возникновении, прогрессии и ответе на лечение при РПЖ [10]. Однако роль иммунных клеток, входящих в состав стромы РПЖ, в контексте прогрессии заболевания еще не определена. Известно, что эта опухоль обладает сложным иммуносупрессивным микроокружением и пока плохо реагирует на иммунотерапию [11]. Получение новых данных об особенностях стромы РПЖ поможет повысить терапевтический эффект иммунотерапевтических препаратов у пациентов со злокачественными новообразованиями этой локализации [12].

Цель исследования — изучить особенности воспалительного инфильтрата опухолей РПЖ и его ассоциацию с клинико-морфологическими характеристиками пациентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы для анализа были получены от пациентов с аденокарциномой ПЖ, перенесших радикальную простатэктомию в Научно-исследовательском институте клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Все исследования выполнены в соответствии со стандартами этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 г., ее последующими изменениями и сопоставимыми нормами этики. В исследование вошел 31 образец аденокарциномы ПЖ, полученный от пациентов 48–72 лет (средний возраст больных — 60 лет). Предоперационный уровень ПСА был в диапазоне от 4,4 нг/мл до 63 нг/мл (среднее значение — 16,7 нг/мл). У всех больных отсутствовали отдаленные метастазы. Материал проходил гистологическую ве-

рификацию в отделе патологической анатомии опухолей человека Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина и охарактеризован в соответствии с TNM-классификацией. Клинико-морфологические характеристики пациентов с РПЖ представлены в табл. 1.

Таблица 1. Клинико-морфологические характеристики пациентов с раком предстательной железы

Table 1. Clinical and morphological characteristics of patients with prostate cancer

| Показатель Parameter | Число пациентов, абс. (%) Number of patients, abs. (%) |
|---|---|
| Стадия: Stage: | |
| I–II | 15 (48) |
| III–IV | 16 (52) |
| Размер опухоли (T): Tumor size (T): | |
| T1–2 | 16 (52) |
| T3–4 | 15 (48) |
| Наличие регионарных метастазов (N): Nodal status (N): | |
| N0 | 28 (90) |
| N+ | 3 (10) |
| Степень дифференцировки по шкале Глисона: Differentiation grade on the Gleason scale: | |
| 5–6 | 24 (77) |
| 7 | 7 (23) |
| Возраст, лет: Age, years: | |
| ≤ 60 | 14 (45) |
| > 60 | 17 (55) |
| Уровень простатического специфического антигена, нг/мл: Prostate specific antigen level, ng/ml: | |
| ≤16,7 | 22 (71) |
| >16,7 | 9 (29) |

Иммуногистохимический анализ на срезах опухолевой ткани выполняли по стандартному протоколу. Первичные антитела Ki-67 (клон GM010; «ПраймБиоМед», Россия, Москва), p63 (клон 3A10, «ПраймБиоМед», Россия, Москва), AMACR (клон G8, «ПраймБиоМед», Россия, Москва), CD8 (клон C8/144B, Dako, США), CD3 (polyclonal, Genemed, США), FoxP3 (клон D2W8E, Cell Signaling Technology, США), CD163 (Clone 10D6, BIOCARE Medical, США), CD204 (polyclonal, Sigma-Aldrich, США), CD68 (трансмембранный гликопротеин 1-го типа) (клон GR021, Genemed, США), PU.1 (клон PBM-4G6, «ПраймБиоМед», Россия, Москва), iNOS (синтаза оксида азота) (клон SP126, Sigma-Aldrich, США), IDO1 (индолеамин-пиррол-2,3-диоксигеназа 1) (клон D5j4E, Cell Signaling Technology, США), PD-L1 (клон E1L3N, Cell Signaling

Technology, США) инкубировали в течение 30 мин. Демаскировка антигена проводилась при помощи буфера Tris-EDTA pH 9.0 («ПраймБиоМед», Россия, Москва). Для детекции использовали универсальную двухкомпонентную систему PrimeVision, козы анти-тела к IgG мыши/кролика, пероксидазе хрена (HRP) («ПраймБиоМед», Россия, Москва) согласно инструкции производителя.

Оценку окрашивания выполняли при помощи микроскопа Olympus BX53 ($\times 400$) и программного обеспечения INFINITY ANALYZE (версия 6.2.0) путем прямого подсчета окрашенных клеток в 5 независимых полях зрения.

Для статистического анализа полученных результатов использовали программное обеспечение GraphPad Prism v. 8. Оценку взаимосвязи маркеров и клинико-морфологической характеристики пациентов производили с помощью определения непараметрического критерия Манна–Уитни и точного критерия Фишера. Для анализа корреляций между содержанием клеток различных фенотипов использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Во всех анализах значение $p \leq 0,05$ считалось статистически значимым. На момент проведения исследования все пациенты оставались живы, в связи с чем провести анализ выживаемости не представлялось возможным.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия маркеров Т-клеток в строме опухолей рака предстательной железы. Для анализа количества Т-клеток, ассоциированных с опухолью, и их фенотипического состава мы проанализировали экспрессию CD3, CD8, FoxP3 в строме. CD3 использовался как общий маркер Т-клеток, CD8 – в качестве маркера цитотоксических Т-лимфоцитов, а FoxP3 – в качестве маркера регуляторных, иммуносупрессорных Т-клеток. Экспрессия CD3 и CD8 наблюдалась в 100 % исследованных образцов, в то время как экспрессия FoxP3 была обнаружена только в 39 % случаев. Далее мы проанализировали ассоциацию экспрессии исследуемых маркеров с клинико-морфологической характеристикой пациентов. Полученные данные представлены на рис. 1.

В результате исследования было выявлено, что уровень содержания CD8⁺-Т-лимфоцитов выше у пациентов с отсутствием метастазов ($p = 0,0069$), а у пациентов с меньшей степенью дифференцировки опухоли по шкале Глисона наблюдается тенденция к увеличению содержания FoxP3⁺-Т-лимфоцитов в строме опухоли. Общее содержание CD3⁺-Т-клеток значимо выше у больных с более низким значением ПСА.

Экспрессия маркеров макрофагов в строме опухоли РПЖ. Для анализа количества макрофагов, ассоциированных с опухолью, и их фенотипического состава мы использовали несколько маркеров – CD68 (трансмембранный гликопротеин 1-го типа) и PU.1 (транскрипционный фактор) в качестве общих маркеров макро-

фагов. Для идентификации макрофагов 2-го типа (M2) применяли маркер CD204, являющийся сквенджер-рецептором класса А типа 1, участвующим в метаболизме липидов, атерогенезе, подавлении провоспалительного ответа, опосредованного Toll-подобным рецептором 4. Также использовали маркер M2 макрофагов CD163, являющийся сквенджер-рецептором, участвующим в транспорте комплексов гемоглобина, повышении уровня кальция в клетке, синтезе инозитолтрифосфата и секреции интерлейкина 6 и CSF1 (колониестимулирующего фактора 1). Экспрессия данных маркеров наблюдалась в макрофагах стромы в 100 % исследуемых образцов (рис. 2). Следует отметить, что для идентификации макрофагов 1-го типа (M1) мы использовали маркер IDO1 – фермент, участвующий в метаболизме триптофана в строме опухоли. Результаты анализа ассоциации CD68, PU.1, CD204 и CD163 с клинико-морфологической характеристикой пациентов представлены на рис. 2.

Выявлено, что более высокий уровень содержания CD204⁺-макрофагов в строме опухоли ассоциирован с возрастом пациентов ($p = 0,0026$), а содержание CD163⁺ – с отсутствием метастазов ($p = 0,0067$).

Экспрессия PD-L1 и IDO1 в опухолях предстательной железы. Известно, что некоторые стромальные маркеры помимо стромы могут экспрессироваться непосредственно в опухолевых клетках. К таким маркерам относятся, например, IDO1 и PD-L1. Мы провели анализ ассоциации экспрессии данных маркеров с клинико-морфологическими характеристиками пациентов. Для этого образцы были разделены на 2 группы в зависимости от наличия или отсутствия экспрессии данных белков в клетках опухоли или стромы РПЖ. Полученные данные представлены в табл. 2.

Экспрессия PD-L1 наблюдалась у 71 % пациентов, причем в опухолевых клетках она была выявлена в 42 %, а в строме – в 55 % исследуемых образцов. Следует отметить, что одновременная экспрессия этого маркера как в опухолевых, так и в стромальных клетках наблюдалась у 25 % больных. Ассоциация экспрессии PD-L1 с какими-либо клинико-морфологическими характеристиками выявлена не была. Экспрессия IDO1 наблюдалась у 90 % пациентов и также не была ассоциирована с их клинико-морфологическими характеристиками. Экспрессия этого маркера в опухолевой ткани была выявлена у 61 %, а в строме – у 77 % больных. Одновременная экспрессия IDO1 как в строме, так и в опухолевых клетках наблюдалась у 48 % пациентов.

Корреляционный анализ клеточного состава стромы опухолей рака предстательной железы. Далее мы провели корреляционный анализ содержания различных типов иммунных клеток в строме опухоли РПЖ (рис. 3).

Выявлено, что содержание PU.1⁺-макрофагов прямо коррелирует с содержанием CD3⁺-Т-клеток ($r = 0,375$; $p = 0,038$), CD68⁺-макрофагов ($r = 0,537$;

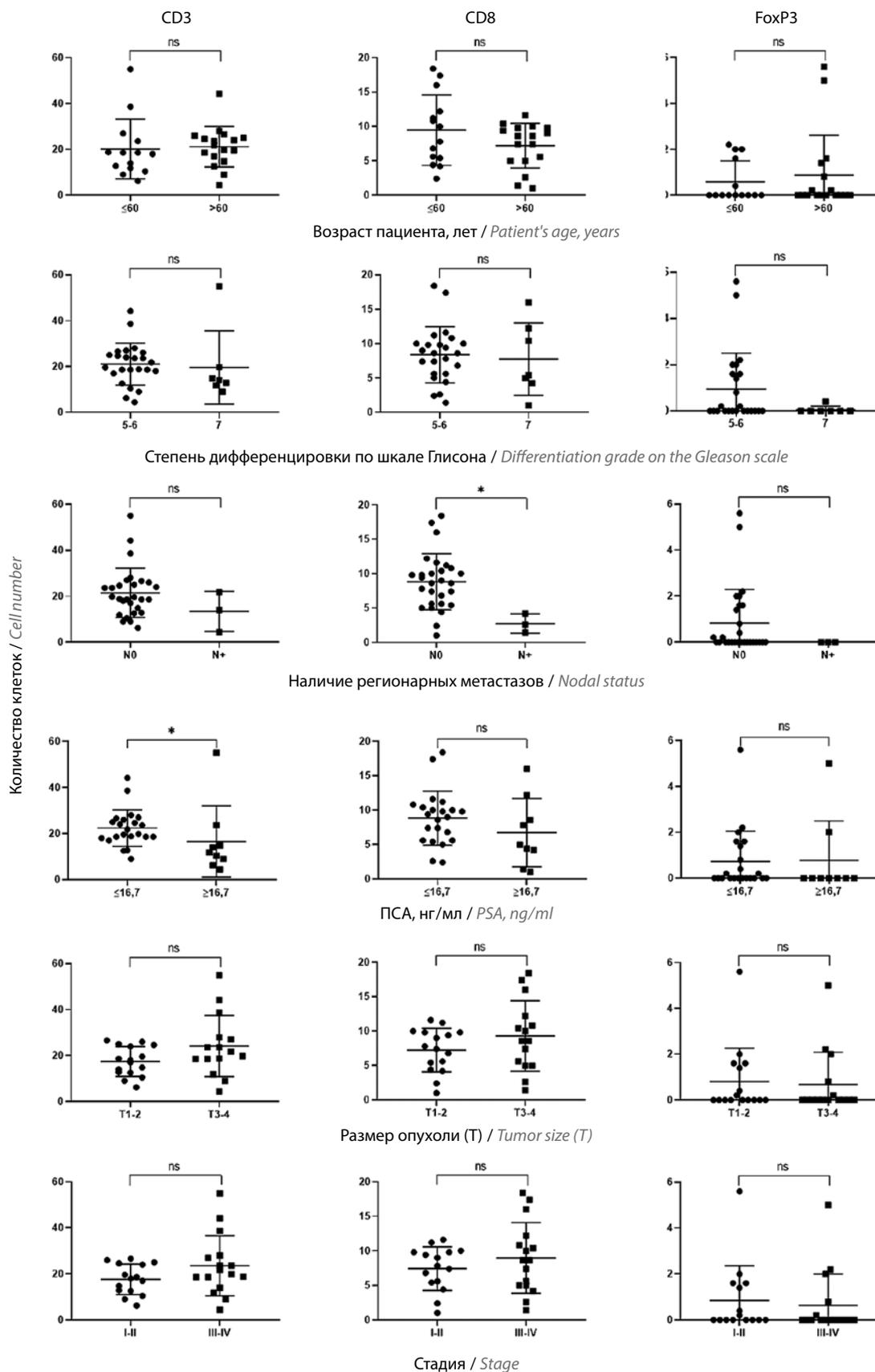


Рис. 1. Анализ ассоциации экспрессии CD3, CD8 и FoxP3 с клинико-морфологическими характеристиками пациентов. ПСА – простатический специфический антиген. * $p < 0,05$ – статистически значимо; ns – статистически незначимо

Fig. 1. Analysis of the association of CD3, CD8, FoxP3 expression with clinical and morphological characteristics of patients. PSA – prostatic specific antigen. * $p < 0.05$ – statistically significant; ns – not statistically significant

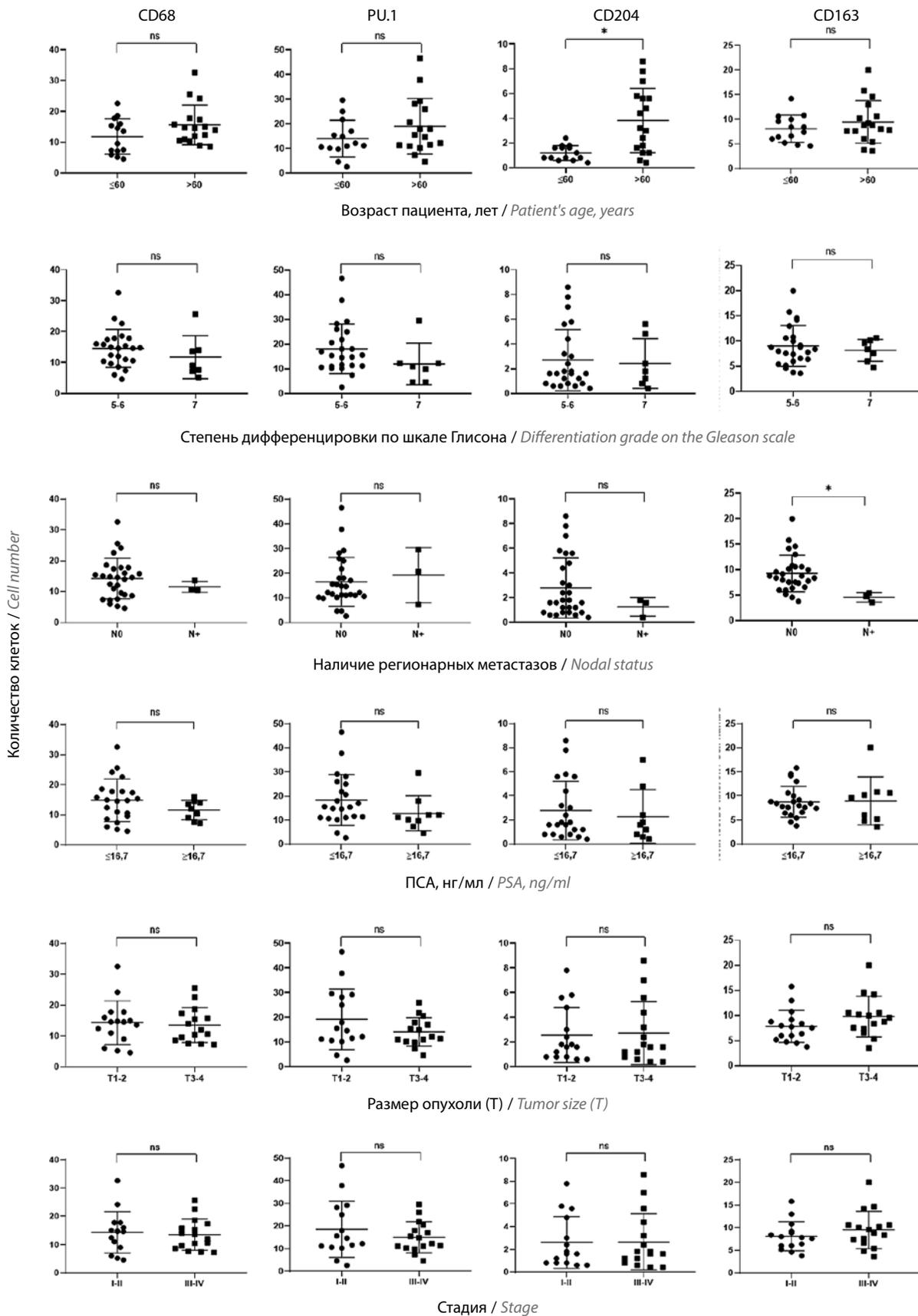


Рис. 2. Анализ ассоциации CD68, PU.1, CD204 и CD163 с клинико-морфологическими характеристиками пациентов. * $p < 0,05$ – статистически значимо; ns – статистически незначимо

Fig. 2. Analysis of the association of CD68, PU.1, CD204, CD163 expression with clinical and morphological characteristics of patients. * $p < 0.05$ – statistically significant; ns – not statistically significant

Таблица 2. Ассоциация экспрессии PD-L1 и IDO1 с клинико-морфологическими характеристиками пациентами с раком предстательной железы
Table 2. Association of PD-L1 and IDO1 expression with clinical and morphological characteristics of patients with prostate cancer

| Параметр Parameter | PD-L1/stroma, n PD-L1/stroma, n | | | p | PD-L1/опухоль, n PD-L1/tumor, n | | | p | IDO1/stroma, n IDO1/stroma, n | | | p | IDO1/опухоль, n IDO1/tumor, n | | | p |
|--|------------------------------------|---------|--------|---------|------------------------------------|--------|----------|--------|----------------------------------|---------|---------|--------|----------------------------------|-------|--|---|
| | PD-L1+ | PD-L1- | | | PD-L1+ | PD-L1- | | | IDO1+ | IDO1- | | | IDO1+ | IDO1- | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Стадия: Stage: I-II III-IV | 7 10 | 8 6 | 0,480 | 5 8 | 10 8 | 0,473 | 12 12 | 3 4 | >0,999 | 8 11 | 7 5 | 0,473 | | | | |
| Наличие регионарных метастазов (N): Nodal status (N): N- N+ | 15 2 | 13 1 | >0,999 | 12 1 | 16 2 | >0,999 | 22 2 | 6 1 | 0,545 | 17 2 | 11 1 | >0,999 | | | | |
| Размер опухоли (T): Tumor size (T): T1-2 T3-4 | 8 9 | 8 6 | 0,722 | 6 7 | 10 8 | 0,722 | 13 11 | 3 4 | 0,685 | 9 10 | 7 5 | 0,716 | | | | |
| Возраст, лет: Age, years: ≤60 >60 | 6 11 | 8 6 | 0,290 | 7 6 | 7 11 | 0,481 | 10 14 | 4 3 | 0,671 | 8 11 | 6 6 | 0,724 | | | | |
| Уровень простатического специфического антигена, нг/мл: Prostate specific antigen level, ng/ml: ≤14 >14 | 10 7 | 6 8 | 0,480 | 6 7 | 10 8 | 0,722 | 14 10 | 2 5 | 0,220 | 10 9 | 6 6 | >0,999 | | | | |
| Степень дифференцировки по шкале Глисона: Differentiation grade on the Gleason scale: 5-6 7 | 12 5 | 12 2 | 0,412 | 10 3 | 14 4 | >0,999 | 20 4 | 4 3 | 0,302 | 15 4 | 9 3 | >0,999 | | | | |

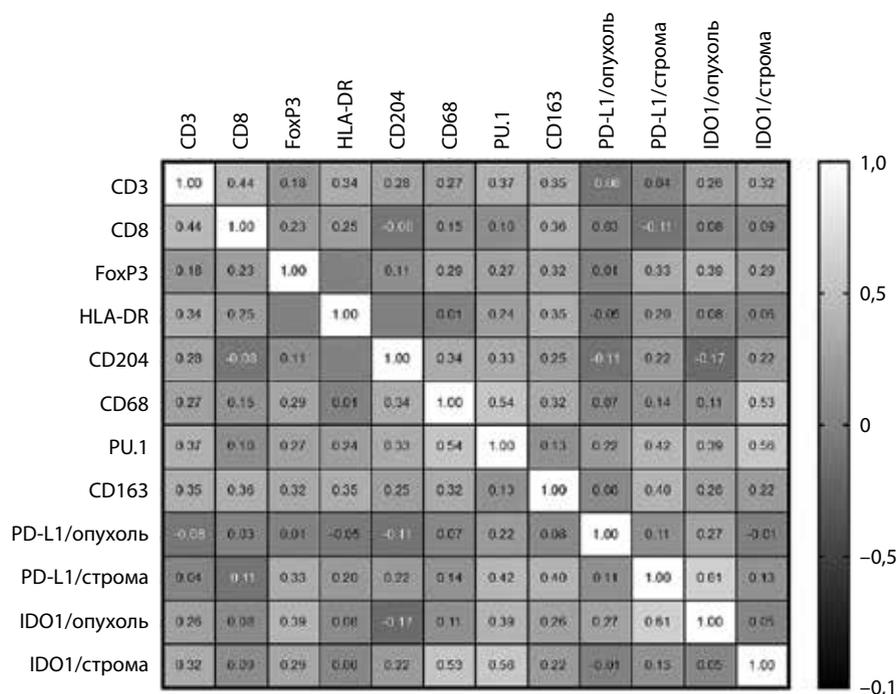


Рис. 3. Корреляционный анализ содержания различных типов клеток в строме опухолей предстательной железы
Fig. 3. Correlation analysis of the abundance of different types of cells in the stroma of prostate cancer

$p = 0,002$) и PD-L1+-клеток в строме ($r = 0,421$; $p = 0,018$) и IDO1 в строме и опухолевых клетках ($r = 0,557$; $p = 0,001$; $r = 0,393$; $p = 0,029$ соответственно). Количество CD68 также ассоциировалось с уровнем IDO1 в строме ($r = 0,535$; $p = 0,002$), а количество CD163+-макрофагов – с уровнем CD8 ($r = 0,358$; $p = 0,048$), PD-L1 ($r = 0,399$; $p = 0,026$) и IDO1 ($r = 0,220$; $p = 0,026$). Интересно, что количество PD-L1+-клеток опухоли прямо коррелировало с количеством IDO1+-опухолевых клеток ($r = 0,610$; $p < 0,001$), а FoxP3+-Т-клеток в строме опухоли также положительно коррелировало с количеством IDO1 в опухолевой ткани ($r = 0,388$; $p = 0,031$). Проведенный корреляционный анализ показал тесную взаимосвязь содержания клеток различного фенотипа и свидетельствует о необходимости проведения комплексного исследования клеток стромы для более полного понимания механизмов развития опухоли.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данное исследование посвящено изучению фенотипического разнообразия клеточного состава воспалительного инфильтрата стромы опухолей ПЖ и его ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками пациентов. На 1-м этапе работы мы оценили количество Т-клеток различных типов в образцах опухолей. Для оценки качественного и количественного состава Т-клеток в строме были использованы CD3, CD8 и FoxP3. CD3 является селективным маркером Т-клеток, расположенным на внешней поверхности мембраны и стабилизирующим Т-клеточный рецептор (TCR). Основной функцией TCR является

передача сигнала от антигенпрезентирующих клеток (АПК).

Результаты нашего исследования показали, что у пациентов с более низким уровнем ПСА в крови наблюдается большее число Т-лимфоцитов в опухолевом инфильтрате. CD8+-Т-лимфоциты обладают цитотоксическими свойствами. Их высокое содержание в строме опухоли в основном ассоциируется с хорошим прогнозом. Так, в случаях аденокарциномы легкого [13], гепатоцеллюлярной карциномы [14], рака желудка [15], фолликулярной лимфомы выявлена положительная корреляция повышенной концентрации CD8+-Т-клеток в строме опухоли с благоприятным прогнозом пациентов [16]. Малое количество CD8+ при онкологических заболеваниях, напротив, ассоциируется с худшим прогнозом. Анализ данных литературы показал, что нет единого мнения относительно роли CD8 в качестве прогностического маркера для РПЖ. Имеются сведения о том, что повышенная инфильтрация CD8+-Т-лимфоцитов коррелирует с плохим прогнозом пациентов с РПЖ [17, 18]. Также известно, что низкая плотность CD8+ ассоциирована с неудовлетворительным прогнозом больных с этим заболеванием, развитием метастазирования и риском возникновения рецидива [19], а повышенная плотность CD8+-Т-лимфоцитов – с лучшим прогнозом [20]. Согласно результатам нашего исследования как и данным литературы, CD8 может служить маркером благоприятного прогноза РПЖ в связи с тем, что высокое содержание CD8+-клеток ассоциировано с отсутствием регионарных метастазов у пациентов. FoxP3 является маркером регуляторных Т-клеток

(Treg). Известно, что этот белок имеет большое значение в дифференцировке и поддержании фенотипа иммуносупрессивных Treg. Согласно данным литературы роль опухоль-инфильтрирующих Treg в инициации и прогрессировании РПЖ до сих пор не определена.

Имеются сведения о том, что повышенная плотность FoxP3+-Т-лимфоцитов в случаях РПЖ ассоциирована с худшим прогнозом и более поздней стадией заболевания [21]. Сообщалось также о том, что в случае РПЖ количество FoxP3+-Т-клеток не коррелировало с исследуемыми параметрами (наличием мутации ERG, возрастом пациента, уровнем ПСА, стадией заболевания, степенью дифференцировки опухоли) [22]. Результаты нашего исследования также не выявили ассоциации FoxP3+-Treg с клинико-морфологическими характеристиками пациентов. Однако была обнаружена прямая корреляция FoxP3+-Т-лимфоцитов в строме опухоли с количеством IDO1+-опухолевых клеток. К. Kolijn и соавт. исследовали особенности эпителиально-мезенхимального перехода клеток РПЖ и пришли к выводу, что для него характерно повышение экспрессии IDO1 в опухолевой ткани, а также переход к иммуносупрессорному фенотипу опухолевого инфильтрата, характеризующегося повышенным содержанием FoxP3+-Treg на фоне снижения количества цитотоксических CD8+-Т-лимфоцитов. Эпителиально-мезенхимальный переход является важным этапом прогрессирования опухоли, способствует инвазии и метастазированию [23].

На сегодняшний день известно, что макрофаги в строме опухоли выполняют противоречивые функции в контексте канцерогенеза. По принципу Th1/Th2 дихотомии иммунного ответа, опосредованного Т-клетками, они также могут дифференцироваться на цитотоксический (M1) и регуляторный (M2) фенотипы [24]. Согласно данным литературы при РПЖ инфильтрация макрофагов в строму, особенно M2, способст-

вует развитию и метастазированию опухоли, а также формированию устойчивости к андрогенной абляции [25, 26].

Ранее мы показали, что PU.1 может быть использован в качестве общего макрофагального маркера для рака почки, пищевода и колоректального рака [27–29]. Результаты данного исследования подтверждают возможность применения PU.1 для выявления макрофагов и в строме РПЖ (рис. 4). Об этом также свидетельствуют данные корреляционного анализа, который выявил сильную прямую связь между содержанием PU.1+- и CD68+-клеток в строме опухоли ($r = 0,537$; $p = 0,002$).

Результаты недавнего метаанализа, посвященного роли макрофагов, ассоциированных с РПЖ, в развитии данного заболевания показали, что более высокая плотность макрофагов, ассоциированных с опухолью (MAO), связана с более низкой общей выживаемостью, более высокой оценкой по шкале Глисона, а также наличием как отдаленных, так и регионарных метастазов [30]. Авторы заключили, что плотность MAO увеличивается по мере прогрессирования РПЖ. Следует отметить, что в данный метаанализ были включены исследования с использованием в качестве маркеров CD68 и CD204.

В недавнем исследовании американских авторов, включавшем 81 пациента с РПЖ, была обнаружена обратная связь между количеством CD68+-MAO в ткани опухоли и клинической стадией, в то время как плотность MAO прямо коррелировала с более высоким индексом Глисона [31]. Также выявлена ассоциация повышенной плотности инфильтрации CD68+-макрофагов в опухолевой массе с более высоким уровнем ПСА [32]. Результаты нашего исследования показали значимую ассоциацию макрофагов CD204+ с возрастом пациентов: плотность CD204 была значимо выше у мужчин старшего возраста. Аналогичная ассоциация данного маркера наблюдалась у пациентов с глиомой

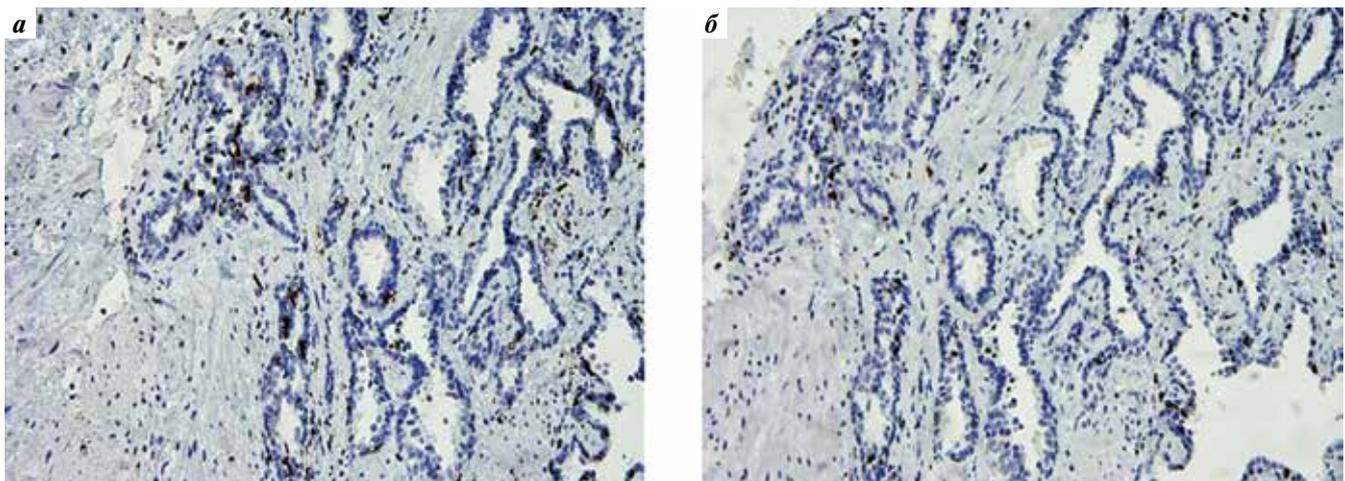


Рис. 4. Иммуногистохимический анализ экспрессии CD68 (а) и PU.1 (б) в образцах рака предстательной железы. $\times 100$
Fig. 4. Immunohistochemical analysis of the expression of CD68 (a) and PU.1 (b) in prostate cancer samples. $\times 100$

[33]. Ассоциация CD204 с возрастом пациентов со злокачественными опухолями других локализаций на сегодняшний день не описана. Согласно данным литературы прогностические маркеры РПЖ, ассоциированные с MAO, еще предстоит определить.

Опубликованы работы, свидетельствующие о том, что повышенная плотность M2, идентифицированных при помощи CD163 в строме РПЖ, ассоциирована с худшим прогнозом [34], экстракапсулярным распространением [25], более высокими показателями по шкале Глисона и частотой метастазирования [34]. Однако результаты нашего исследования показывают, что повышенная плотность CD163 ассоциирована с отсутствием метастазов в регионарные лимфатические узлы. Также мы обнаружили, что количество CD163+-макрофагов прямо коррелировало с количеством цитотоксических CD8+-Т-лимфоцитов и IDO1 в строме опухоли, являющегося маркером M1. Эти результаты согласуются с данными, полученными нами ранее в ходе исследования воспалительного инфильтрата опухолей пищевода [35], и позволяют предположить, что уход опухоли от иммунного надзора развивается при прогрессировании заболевания и отсутствует на его ранних этапах, о чем свидетельствует повышенная плотность цитотоксических макрофагов и Т-лимфоцитов в злокачественных новообразованиях более ранних стадий.

Получено большое количество данных, свидетельствующих о том, что экспрессия IDO1 является маркером плохого прогноза для многих форм злокачественных опухолей [36]. IDO1 – INF γ -индуцируемый фермент метаболизма триптофана, продукты которого оказывают существенное влияние на функционирование иммунной системы. Его гиперэкспрессия приводит к подавлению противоопухолевого иммунного ответа путем супрессии Т-эффекторных клеток и переключения иммунного ответа с Th1 на Th2 [37]. В контексте РПЖ роль IDO1 еще не определена. Этот фермент рассматривается как специфичный маркер заболевания, о чем свидетельствуют повышение его уровня в злокачественных опухолях ПЖ относительно гиперплазии и наличие корреляции с α -метилацилкоэнзим А рацемазой (AMACR) – известным маркером РПЖ [38].

Повышение уровня IDO1 в моче также рекомендуют рассматривать в качестве как прогностического, так и рецидивирующего биомаркера РПЖ [39, 40], а его увеличение в сыворотке крови и строме опухоли ПЖ ассоциируют с более поздней стадией заболевания и отсутствием эффекта от иммунотерапии ингибиторами PD-1 [41]. При анализе влияния экспрессии IDO1 на рост РПЖ на мышиной модели было показа-

но, что повышенный уровень этого маркера в сыворотке крови коррелировал с развитием опухоли, тогда как внутриопухолевая экспрессия не была ассоциирована с течением заболевания [42]. Данные литературы свидетельствуют о необходимости дальнейшего исследования экспрессии IDO1 для определения клинической значимости данного маркера в контексте РПЖ.

Согласно результатам нашего исследования экспрессия IDO1 не ассоциирована с какими-либо клинико-морфологическими характеристиками, однако уровень этого маркера как в строме, так и в опухоли прямо коррелирует с количеством MAO. Как было сказано выше, увеличение количества MAO в строме РПЖ ассоциируется с худшим прогнозом и течением заболевания. Мы также выявили прямую корреляцию уровня экспрессии IDO1 в опухолевых клетках с количеством иммуносупрессорных FoxP3+-Т-лимфоцитов ($p = 0,031$), способствующих прогрессии опухоли.

Наибольшая положительная корреляция наблюдалась между уровнем IDO1 в опухолевых клетках и PD-L1 в строме ($p < 0,001$). Связь лиганда PD-L1 с его рецептором PD-1 на поверхности Т-лимфоцитов вызывает гибель цитотоксических Т-клеток посредством апоптоза или анергии [43]. Иммунотерапия, направленная на подавление связи PD-1/PD-L1, в настоящее время демонстрирует хорошие результаты: наблюдается увеличение общей выживаемости и частоты объективных ответов у пациентов с различными типами опухолей. Однако эффективность иммунотерапии анти-PD-1/PD-L1 в случае РПЖ еще не доказана. Дело в том, что частота и клиническое значение экспрессии PD-1 и PD-L1 при данной патологии мало исследованы. Функциональная роль сигнального пути PD-1/PD-L1 в развитии и прогрессировании РПЖ также требует дальнейшего изучения [44]. Тот факт, что в результате нашего исследования экспрессия PD-L1 стромальными клетками прямо коррелировала с содержанием PU.1 и CD163, позволяет предположить, что в случае РПЖ экспрессия PD-L1 может быть обусловлена макрофагами, входящими в состав опухолевого инфильтрата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что фенотип клеток воспалительного инфильтрата РПЖ достаточно разнообразен и представлен большинством типов иммунных клеток. Выявленные в ходе работы особенности и ассоциации содержания различных типов клеток опухолевой стромы с клиническими характеристиками пациентов расширяют представления о прогрессировании данного заболевания и помогают в поиске новых терапевтических стратегий.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bahmad H.F., Jalloul M., Azar J. et al. Tumor microenvironment in prostate cancer: toward identification of novel molecular biomarkers for diagnosis, prognosis, and therapy development. *Front Genet* 2021;12:652747. DOI: 10.3389/fgene.2021.652747.
- Watson P.A., Arora V.K., Sawyers C.L. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15(12):701–11. DOI: 10.1038/nrc4016.
- Testa U., Castelli G., Pelosi E. Cellular and molecular mechanisms underlying prostate cancer development: therapeutic implications. *Medicines (Basel)* 2019;6(3):82. DOI: 10.3390/medicines6030082.
- Budnik J., Suri J., Bates J.E. et al. Prognostic significance of sites of visceral metastatic disease in prostate cancer: a population-based study of 12,180 patients. *Clin Genitourin Cancer* 2019;17(4):260–7. DOI: 10.1016/j.clgc.2019.03.020.
- Лаптева Т.О. Патоморфологическая оценка простаты после радикальной простатэктомии. *Вестник урологии* 2019;7(1):74–83. [Lapteva T.O. Pathomorphological evaluation of the prostate after radical prostatectomy. *Vestnik urologii = Bulletin of Urology* 2019;7(1):74–83. (In Russ.)]. DOI: 10.21886/2308-6424-2019-7-1-74-83.
- Welch H.G., Albertsen P.C. Reconsidering prostate cancer mortality – the future of PSA screening. *N Engl J Med* 2020;382(16):1557–63. DOI: 10.1056/NEJMms1914228.
- Nagpal K., Foote D., Liu Y. et al. Development and validation of a deep learning algorithm for improving Gleason scoring of prostate cancer. *NPJ Digit Med* 2019;2:48. DOI: 10.1038/s41746-019-0112-2.
- Lo C.H., Lynch C.C. Multifaceted roles for macrophages in prostate cancer skeletal metastasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9:247. DOI: 10.3389/fendo.2018.00247.
- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Sfanos K.S., Yegnasubramanian S., Nelson W.G., De Marzo A.M. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. *Nat Rev Urol* 2018;15(1):11–24. DOI: 10.1038/nrurol.2017.167.
- Nair S.S., Weil R., Dovey Z. et al. The Tumor microenvironment and immunotherapy in prostate and bladder cancer. *Urol Clin North Am* 2020;47(4S):e17–54. DOI: 10.1016/j.ucl.2020.10.005.
- Kwon J.T.W., Bryant R.J., Parkes E.E. The tumor microenvironment and immune responses in prostate cancer patients. *Endocr Relat Cancer* 2021;28(8):T95–107. DOI: 10.1530/ERC-21-0149.
- Ye S.L., Li X.Y., Zhao K., Feng T. High expression of CD8 predicts favorable prognosis in patients with lung adenocarcinoma: a cohort study. *Medicine (Baltimore)* 2017;96(15):e6472. DOI: 10.1097/MD.0000000000006472.
- Guo M., Yuan F., Qi F., Sun J. et al. Expression and clinical significance of LAG-3, FGL1, PD-L1 and CD8+T cells in hepatocellular carcinoma using multiplex quantitative analysis. *J Transl Med* 2020;18(1):306. DOI: 10.1186/s12967-020-02469-8.
- Chang W.J., Du Y., Zhao X. et al. Inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014;20(16):4586–96. DOI: 10.3748/wjg.v20.i16.4586.
- Sugimoto T., Watanabe T. Follicular lymphoma: The role of the tumor microenvironment in prognosis. *J Clin Exp Hematop* 2016;56(1):1–19. DOI: 10.3960/jslr.56.1.
- Petitprez F., Fossati N., Vano Y. et al. PD-L1 expression and CD8+ T-cell Infiltrate are associated with clinical progression in patients with node-positive prostate cancer. *Eur Urol Focus* 2019;5(2):192–6. DOI: 10.1016/j.euf.2017.05.013.
- Kaur H.B., Guedes L.B., Lu J. et al. Association of tumor-infiltrating T-cell density with molecular subtype, racial ancestry and clinical outcomes in prostate cancer. *Mod Pathol* 2018;31(10):1539–52. DOI: 10.1038/s41379-018-0083-x.
- Vicier C., Werner L., Huang Y. et al. Immune infiltrate with CD8 low or PDL1 high associated with metastatic prostate cancer after radical prostatectomy (RP). *J Clin Oncol* 2019;37(7):86. DOI: 10.1200/JCO.2019.37.7_suppl.86.
- Yang Y., Attwood K., Bshara W. et al. High intratumoral CD8+T-cell infiltration is associated with improved survival in prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *Prostate* 2021;81(1):20–8. DOI: 10.1002/pros.24068.
- Flammiger A., Weisbach L., Huland H. et al. High tissue density of FOXP3+ T cells is associated with clinical outcome in prostate cancer. *Eur J Cancer* 2013;49(6):1273–9. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.11.035.
- Kaczmarczyk-Sekuła K., Gałązka K., Głajcar A. et al. Prostate cancer with different ERG status may show different FOXP3-positive cell numbers. *Pol J Pathol* 2016;67(4):313–7. DOI: 10.5114/pjp.2016.65861.
- Kolijn K., Verhoef E.I., Smid M. et al. Epithelial-mesenchymal transition in human prostate cancer demonstrates enhanced immune evasion marked by IDO1 expression. *Cancer Res* 2018;78(16):4671–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3752.
- Ковалева О.В., Ефремов Г.Д., Михайленко Д.С. и др. Роль макрофагов, ассоциированных с опухолью в патогенезе почечно-клеточного рака. *Онкоурология* 2017;13(1):20–6. [Kovaleva O.V., Efremov G.D., Mikhaylenko D.S., et al. Role of tumor-associated macrophages in renal cell carcinoma pathogenesis. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2017;13(1):20–6. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9776-2017-13-1-20-26.
- Lanciotti M., Masieri L., Raspollini M.R. et al. The role of M1 and M2 macrophages in prostate cancer in relation to extracapsular tumor extension and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Biomed Res Int* 2014;2014:486798. DOI: 10.1155/2014/486798.
- Hu W., Qian Y., Yu F. et al. Alternatively activated macrophages are associated with metastasis and poor prognosis in prostate adenocarcinoma. *Oncol Lett* 2015;10(3):1390–6. DOI: 10.3892/ol.2015.3400.
- Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Samoilova D.V. et al. Immunosuppressive phenotype of esophagus tumors stroma. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2020;2020:5424780. DOI: 10.1155/2020/5424780.
- Ковалева О.В., Рашидова М.А., Самойлова Д.В. и др. Иммуносупрессорные особенности фенотипа стромы опухолей почки различных гистологических типов. *Онкоурология* 2020;16(2):29–35. [Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Samoilova D.V. et al. Immunosuppressive peculiarities of stromal cells of various kidney tumor types. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2020;16(2):29–35. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9776-2020-16-2-29-35.
- Ковалева О.В., Грачев А.Н., Подлесная П.А. и др. PU.1 – ядерный фактор иммунокомпетентных клеток стромы опухоли при колоректальном раке. *Клиническая и экспериментальная морфология* 2021;10(2):32–9. [Kovaleva O.V., Gratchev A.N., Podlesnaya P.A. et al. PU.1 is a nuclear factor of immunocompetent cells of tumor stroma in colorectal cancer. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya = Clinical and Experimental Morphology*

- 2021;10(2):32–39. (In Russ.)]. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.32–39.
30. Cao J., Liu J., Xu R. et al. Prognostic role of tumour-associated macrophages and macrophage scavenger receptor 1 in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8(47):83261–9. DOI: 10.18632/oncotarget.18743.
31. Shimura S., Yang G., Ebara S. et al. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. *Cancer Res* 2000;60(20):5857–61.
32. Nonomura N., Takayama H., Nakayama M. et al. Infiltration of tumour-associated macrophages in prostate biopsy specimens is predictive of disease progression after hormonal therapy for prostate cancer. *BJU Int* 2011;107(12):1918–22. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2010.09804.x.
33. Yuan Y., Zhao Q., Zhao S. et al. Characterization of transcriptome profile and clinical features of a novel immunotherapy target CD204 in diffuse glioma. *Cancer Med* 2019;8(8):3811–21. DOI: 10.1002/cam4.2312.
34. Erlandsson A., Carlsson J., Lundholm M. et al. M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer. *Prostate* 2019;79(4):363–9. DOI: 10.1002/pros.23742.
35. Ковалева О.В., Рашидова М.А., Самойлова Д.В. и др. Прогностическая значимость экспрессии CD204 и IDO1 в опухолях пищевода. *Успехи молекулярной онкологии* 2021;8(2):40–6. [Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Samoilova D.V. et al. Prognostic significance of CD204 and IDO1 expression in esophageal tumors. *Uspekh molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2021;8(2):40–6. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-2-40-46.
36. Zhai L., Ladomersky E., Lenzen A. et al. IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints. *Cell Mol Immunol* 2018;15(5):447–57. DOI: 10.1038/cmi.2017.143.
37. Munn D.H., Mellor A.L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol* 2013;34(3):137–43. DOI: 10.1016/j.it.2012.10.001.
38. Feder-Mengus C., Wyler S., Hudolin T. et al. High expression of indoleamine 2,3-dioxygenase gene in prostate cancer. *Eur J Cancer* 2008;44(15):2266–75. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.05.023.
39. Thüring M., Knuchel R., Picchetta L. et al. The prognostic value of indoleamine-2,3-dioxygenase gene expression in urine of prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy as first treatment of choice. *Front Immunol* 2020;11:1244. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01244.
40. Banzola I., Mengus C., Wyler S. et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase induced by IFN- γ and TNF- α as potential biomarker of prostate cancer progression. *Front Immunol* 2018;9:1051. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01051.
41. Zahm C.D., Johnson L.E., McNeel D.G. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and expression in prostate cancer following targeted immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2019;68(10):1661–9. DOI: 10.1007/s00262-019-02394-w.
42. Källberg E., Wikström P., Bergh A. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity influence tumor growth in the TRAMP prostate cancer model. *Prostate* 2010;70(13):1461–70. DOI: 10.1002/pros.21181.
43. Barber D.L., Wherry E.J., Masopust D. et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006;439(7077):682–7. DOI: 10.1038/nature04444.
44. Sharma M., Yang Z., Miyamoto H. Immunohistochemistry of immune checkpoint markers PD-1 and PD-L1 in prostate cancer. *Medicine (Baltimore)* 2019;98(38):e17257. DOI: 10.1097/MD.00000000000017257.

Вклад авторов

П.А. Подлесная: анализ данных литературы, получение экспериментальных данных, статистическая обработка данных, написание текста статьи;

О.В. Ковалева: формирование концепции исследования, статистическая обработка данных, написание текста статьи;

М.А. Рашидова, Д.В. Самойлова, А.А. Петренко: получение экспериментальных данных;

В.В. Мочальникова: подбор материала для исследования, получение экспериментальных данных;

А.Н. Грачев: формирование концепции исследования, написание текста статьи.

Authors' contribution

P.A. Podlesnaya: analysis of literature data, obtaining experimental data, statistical data processing, article writing;

O.V. Kovaleva: developing the research design, statistical data processing, article writing;

M.A. Rashidova, D.V. Samoilova, A.A. Petrenko: obtaining experimental data;

V.V. Mochalnikova: selection of material for research, obtaining experimental data;

A.N. Gratchev: developing the research design; article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

П.А. Подлесная / P.A. Podlesnaya: <https://orcid.org/0000-0003-2312-5546>

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>

А.А. Петренко / A.A. Petrenko: <https://orcid.org/0000-0001-6951-3996>

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 interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-09069).

Financing. The study was performed with the support of 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: 11.10.2021. **Принята к публикации:** 18.01.2022.

Article submitted: 11.10.2021. **Accepted for publication:** 18.01.2022.

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-20-32



Уровень экспрессии miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-367, miR-371, miR-372, miR-373, miR-10b, miR-21 и miR-93 клетками различных гистотипов герминогенных опухолей яичка

М.С. Князева, В.А. Загоруйко, А.В. Хохлова, И.В. Назарова, А.В. Шалаев, Е.И. Сидина, Л.М. Забегина, А.С. Артемьева, А.К. Носов, С.А. Проценко, А.В. Малек

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

Контакты: Анастасия Валерьевна Малек anastasia@malek.com

Введение. Герминогенные опухоли яичка являются относительно редким заболеванием. Высокая социальная значимость данной патологии обусловлена тем, что она встречается у больных молодого возраста. Современные схемы полихимиотерапии определяют потенциальную возможность излечения большинства пациентов даже при распространенном опухолевом процессе. Эффективность терапии оценивается путем мониторинга ряда маркеров (альфа-фетопротейна, хорионического гонадотропина человека и лактатдегидрогеназы), но низкая диагностическая специфичность этих молекул обуславливает необходимость разработки новых методов. В течение последних лет проводятся исследования возможности использования в качестве маркера герминогенных опухолей яичка циркулирующих микроРНК. Для создания и внедрения в практику технологий их анализа необходимо понять особенности экспрессионных изменений потенциально маркерных молекул в клетках различных гистологических вариантов герминогенных новообразований яичка.

Цель исследования – проанализировать экспрессию молекул микроРНК (miR-302/miR-367, miR-371/miR-373) в образцах герминогенных опухолей яичка различных гистологических типов.

Материалы и методы. В исследование были включены образцы герминогенных опухолей яичка ($n = 61$), в том числе семинома, эмбриональных карцином, тератом постпубертатного типа, опухолей желточного мешка, хорионкарцином, и образцы нормальной ткани ($n = 61$). Анализ проведен с помощью методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

Результаты. Описаны изменения экспрессии молекул кластера miR-302/miR-367, характерные для семинома, эмбриональных карцином и опухолей желточного мешочка, а также изменения экспрессии кластера miR-371/miR-373, универсальные для всех гистотипов, кроме хорионкарцином. Показано угнетение экспрессионной активности miR-10b и miR-145 в семиномах, эмбриональных карциномах и тератомах постпубертатного типа.

Заключение. Повышение уровней экспрессии miR-302b, miR-302d, miR-371a и снижение уровней экспрессии miR-10b, miR-145 характерны для наиболее часто встречающихся вариантов герминогенных опухолей яичка. Обнаруженные изменения существенны и могут привести к изменениям профиля циркулирующих микроРНК.

Ключевые слова: микроРНК, герминогенные опухоли яичка, обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция

Для цитирования: Князева М.С., Загоруйко В.А., Хохлова А.В. и др. Уровень экспрессии miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-367, miR-371, miR-372, miR-373, miR-10b, miR-21 и miR-93 клетками различных гистотипов герминогенных опухолей яичка. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(1):20–32. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-20-32.

Expression of miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-367, miR-371, miR-372, miR-373, miR-10b, miR-21 and miR-93 in cells of different histotypes of testicular germ cell tumors

M.S. Knyazeva, V.A. Zagoruiko, A.V. Khokhlova, I.V. Nazarova, A.V. Shalaev, E.I. Sidina, L.M. Zabegina, A.S. Artemyeva, A.K. Nosov, S.A. Protsenko, A.V. Malek

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

Contacts: Anastasia Valeryevna Malek anastasia@malek.com

Introduction. Testicular germ cell tumor is a relatively rare disease. Its high social significance is due to the fact that this pathology occurs in young patients. The standard schemes of polychemotherapy determine the potential possibility of effective treatment for most of the patients even with an advanced disease. Several circulating markers (alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotropin and lactate dehydrogenase) are being used for therapy monitoring, but the low diagnostic specificity of these molecules determines the need to develop new approaches. Over the past years, circulating microRNA, for instance miR-371a-3p, appeared to be promising marker for testicular germ cell tumor monitoring. However, to develop and to implement in practice the microRNA-based diagnostic technologies, it's necessarily to understand the features of the microRNA expression alterations specific for different histological types of testicular germ cell tumor.

The study objective – to evaluate changes in the expression of several potential marker microRNA molecules (miR-302/miR-367, miR-371/miR-373) in testicular germ cell tumor samples of various histological types.

Materials and methods. Testicular germ cell tumor samples ($n = 61$), including seminomas, embryonic carcinomas, post-pubertal teratomas, yolk sac tumors, chorioncarcinomas, and corresponding normal tissue samples ($n = 61$) were included in the study. The analysis of selected miRNA expression was performed by reverse transcription and polymerase chain reaction.

Results. We identified the changes in the expression profile of the miR-302/miR-367 cluster typical for seminomas, embryonic carcinomas, post-pubertal teratomas, yolk sac tumors and chorioncarcinomas, as well as changes in the expression profile of the miR-371/miR-373 cluster, universal for all histotypes except chorioncarcinomas. Inhibition of miR-10b and miR-145 expression in seminomas, embryonic carcinomas, and post-pubertal teratomas was demonstrated.

Conclusion. Activation of miR-302b, miR-302d, miR-371a expression and inhibition of miR-10b, miR-145 expression in the tissue of the most common variants of testicular germ cell tumor is a characteristic feature of these tumors. The detected changes are significant and can lead to corresponding changes in the profile of circulating microRNAs.

Key words: microRNA, testicular germ cell tumors, reverse transcription, polymerase chain reaction

For citation: Knyazeva M.S., Zagoruiko V.A., Khokhlova A.V. et al. Expression of miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-367, miR-371, miR-372, miR-373, miR-10b, miR-21 and miR-93 in cells of different histotypes of testicular germ cell tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(1):20–32. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-20-32.

ВВЕДЕНИЕ

Роль микроРНК в развитии герминогенных опухолей яичка (ГОЯ), диагностический потенциал этих молекул и возможности терапевтической модификации их экспрессии являются предметом многочисленных фундаментальных исследований [1]. Значение анализа miR-371a-3p для диагностики, контроля эффекта химиотерапии, качества лимфодиссекции и оценки риска рецидива является предметом клинических исследований (NCT04435756, NCT04914026). Анализ научной литературы по данному вопросу выявил ряд противоречий, которые, возможно, являются причиной медленного (на протяжении почти 10 лет) внедрения методов анализа микроРНК в клиническую практику [2].

Герминогенные опухоли яичка представляют собой относительно редкую патологию, социальная значимость которой определяется возрастом пациентов. Максимальный показатель относительной заболеваемости наблюдается в возрастной группе 25–29 лет [3]. Принято считать, что ГОЯ возникают в результате нарушения многоэтапного процесса нормального созревания половых клеток. За 5 десятилетий, прошедших со времени 1-й публикации, посвященной гистогенезу тестикулярных опухолей [4], эта теория развилась, но не претерпела принципиальных изменений. Она объясняет факт гистологического разнообразия ГОЯ [5]. Герминогенные опухоли яичка разделяют на 2 большие

группы: семиномы (СЕМ) и несеминомы (НЕСЕМ). Последняя группа включает низкокодифференцированные эмбриональные карциномы и относительно высококодифференцированные опухоли: тератомы (ТЕ), хорионкарциномы (ХК) и опухоли желточного мешка (ОЖМ) [5]. Перечисленные варианты ГОЯ имеют четкие морфологические различия (рис. 1).

Сравнительное исследование молекулярно-генетических характеристик различных гистотипов ГОЯ также выявляет существенные различия профиля точечных мутаций и участков амплификаций ДНК, характера метилирования генома и экспрессионных изменений опухолевых клеток [5]. Можно предположить, что это разнообразие приводит к различиям в клинических характеристиках гистологических вариантов ГОЯ. Однако в клинических рекомендациях, как отечественных [6], так и международных [7], говорится о незначительных различиях алгоритмов диагностики и лечения пациентов лишь 2 групп: с СЕМ и НЕСЕМ.

Исследование 3 традиционных маркеров – хорионического гонадотропина (ХГЧ), альфа-фетопroteина (АФП) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) – рекомендовано при всех вариантах ГОЯ. Применение аналогичных лечебных подходов оказывается оправданным, поскольку у пациентов с различными гистологическими вариантами ГОЯ наблюдается незначительная разница в показателях выживаемости [8] или отмечается ее

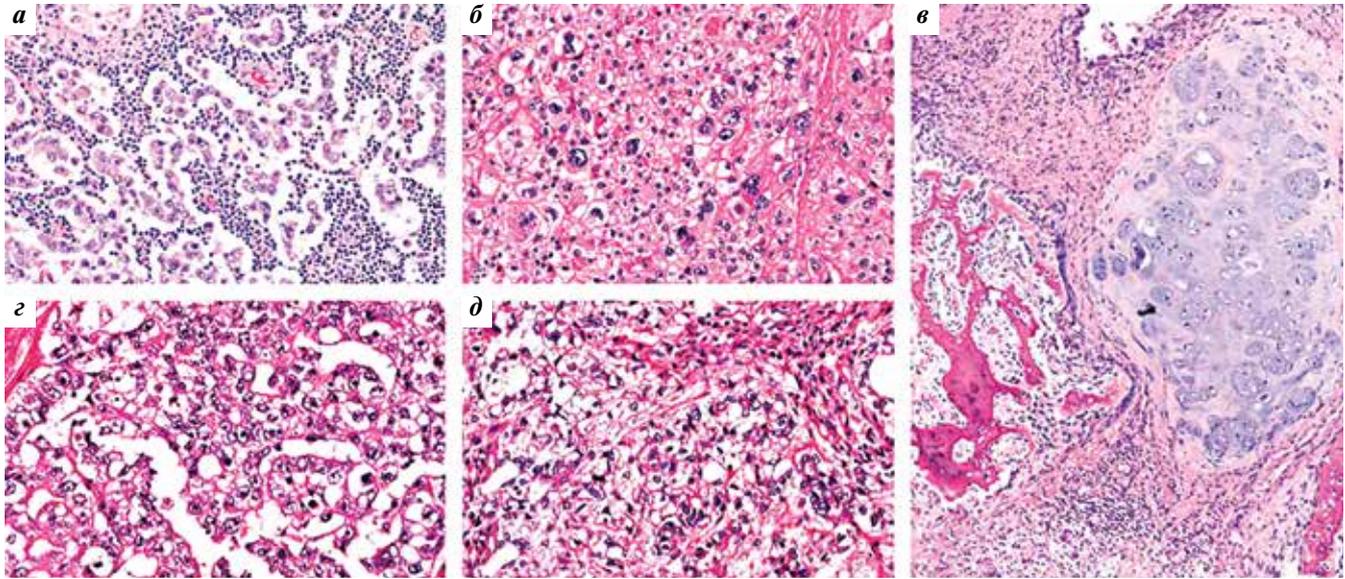


Рис. 1. Гистологические варианты герминогенных опухолей яичка: а – семинома; б – эмбриональная карцинома; в – хорионкарцинома; г – опухоль желточного мешка; д – зрелая тератома. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 1. Histological variants of testicular germ cell tumor: а – seminoma; б – embryonic carcinoma; в – chorioncarcinoma; г – yolk sac tumor; д – mature teratoma. Hematoxylin and eosin staining. $\times 200$

отсутствие [9]. Так, несмотря на существенные различия биологии гистологических вариантов ГОЯ их клинические характеристики во многом схожи.

Существование различных гистологических вариантов ГОЯ имеет значение при разработке новых диагностических подходов. Так, авторы современных обзоров методов лабораторной диагностики данной патологии дифференцируют потенциальные маркеры различных гистотипов заболевания [10, 11]. Многочисленные исследования изменений экспрессии микроРНК в клетках ГОЯ и концентрации этих молекул в плазме также показывают различия между гистологическими вариантами. Однако результаты этих исследований пока плохо сопоставимы. Например, в одной работе повышение уровня экспрессии кластера miR-302/miR-367 было описано как характерная особенность ОЖМ [12], а в другом – ЭК [13].

В совокупности анализ научной литературы позволяет сформировать представление о существенных и разнообразных изменениях уровней экспрессии микроРНК при развитии ГОЯ, но отчетливая картина пока не сложилась. М. Regouc и соавт. [1] проанализировали результаты многочисленных исследований микроРНК при ГОЯ. Обобщенно полученные данные представлены на рис. 2 и 3 [14].

«Мозаичный» характер доступных научных данных и отсутствие результатов прямого сравнения уровней экспрессии потенциально маркерных микроРНК в клетках различных гистотипов ГОЯ определили необходимость данного исследования. Так, в рамках этой работы были проанализированы уровни экспрессии нескольких молекул микроРНК (кластеры miR-302/miR-367, miR-371/miR-373, а также miR-371/miR-373,

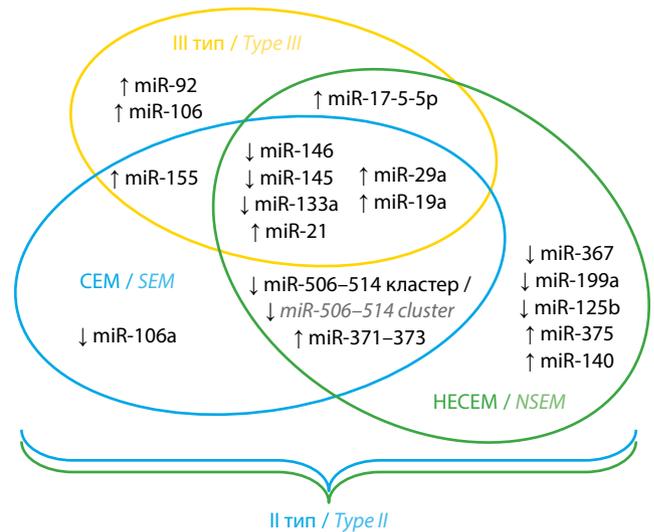


Рис. 2. Схема характерных изменений (активации – ↑ или угнетения – ↓) экспрессии микроРНК в клетках различных гистотипов герминогенных опухолей яичка по сравнению с нормальной тканью. Голубой и синей линиями обведены изменения, характерные для опухолей II типа, объединяющих семиномы (голубая линия) и несеминомы (зеленая линия). Желтой линией обведены изменения, характерные для опухолей III типа – сперматоцитарных семином (адаптировано из [14]). SEM – семинома; HECEM – несеминома

Fig. 2. The scheme of miRNA expression changes (over-expression – ↑ or down-expression – ↓) typical for the cells of different testicular germ cell tumors compared to normal testicular tissue. Expression changes characteristic for type II testicular germ cell tumors, consisting of seminoma and non-seminoma, are circled by blue and green lines. Expression changes characteristic for type III testicular germ cell tumors (or spermatocytic tumors) are circled by yellow line (adapted from [14]). SEM – seminoma; NSEM – non-seminoma

miR-21 и miR-145) в образцах СЕМ, ЭК, ТЕ, ОЖМ, ХК и нормальных тканей яичка и описаны характерные для каждого гистотипа экспрессионные изменения.

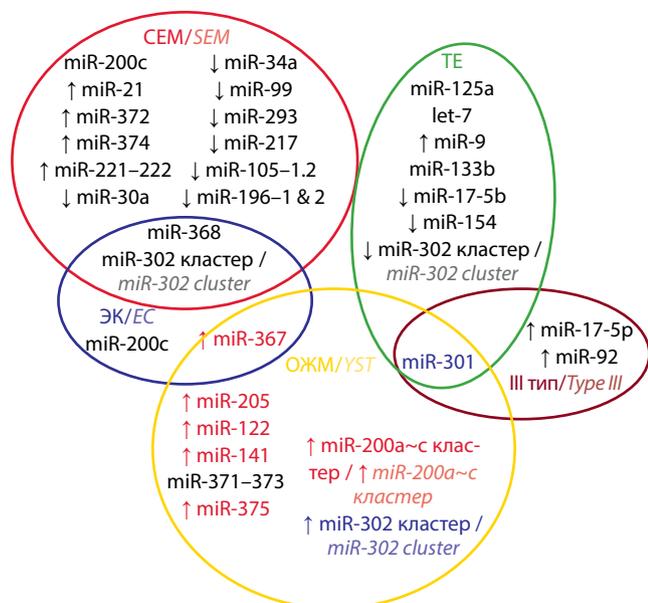


Рис. 3. Схема относительных изменений (активации — ↑ или угнетения — ↓) экспрессии микроРНК при сравнении различных типов герминогенных опухолей яичка. Линиями различных цветов объединены молекулы, имеющие сходный экспрессионный профиль в клетках семином (красная линия), эмбриональных карцином (зеленая линия), тератом (синяя линия), опухолей желточного мешка (желтая линия) и опухолей III типа, или спермациитарных семином (бордовая линия) (адаптировано из [14]). SEM — семиномы; ЭК — эмбриональные карциномы; TE — тератомы; ОЖМ — опухоли желточного мешка

Fig. 3. The scheme of comparative expression changes in different types of testicular germ cell tumors. Typical changes are circled by different color lines: seminomas (red line), embryonic carcinomas (green line), teratomas (blue line), yolk sack tumors (yellow line) and tumors of III types, or spermatocytic tumors (burgundy line) (adapted from [14]). SEM — seminoma; EC — embryonic carcinoma; YST — yolk sack tumor; TE — teratoma

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследовании, одобренном на заседании 1 от 28.01.2021 (выписка № 27/27) комитета по этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, использован архивный материал (FFPE), полученный от пациентов, проходивших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова за период с 2015 по 2021 г. В исследование были включены образцы ГОЯ и близлежащей здоровой ткани яичка, полученные после операции (односторонней орхофуникулектомии). По данным гистологического исследования, в каждом случае опухоль была представлена 1 типом ГОЯ (как минимум на 90 %). До операции пациенты не получали химиотерапию. Характеристика образцов, включенных в исследование, представлена в табл. 1.

Выделение РНК. После гистологической верификации образцы ткани были разделены на тонкие срезы (10 мкм толщиной). Тотальная РНК выделялась из 3–4 срезов. Для депарафинизации к срезам добавляли минеральное масло (1000 мкл) (MP Biomedicals, США). Инкубацию проводили при 65 °С в течение 15 мин, масло и парафин удаляли путем отмывки

96 % этанолом. К образцу добавляли 100 мкл раствора (2 мг/мл, активность — 30 ед. акт/мг, «Альгимед-Техно», Беларусь). Протеолиз проводили при 60 °С в течение 1 ч.

Таблица 1. Характеристика образцов, включенных в исследование (n = 61)
Table 1. Characteristic of tissue samples included in the study (n = 61)

| Гистологический тип Histological type | Гистологический подтип Histological subtype | Количество парных образцов ткани Number of paired tissue samples |
|--|--|---|
| Семинома Seminoma | — | 25 |
| Несеминома Non-seminoma | Эмбриональная карцинома Embryonic carcinoma | 14 |
| | Тератома Teratoma | 10 |
| | Хорионкарцинома Chorioncarcinoma | 8 |
| | Опухоль желточного мешка Yolk sac tumor | 4 |

Оставшуюся после протеолиза ткань осаждали путем центрифугирования (10 000 × g, 4 °С — 10 мин), супернатант (~100 мкл) переносили в чистую пробирку, добавляли 200 мкл буфера на основе октановой кислоты (октановая кислота 0,5 %; 0,8М ацетат натрия; pH 4,0) и 100 мкл гуанидина изотиоцианата (3М) и перемешивали, а затем инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Образец переносили на спин-колонку, заполненную сорбентом (BioSilica, Россия), промывали дважды буфером для промывки (500 мкл; 0,5М гуанидин изотиоцианат; 10мМ трис-ацетат; pH 6,5; 50 % этанол; 1 % 2-меркаптоэтанол). Образец элюировали с помощью 50 мкл буфера, содержащего 10 мМ NaHCO₃, 10 мМ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты).

Концентрацию и качество выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США). Концентрация выделенной РНК определялась в диапазоне 30–350 нг/мкл.

Обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция и анализ результатов. Анализ концентрации выбранных молекул микроРНК, включая miR-93, проводили с помощью соответствующих наборов производства компании «Альгимед-Техно» (Беларусь) в соответствии с протоколом. В рамках исследования были использованы системы для анализа следующих молекул: hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302c-3p, hsa-miR-302d-3p, hsa-miR-367-3p, hsa-miR-371-3p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-93-5p.

Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили в объеме 20 мкл, включая 2 мкл раствора тотальной РНК. Реакционную смесь тщательно перемешивали и инкубировали 45 мин при 25 °С с последующим нагревом при 85 °С в течение 5 мин для инактивации обратной транскриптазы (0,4 мкл ArtMMLV (200 ед. акт/мкл) ООО «АртБиоТех», Беларусь). Количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) выполняли в объеме 20 мкл, включая 4 мкл реакционной смеси, в которой проводилась ОТ. Условия для ПЦР были следующими: 95 °С в течение 10 мин, 45 циклов; 95 °С – 5 с, 65 °С – 15 с. Детекцию сигнала амплификации проводили по каналу FAM. Реакции ОТ-ПЦР для каждого образца повторяли дважды. Для последующих расчетов использовали среднее арифметическое значение. Все реакции ОТ и ПЦР проводили на CFX96 Touch™ (BioRad, США). Анализ данных ПЦР осуществляли с помощью программ CFX Manager Software, Excel 10.0, Sigma Plot 11.0 GraphPad Prizm 12.0.

Вариабельность уровней экспрессии анализируемых молекул оценивали с помощью алгоритма NormFinder [15]. Расчет изменений экспрессии отдельных молекул микроРНК выполняли методом ΔCt ($\Delta Ct = 2^{(Ct\ miR-X/GOЯ - Ct\ miR-93/GOЯ)}$) или $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta\Delta Ct = 2^{((Ct\ miR-X/GOЯ - Ct\ miR-93/GOЯ) - (Ct\ miR-X/Норм - Ct\ miR-93/Норм))}$) [16].

Для оценки экспрессионных изменений молекул микроРНК в рамках отдельных групп образцов проводили расчет средних арифметических значений нормализованных показателей и среднеквадратичного отклонения по формуле:

$$STD = \sqrt{(\sum(x - x_{average})^2)/n}.$$

Статистическую значимость разницы исследуемых параметров между группами оценивали с помощью методов непараметрического анализа путем вычисления критерия Краскела–Уоллиса при сравнении нескольких групп или критерия Манна–Уитни при сравнении 2 групп. Оба критерия могут быть использованы в случае, если количество образцов в сравниваемых группах >3 [17, 18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выбор потенциально маркерных молекул. Выбор молекул микроРНК для включения в исследование был проведен на основе анализа данных научной литературы, посвященной изучению участия этих молекул в развитии ГОЯ и перспектив их последующего использования в качестве диагностических маркеров. Кластер miR-302/miR-367 объединяет 5 молекул (miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d и miR-367), которые кодируются участками ДНК в составе гена *LARP7*. Эти молекулы регулируют различные биологические процессы, включая пролиферацию и дифференциацию клеток [19]. Патологические изменения уровня их экспрессии ассоциированы с нарушениями

процессов контроля активности стволовых клеток и развитием ряда онкологических заболеваний. Механизм онкогенной активности этих молекул в контексте ГОЯ связан с влиянием на экспрессию ряда сигнальных молекул (SPRY4, MAPK/ERK [13]). Диагностический и терапевтический потенциал кластера miR-302/miR-367 был показан в ряде исследований [20].

Кластер miR-371/miR-373 включает 3 молекулы (miR-371a, miR-372 и miR-373), повышение уровней экспрессии которых также характерно для клеток ГОЯ. Однако этот феномен описан не для всех гистотипов. Например, в ряде исследований показано, что в клетках тератомы miR-371a-3p не экспрессируется [21], в клетках СЕМ уровень ее экспрессии повышен умеренно, а в клетках ЭК – существенно [22]. Поскольку циркулирующие в плазме молекулы этого кластера, в частности miR-371a-3p, считаются перспективными маркерами ГОЯ, предварительная оценка изменений уровней их экспрессии в ткани опухоли по сравнению с уровнем экспрессии в неизменной тестикулярной ткани представляется важным этапом разработки новых подходов к жидкостной биопсии.

Дополнительно в исследование были включены miR-21 как неспецифический маркер многих онкологических заболеваний [23], а также miR-10b и miR-145, экспрессия которых была выявлена в нормальной тестикулярной ткани [24] и которые участвуют в регуляции ответа клеток ГОЯ на цитостатическую терапию [25].

Оценка аналитических систем и валидация нормализатора. Перед началом исследования были оценены аналитические характеристики метода анализа микроРНК путем определения эффективности ПЦР для линейки разведений синтетических аналогов (или мимиков) тестируемых микроРНК. Все 12 систем показали широкий диапазон прямой зависимости значений пороговых циклов (Ct) от концентрации аналита. Пример результатов оценки эффективности системы для анализа miR-93 представлен на рис. 4.

Результаты анализа материала биологических образцов во всех случаях детектировались в этом диапазоне, что позволило использовать выбранную технологию для решения поставленных задач. Затем оценка экспрессии 12 выбранных молекул была проведена в каждом из 122 образцов (61 – ГОЯ и 61 – нормальной ткани). Все реакции выполнены в 2 повторах, разница результатов не превышала 0,5 цикла. В последующих расчетах использовали среднее арифметическое значение пороговых циклов (Ct) для 2 технических повторов.

Вариабельность полученных результатов оценивали с помощью алгоритма NormFinder (рис. 5). Наиболее стабильный уровень экспрессии (stability value → 1) был показан для miR-93 в группе образцов нормальной ткани яичка (1,31). [15]. Несколько хуже этот показатель был в группе образцов ГОЯ (1,56). Полученные результаты продемонстрировали допустимость

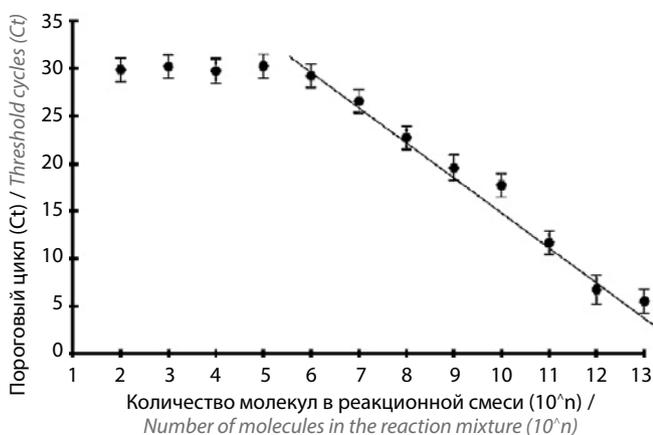


Рис. 4. График зависимости порогового цикла полимеразной цепной реакции от концентрации анализируемой молекулы микроРНК на примере miR-93. Исследование проведено методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с использованием серии разведений синтетического аналога анализируемой молекулы. По оси абсцисс указаны значения степени 10 (10^n) количества молекул в реакционной смеси. Представленные результаты демонстрируют линейную зависимость значения порогового цикла (Ct) от концентрации аналита в диапазоне значений Ct от 7 до 29 и в диапазоне концентраций микроРНК 10^6 – 10^{12} молекул/реакции

Fig. 4. Dependence of the polymerase chain reaction threshold cycle on the concentration of the analyzed miRNA, representative example of microRNA-93 is shown. Assay was performed out by reverse transcription polymerase chain reaction with serial dilution of miRNA synthetic mimic. Concentration on miRNA in reaction mixture is shown on abscissa as an exponent in base 10 (10^n) miRNA molecules per reaction. Presented results indicate linear dependency of threshold cycles (Ct) value from analyte concentration within the diapason of Ct value from 7 to 29 cycles and diapason of miRNA concentration from 10^6 to 10^{12} molecules per reaction

использования miR-93 в качестве нормализатора при анализе данных ПЦР после проведения ОТ.

Анализ уровней экспрессии микроРНК. Для оценки относительного уровня экспрессии молекул микроРНК вычисленные ранее средние арифметические значения результатов технических повторов для каждой молекулы были нормализованы относительно miR-93. Для оценки степени изменения уровня экспрессии конкретной молекулы в каждом случае был проведен расчет параметра ddCt по формуле:

$$ddCt = 2^{((Ct \text{ miR-X/ГОЯ} - Ct \text{ miR-93/ГОЯ}) - (Ct \text{ miR-X/Норм} - Ct \text{ miR-93/Норм}))}$$

В табл. 2 представлены усредненные для каждой клинической группы нормализованные (относительно «нормы») значения уровней экспрессии 11 молекул (параметр ddCt) и статистическая значимость разницы значений уровней экспрессии этих молекул в образцах ГОЯ и нормальной ткани (dCt).

Более наглядно результаты оценки изменений уровней экспрессии молекул кластера miR-302/miR-367 представлены на рис. 6.

При всех гистотипах, кроме ТЕ и ХК, наблюдалось существенное повышение активности экспрессии молекул miR-302a, miR-302b, miR-302c и miR-302d. Изменения уровней экспрессии miR-302b и miR-302d

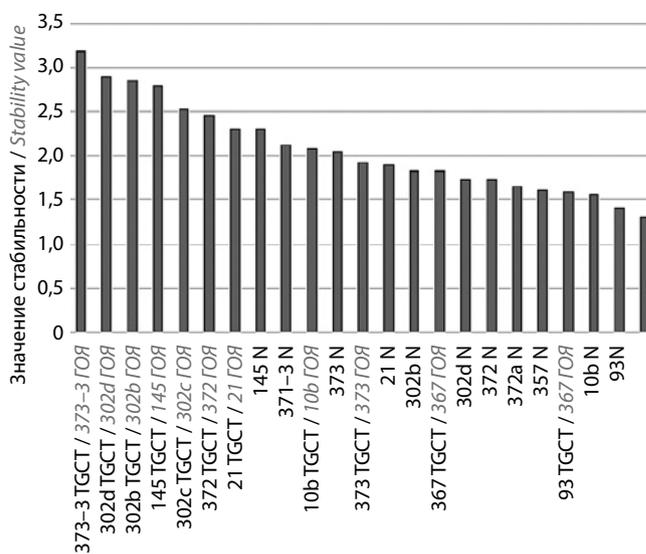


Рис. 5. Оценка вариабельности результатов полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией всех молекул микроРНК, включенных в исследование, с помощью алгоритма NormFinder. Расчет для каждой молекулы проведен отдельно для группы образцов ткани ГОЯ ($n = 61$) и для группы образцов неизменной ткани яичка ($n = 61$). ГОЯ – герминогенные опухоли яичка; N – норма

Fig. 5. Assessment of the variability of reverse transcription polymerase chain reaction assessment of all miRNAs included in the study using the NormFinder algorithm. Stability values were defined for each molecule in group of testicular germ cell tumors samples ($n = 61$) and in group of normal testicular tissue samples ($n = 61$). TGCT – germ cell tumor; N – norma

были всегда существенно более значимы, чем изменения уровней экспрессии miR-302a и miR-302c. На этом фоне изменения уровня экспрессии miR-367 представляются незначительными. В клетках ТЕ и ХК уровень экспрессии 5 микроРНК кластера miR-302/miR-367 оказался более низким по сравнению с нормальной тканью яичка. При этом в случае ТЕ наблюдалось угнетение экспрессии всех 5 анализируемых молекул микроРНК, а в группе ХК было выявлено формирование характерного профиля экспрессионных изменений молекул кластера miR-302/miR-367: miR-367 > miR-302b > miR-302c > miR-302d > miR-302a.

Экспрессионные изменения кластера miR-371/miR-373, наблюдаемые в различных гистотипах ГОЯ, представлены на рис. 7. Ожидаемое повышение экспрессии miR-371a-3p наблюдалось во всех гистотипах, кроме ХК, хотя амплитуда этих изменений была различной. Так, наиболее значимые изменения выявлены в группах СЕМ, ЭК и ОЖМ. В группе ТЕ также наблюдалось повышение уровня экспрессии miR-371a-3p. Амплитуда экспрессионных изменений была менее существенной, но статистически значимой. По сравнению с miR-371a-3p изменения уровней экспрессии 2 других молекул в этих группах были незначимы. Интересно заметить формирование специфического для СЕМ, ЭК и ОЖМ профиля сочетанных изменений экспрессии 3 молекул: miR-371a-3p > miR-373 > miR-372. В группе ТЕ соотношения экспрессионных изменений выглядели иначе: miR-371a-3p > miR-372 > miR-373.

Таблица 2. Результаты сравнительного анализа уровней 11 молекул микроРНК в образцах герминогенных опухолей яичка разных гистологических типов, выполненного методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией

Table 2. The results of comparative analysis of expression levels of eleven miRNA molecules in samples of testicular germ cell tumors of different histological types performed by reverse transcription followed by polymerase chain reaction

| Гистологический тип герминогенных опухолей яичка Histological type of germinogenic testicular tumors | ddCt; p | | | | | | | | | | |
|---|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------------|
| | miR-302a | miR-302b | miR-302c | miR-302d | miR-367 | miR-371a | miR-372 | miR-373 | miR-21 | miR-10b | miR-145 |
| Семинома Seminoma | 300,7; *** | 567,9; **** | 125,1; *** | 676,4; **** | 13,5; * | 2400,2; **** | 36,9; ** | 592,1; **** | 1,3; ns | 0,1; ** | 0,1; ** |
| Эмбриональная карцинома Embryonic carcinoma | 440,0; **** | 847,0; **** | 518,6; **** | 924,5; **** | 50,6; ** | 1371,7; **** | 14,1; * | 164,4; ** | 0,6; ns | 0,1; *** | 0,1; *** |
| Тератома Teratoma | 0,4; ** | 0,4; ns | 0,3; ** | 0,5; * | 0,4; ** | 4,0; ** | 1,2; ns | 0,5; ns | 1,3; ns | 0,1; *** | 0,4; ** |
| Опухоль желточного мешка Yolk sac tumor | 2783,5; *** | 6052,5; **** | 2664,1; **** | 4127,2; **** | 148,2; ** | 973,5; **** | 20,8; ns | 106,3; * | 0,2; * | 0,0; ns | 0,0; ns |
| Хорионкарцинома Choriocarcinoma | 0,2; ** | 0,3; * | 0,4; ** | 0,2; * | 0,4; * | 0,6; ** | 0,7; *** | 0,2; * | 1,6; ns | 1,3; ns | 0,1; *** |

* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,00005$.

Примечание. Параметр ddCt был вычислен для каждой пары образцов (ГОЯ и нормальной ткани), затем были определены средние для группы значения. P — результат оценки статистической достоверности разницы нормализованных значений (dCt) экспрессии каждой молекулы между образцами герминогенных опухолей яичка и нормальной ткани яичка с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни; ns — незначимо.

Note. Values of ddCt were calculated for each samples pair (testicular germ cell tumors and normal testicular tissue) and averaged for the groups. Values of dCt were grouped for testicular germ cell tumors and normal tissue, statistical significance of difference observed between such a paired groups was evaluated with non-parametric Mann—Withney test; ns — non significant.

В группе ХК наблюдалось снижение уровней экспрессии всех 3 членов кластера miR-371/miR-373 по сравнению с образцами нормальной ткани.

Представленные результаты демонстрируют аналогичный характер изменений уровней экспрессии 2 кластеров микроРНК в клетках СЕМ, ЭК и ОЖМ, при этом схожесть касается как факта повышения уровней экспрессии этих молекул, так и профиля наблюдаемых изменений. Наиболее значимо повышалась активность miR-302b, miR-302d и miR-371a-3p. Эти молекулы представляются наиболее перспективными маркерами заболевания в случае преобладания в составе опухоли компонентов СЕМ, ЭК и ОЖМ.

Оценка экспрессионных изменений маркерных микроРНК. После определения молекул, уровень экспрессии которых наиболее значимо изменился в ходе развития СЕМ, ЭК и ОЖМ, мы провели оценку степени этих изменений в объединенной группе ГОЯ. Тератомы и ХК были исключены из групп сравнения. Анализ выполнен путем усреднения нормализованных относительно miR-93 (dCt = $2^{Ct_{miR-X/ГОЯ} - Ct_{miR-93/ГОЯ}}$) значений в рамках групп ГОЯ и образцов нормальных тканей. Результаты представлены на рис. 8.

Так, существенное и статистически значимое повышение уровней экспрессии 3 молекул наблюдалось в группе образцов, в которую входили 3 гистотипа ГОЯ (СЕМ, ЭК и ОЖМ). Включение в анализ ТЕ и ХК снижало статистическую значимость наблюдаемых изменений, а самостоятельная оценка групп ТЕ и ХК не выявляла никаких значимых изменений характера экспрессии miR-302b, miR-302d и miR-371a. Полученные результаты указывают на возможность использования этих молекул в качестве диагностических маркеров. Однако такая диагностика не будет информативной в случае преобладания в ГОЯ компонентов ТЕ и/или ХК. С учетом значимого повышения концентрации 302b, miR-302d и особенно miR-371a в ткани опухоли можно ожидать «появления» этих молекул в циркуляции, что подтверждается рядом публикаций [25], хотя технологии анализа и алгоритмы интерпретации результатов оценки их концентрации в плазме пока являются предметом исследований и обсуждений [22].

Анализ уровня экспрессии miR-21 выявил незначительные и разнонаправленные изменения в группах ГОЯ. Эта молекула, вероятно, не играет значимой роли в патогенезе заболевания. Интересные результаты получены при оценке экспрессионных изменений

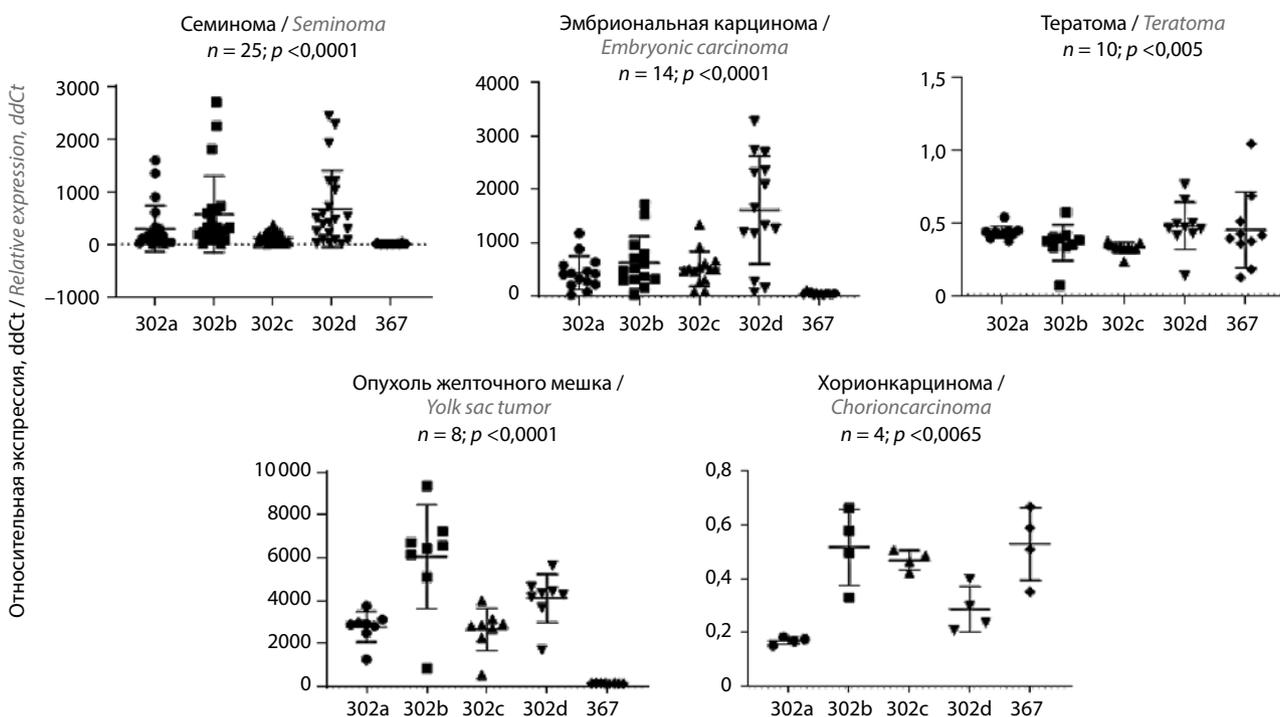


Рис. 6. Изменения экспрессии молекул кластера miR-302/miR-367 в различных гистотипах герминогенных опухолей яичка. Каждая точка на графиках отражает уровень экспрессии отдельной молекулы в конкретном образце ткани герминогенных опухолей яичка. Нормализация проводилась путем расчета параметра ddCt по формуле:

$$ddCt = 2^{((Ct\ miR-X/ГОЯ - Ct\ miR-93/ГОЯ) - (Ct\ miR-X/Норм - Ct\ miR-93/Норм))}$$

Для каждой группы значений показаны (горизонтальными линиями) среднее значение и среднее квадратичное отклонение, вычисленное по формуле:

$$STD = \sqrt{(\sum (x - x_{average})^2)/n}$$

Оценка статистической значимости наблюдаемых различий экспрессионных изменений отдельных молекул выполнена с помощью не-параметрического критерия Краскела—Уоллиса

Fig. 6. Expression changes in the miR-302/miR-367 cluster in various testicular germ cell tumor histotypes. Each dot reflects expression level of specific miRNA in certain sample of testicular germ cell tumors. Normalization was carried out by calculating the ddCt parameter using the formula:

$$ddCt = 2^{((Ct\ miR-X/TGCT - Ct\ miR-93/TGCT) - (Ct\ miR-X/Testis - Ct\ miR-93/Testis))}$$

Relative expression level of each miRNA was averaged within group of samples, standard deviations were calculated with formula:

$$STD = \sqrt{(\sum (x - x_{average})^2)/n}$$

These parameters are shown by horizontal lines. The statistical significance of the observed differences in the expression changes of individual molecules was evaluated using the Kruskal—Wallis non-parametric criterion

miR-10b и miR-145. Так, экспрессия этих молекул не изменяется в ОЖМ. В клетках ХК уровень экспрессии miR-10b несколько повышается, а miR-145 — понижается. Активность обеих молекул существенно и статистически значимо подавлена в группе СЕМ, ЭК и ТЕ (рис. 9). В отличие от кластеров miR-302/miR-367 и miR-371/miR-373 «поведение» этих молекул в клетках тератомы аналогично таковому клеток СЕМ и ЭК.

В целом феномен разнонаправленных (реципрокных) изменений экспрессии молекул микроРНК (например, miR-371a/miR-145) при развитии ГОЯ является важным наблюдением, поскольку он может найти практическое применение в рамках разработки новых диагностических подходов. Методика оценки соотношения экспрессионной активности молекул микроРНК с противоположным характером изменений является вариантом решения проблемы нормали-

зации и повышения диагностического потенциала результатов ОТ-ПЦР анализа [26].

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование изменений экспрессии молекул микроРНК в процессе или в результате развития ГОЯ имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение, так как регресс опухолеассоциированных изменений может отражать эффект проводимой терапии. Если изменения уровней экспрессии отдельных микроРНК в клетках опухоли существенны, а объем ее ткани достаточно велик, могут произойти «сдвиги» нормального состава микроРНК циркулирующей плазмы. Такие предположения лежат в основе разработки новых методов анализа циркулирующих микроРНК с целью диагностики, оценки эффекта терапии и последующего наблюдения пациентов с ГОЯ [27]. Например, возможность анализа относительной

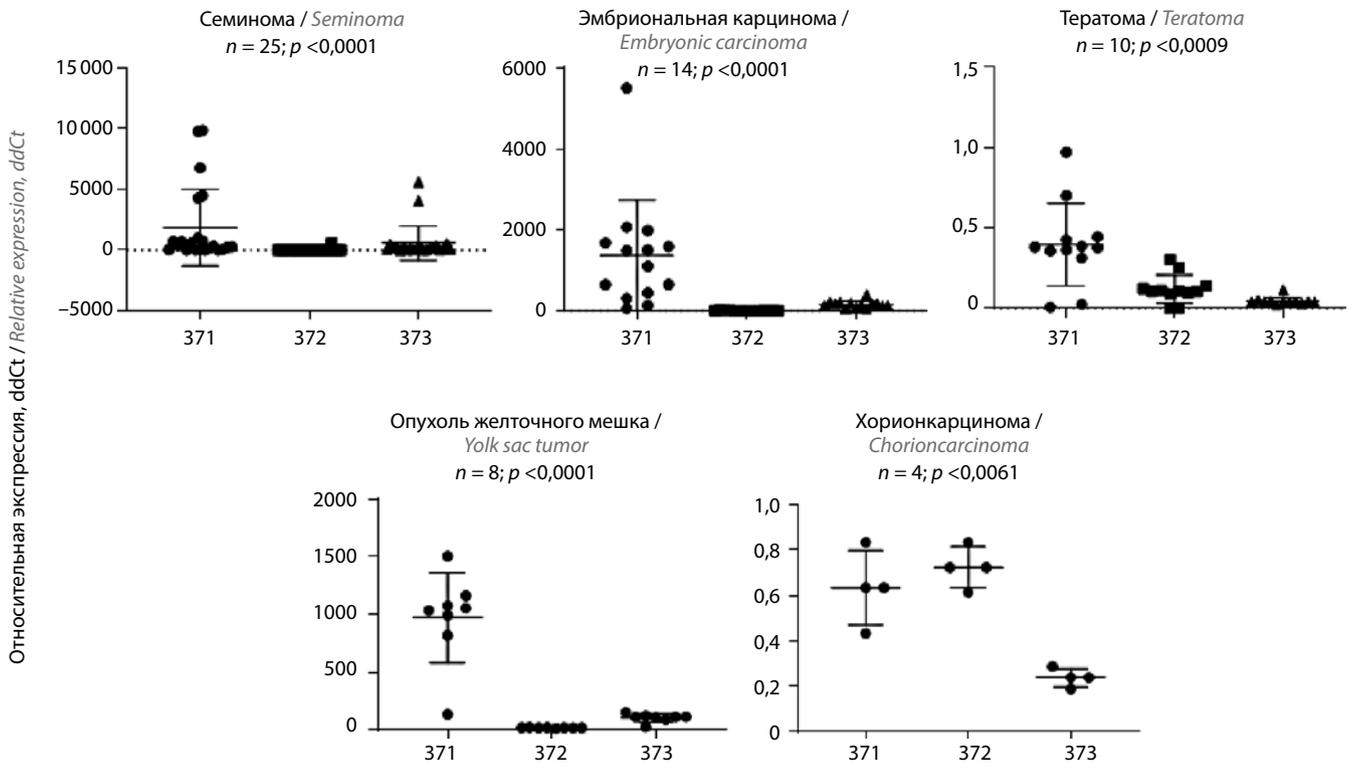


Рис. 7. Изменения экспрессии молекул кластера miR-371/miR-373 в различных гистотипах герминогенных опухолей яичка. Каждая точка на графиках отражает уровень экспрессии отдельной молекулы в конкретном образце ткани герминогенных опухолей яичка. Нормализация проводилась путем расчета параметра ddCt по формуле:

$$ddCt = 2^{((Ct\ miR-X/ГОЯ - Ct\ miR-93/ГОЯ) - (Ct\ miR-X/Норм - Ct\ miR-93/Норм))}$$

Для каждой группы значений показаны (горизонтальными линиями) среднее значение и среднеквадратичное отклонение, вычисленное по формуле:

$$STD = \sqrt{(\sum(x - x_{average})^2)/n}$$

Оценка статистической значимости наблюдаемых различий экспрессионных изменений отдельных молекул выполнена с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса

Fig. 7. Expression changes in the miR-302/miR-367 cluster in various testicular germ cell tumor histotypes. Each dot reflects expression level of specific miRNA in certain sample of testicular germ cell tumors. Normalization was carried out by calculating the ddCt parameter using the formula:

$$ddCt = 2^{((Ct\ miR-X/TGCT - Ct\ miR-93/TGCT) - (Ct\ miR-X/Testis - Ct\ miR-93/Testis))}$$

Relative expression level of each miRNA was averaged within group of samples, standard deviations were calculated with formula:

$$STD = \sqrt{(\sum(x - x_{average})^2)/n}$$

These parameters are shown by horizontal lines. The statistical significance of the observed differences in the expression changes of individual molecules was evaluated using the Kruskal–Wallis non-parametric criterion

концентрации miR-371a-3p у пациентов с ГОЯ показана в десятках экспериментальных работ, а его клиническая целесообразность является предметом клинических испытаний.

Успешная разработка и внедрение в клиническую практику новых методов мониторинга терапии пациентов с ГОЯ требуют решения ряда фундаментальных и технологических проблем, которые подробно представлены в недавнем обзоре С. Conduit и В. Tran [22]. В частности, недостаточно детально исследованы особенности изменений уровней экспрессии микроРНК в различных гистологических вариантах ГОЯ, что не позволяет предсказать изменения состава циркулирующих в плазме молекул. Важной проблемой также остается поиск адекватной методики анализа результатов ОТ-ПЦР. В большинстве исследований стандартный метод расчета экспрессионных изменений (ddCt) модифицирован таким образом, что последу-

ющий ROC-анализ позволяет вычислить оптимальное для данных условий значение порога отсечения (cut-off), получить близкие к 1 значения AUC (area under curve, площадь под кривой) и максимальные показатели чувствительности и специфичности.

Особенность такого подхода заключается в том, что вместо использования референсного образца для каждого клинического случая проводятся анализ группы референсных донорских образцов, нормализация значений концентрации маркерной молекулы в этих образцах (dCt) и вычисление среднего для референсной группы значения. Когда такое усредненное для всех нормальных образцов значение используется затем для вычисления диагностического параметра ddCt и ROC-анализа, значение этого параметра в группе референсных образцов неминуемо стремится к 1. Даже если отличие значений ddCt в группе пациентов с ГОЯ незначительное, оно всегда будет достаточным

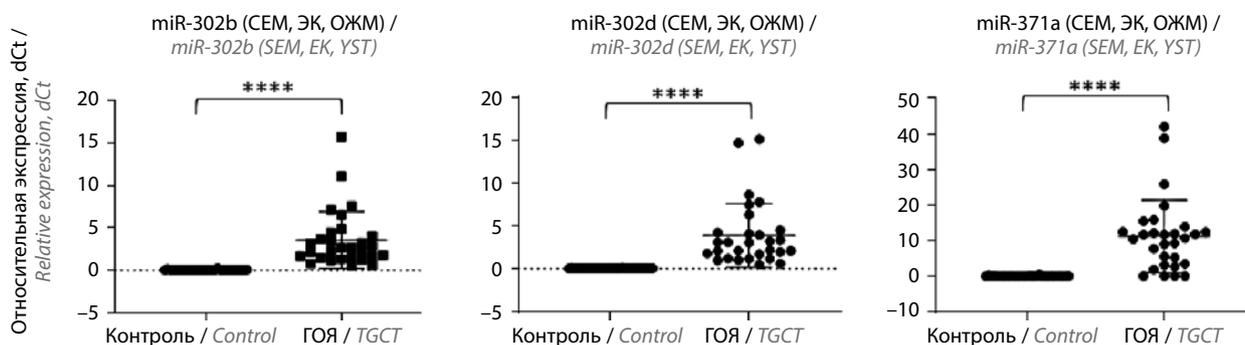


Рис. 8. Сравнение уровней экспрессии молекул miR-302b, miR-302d, miR-371a в образцах герминогенных опухолей яичка, включая семиному ($n = 25$), эмбриональную карциному ($n = 14$), опухоли желточного мешка ($n = 8$) в образцах неизменной ткани яичка. Каждая точка на графиках отражает уровень экспрессии отдельной молекулы в конкретном образце. Нормализация относительно референсной miR-93 проводилась путем расчета параметра dCt по формуле:

$$dCt = 2^{(Ct_{miR-X/TOЯ} - Ct_{miR-93/TOЯ})}$$

Для каждой группы значений показаны (горизонтальными линиями) среднее значение и среднее квадратичное отклонение, вычисленное по формуле:

$$STD = \sqrt{(\sum (x - x_{average})^2) / n}$$

Оценка статистической значимости наблюдаемых различий экспрессионных изменений отдельных молекул выполнена с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса. ГОЯ – герминогенные опухоли яичка; СЕМ – семиномы; ЭК – эмбриональные карциномы; ОМЖ – опухоль желточного мешка. $***p < 0,00005$

Fig. 8. Comparison of the miR-302b, miR-302d and miR-371a expression level in testicular germ cell tumor including seminoma ($n = 25$), embryonal carcinoma ($n = 14$) and yolk sac tumor ($n = 8$), versus normal testicular tissue. Each dot reflects expression level of specific miRNA in certain sample of testicular germ cell tumors. Normalization relative to the reference miR-93 was carried out by calculating the dCt parameter using the formula:

$$dCt = 2^{(Ct_{miR-X/TOЯ} - Ct_{miR-93/TOЯ})}$$

Relative expression level of each miRNA was averaged within group of samples, standard deviations were calculated with formula:

$$STD = \sqrt{(\sum (x - x_{average})^2) / n}$$

These parameters are shown by horizontal lines. The statistical significance of the observed differences in the expression changes of individual molecules was evaluated using the Kruskal–Wallis non-parametric criterion. TGCT – testicular germ cell tumors; SE – seminomes; EK – embryonal carcinomas; YST – yolk sac tumor. $***p < 0.00005$

для четкого разделения групп и получения высоких значений AUC, специфичности и чувствительности. Этот метод был реализован при оценке результатов масштабного исследования параметров диагностической значимости M371 Test [27]. К сожалению, такой подход скрывает проблему четкого разделения области нормальных и патологических значений относительной концентрации маркерных молекул микроРНК в плазме, и он неприменим в клинической практике, где нет референсного образца здоровой плазмы.

В представленной работе решалась задача поиска изменений экспрессии ряда маркерных молекул микроРНК, характерных для основных гистотипов ГОЯ. Полученные результаты позволяют утверждать, что существует характерная для СЕМ, ЭК и ОМЖ картина повышения уровней экспрессии молекул кластера miR-302/miR-367. Такие изменения не наблюдались в группах ТЕ и ХК. Экспрессия кластера miR-371/miR-373 изменяется сходным образом во всех, кроме ХК, вариантах ГОЯ. При этом характерные изменения имели высокую амплитуду в клетках СЕМ, ЭК и ОМЖ и относительно низкую – в клетках ТЕ. Полученные результаты указывают на целесообразность поиска изменений концентрации циркулирующих miR-302b, miR-302d, miR-371a в случаях ГОЯ с преобладанием в ткани опухоли компонентов СЕМ, ЭК и ОМЖ.

Описанный феномен снижения уровней экспрессии miR-10b и miR-145 является интересным научным наблюдением. Например, с учетом известных характеристик кластера miR-143/miR-145 (anti-oncomiR) [28] эти данные могут указывать на возможность разработки новых подходов к терапии ГОЯ путем восстановления уровня/функций отдельных молекул. Кроме того, существует вероятность выделения и анализа тканеспецифичных фракций циркулирующих нановезикул плазмы, состав микроРНК которых более точно отражает состав микроРНК определенной ткани [29]. Разработка такого подхода в случае ГОЯ позволит проводить анализ реципрокных изменений концентрации miR-302b, -302d, -371a, -10b и -145. Оценка таких сочетанных изменений, безусловно, должна иметь больший диагностический потенциал, чем оценка отдельных молекул в комплексном и еще малоизученном составе циркулирующих микроРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Характерные изменения уровней экспрессии микроРНК в составе кластера miR-302/miR-367 наблюдались в образцах следующих гистотипов ГОЯ: СЕМ, ЭК и ОМЖ. Специфический характер изменений включал повышение уровня экспрессии 4 родственных

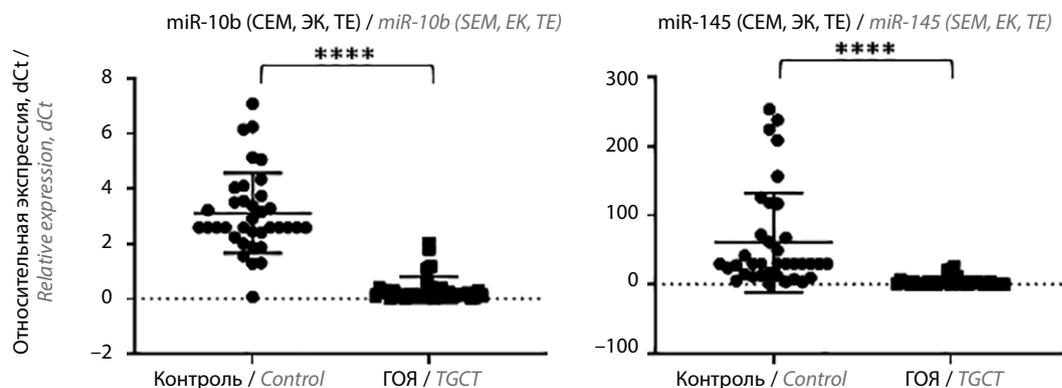


Рис. 9. Сравнение уровней экспрессии молекул *miR-10b* и *miR-145* в образцах герминогенных опухолей яичка, включая семиному ($n = 25$), эмбриональную карциному ($n = 14$), опухоли желточного мешка ($n = 8$) в образцах неизменной ткани яичка. Каждая точка на графиках отражает уровень экспрессии отдельной молекулы в конкретном образце ткани герминогенных опухолей яичка. Нормализация относительно референсной *miR-93* проводилась путем расчета параметра dCt по формуле:

$$dCt = 2^{(Ct\ miR-X/ГОЯ - Ct\ miR-93/ГОЯ)}$$

Для каждой группы значений показаны (горизонтальными линиями) среднее значение и среднее квадратичное отклонение, вычисленное по формуле:

$$STD = \sqrt{(\sum (x - x_{average})^2) / n}$$

Оценка статистической значимости наблюдаемых различий экспрессионных изменений отдельных молекул выполнена с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса. ГОЯ – герминогенные опухоли яичка; СЕМ – семиномы; ЭК – эмбриональные карциномы; ТЕ – тератома. **** $p < 0,00005$

Fig. 9. Comparison of the *miR-10b* and *miR-145* expression levels in testicular germ cell tumor including seminomas ($n = 25$), embryonal carcinomas ($n = 14$) and yolk sack tumors ($n = 8$), versus normal testicular tissue. Each dot reflects expression level of specific miRNA in certain sample of testicular germ cell tumors. Normalization relative to the reference *miR-93* was carried out by calculating dCt parameter using the formula:

$$dCt = 2^{(Ct\ miR-X/ГОЯ - Ct\ miR-93/ГОЯ)}$$

Relative expression level of each miRNA was averaged within group of samples, standard deviations were calculated with formula:

$$STD = \sqrt{(\sum (x - x_{average})^2) / n}$$

These parameters are shown by horizontal lines. The statistical significance of the observed differences in the expression changes of individual molecules was evaluated using the Kruskal–Wallis non-parametric criterion. TGCT – testicular germ cell tumors; SEM – seminomas; EK – embryonal carcinomas; TE – teratomas. **** $p < 0.00005$

молекул – *miR-302a*, *-302b*, *-302c*, *-302d*. При этом степень повышения уровней *miR-302b* и *miR-302d* была статистически значимо выше степени повышения уровней *miR-302a* и *miR-302c*. Изменений уровня экспрессии *miR-367* не наблюдалось.

В клетках ТЕ и ХК наблюдалось снижение уровня экспрессии всех микроРНК кластера *miR-302/miR-367*. Характерные изменения уровня экспрессии микроРНК в составе кластера *miR-371/miR-373* наблюдались в образцах следующих гистотипов ГОЯ: СЕМ, ЭК, ОЖМ, в меньшей степени – ТЕ. При этом наблюдалось схожее соотношение степени повышения молекул микроРНК: *miR-371a* > *miR-373* > *miR-372*. В клетках ХК наблюдалось снижение уровня экспрессии всех микроРНК кластера *miR-371/miR-373*.

При объединении данных, полученных при анализе 3 гистологических групп ГОЯ (СЕМ, ЭК, ОЖМ),

существенное и статистически значимое повышение уровня экспрессии относительно образцов здоровых тканей яичка наблюдалось для 3 молекул: *miR-371a*, *miR-302b* и *miR-302d*. Описанные изменения могут приводить к диагностически значимым изменениям концентрации в плазме *miR-371a*, *miR-302b* и *miR-302d*.

Статистически значимое снижение уровня экспрессии *miR-10b* и *miR-145* наблюдалось в клетках СЕМ, ЭК и ТЕ. Эти молекулы могут быть использованы в качестве нормализаторов для повышения диагностической значимости результатов анализа *miR-371a*, *miR-302b* и *miR-302d* в образцах опухолевой ткани. Однако применение данного подхода в рамках анализа ГОЯ-специфических изменений концентрации микроРНК в плазме требует предварительного исследования «поведения» *miR-10b* и *miR-145* в плазме здоровых доноров.

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

- Regouc M., Belge G., Lorch A. et al. Non-coding microRNAs as novel potential tumor markers in testicular cancer. *Cancers (Basel)* 2020;12(3):749. DOI: 10.3390/cancers12030749. Available at: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/3/749>.
- Dieckmann K.-P., Spiekermann M., Balks T. et al. MicroRNAs miR-371-3 in serum as diagnostic tools in the management of testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 2012;107(10):1754–60. DOI: 10.1038/bjc.2012.469.
- Носов А.К., Мамижев Э.М., Рева С.А. и др. Влияние задержки диагностики на догоспитальном этапе на результаты лечения больных с герминогенными опухолями яичка в Санкт-Петербурге. *Онкоурология* 2013;2:63–8. [Nosov A.K., Mamizhev E.M., Reva S.A. et al. The effect of delayed diagnosis at the prehospital stage on the results of treatment of patients with germinogenic testicular tumors in Saint-Petersburg. *Onkourologiya = Oncourology* 2013;2:63–8. (In Russ.)].
- Skakkebaek N. Possible carcinoma-*in-situ* of the testis. *Lancet* 1972;2(7776):516–7. DOI: 10.1016/s0140-6736(72)91909-5.
- Batool A., Karimi N., Wu X.-N. et al. Testicular germ cell tumor: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci* 2019;76(9):1713–27. DOI: 10.1007/s00018-019-03022-7.
- Трякин А.А., Гладков О.А., Матвеев В.Б. и др. Практические рекомендации по лечению герминогенных опухолей у мужчин. 2020. Злокачественные опухоли. Практические рекомендации RUSSCO #3s2 2020;10:34. [Tryakin A.A., Gladkov O.A., Matveev V.B. et al. Practical recommendations for the treatment of germinogenic tumors in men. 2020. *Zlokachestvennyye opuholi. Prakticheskie rekomendacii = Malignant tumors. Practical recommendations of RUSSCO #3s2 2020;10:34. (In Russ.)*]. DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-34.
- Honecker F., Aparicio J., Berney D. et al. ESMO Consensus Conference on testicular germ cell cancer: diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018;29(8):1658–86. DOI: 10.1093/annonc/mdy217.
- Svetlovska D., Miskovska V., Cholujska D. et al. Plasma cytokines correlated with disease characteristics, progression-free survival, and overall survival in testicular germ-cell tumor patients. *Clin Genitourin Cancer* 2017;15(3):411–6.e2. DOI: 10.1016/j.clgc.2017.01.027.
- Zhang T., Ji L., Liu B. et al. Testicular germ cell tumors: a clinicopathological and immunohistochemical analysis of 145 cases. *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11(9):4622–9.
- Chieffi P. An up-date on novel molecular targets in testicular germ cell tumors subtypes. *Intractable Rare Dis Res* 2019;8(2):161–4. DOI: 10.5582/irdr.2019.01055.
- Leão R., Ahmad A.E., Hamilton R.J. Testicular cancer biomarkers: A Role for precision medicine in testicular cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2019;17(1):e176–83.
- Murray M.J., Saini H.K., van Dongen S. et al. The two most common histological subtypes of malignant germ cell tumour are distinguished by global microRNA profiles, associated with differential transcription factor expression. *Mol Cancer* 2010;9:290. DOI: 10.1186/1476-4598-9-290.
- Das M.K., Evensen H.S.F., Furu K., Haugen T.B. miRNA-302s may act as oncogenes in human testicular germ cell tumours. *Sci Rep* 2019;9:9189. DOI: 10.1038/s41598-019-45573-6.
- Batool A., Liu X.-M., Zhang C.-L. et al. Recent advances in the regulation of testicular germ cell tumors by microRNAs. *Front Biosci* 2019;24:4749. DOI: 10.2741/4749.
- Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004;64(15):5245–50. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data Using real-time quantitative PCR and the 2(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Kruskal W.H., Wallis W.A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc* 1952;47(260):583. Available at: <https://www.jstor.org/stable/2280779?origin=crossref>.
- Mann H.B., Whitney D.R. On a test of whether one of two random Variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Stat* 1947;18(1):50–60. DOI: 10.1214/aoms/1177730491.
- Guo M., Gan L., Si J. et al. Role of miR-302/367 cluster in human physiology and pathophysiology. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2020;52(8):791–800. DOI: 10.1093/abbs/gmaa065.
- Liu J., Wang Y., Ji P., Jin X. Application of the microRNA-302/367 cluster in cancer therapy. *Cancer Sci* 2020;111(4):1065–75. DOI: 10.1111/cas.14317.
- Belge G., Hennig F., Dumlupinar C. et al. Graded expression of microRNA-371a-3p in tumor tissues, contralateral testes, and in serum of patients with testicular germ cell tumor. *Oncotarget* 2020;11(16):1462–73. DOI: 10.18632/oncotarget.27565.
- Conduit C., Tran B. Improving outcomes in germ cell cancers using miRNA. *Ther Adv Med Oncol* 2021;13:175883592110278. DOI: [org/10.1177/17588359211027826](https://doi.org/10.1177/17588359211027826).
- Jenike A.E., Halushka M.K. MiR-21: a non-specific biomarker of all maladies. *Biomark Res* 2021;9(1):18. DOI: 10.1186/s40364-021-00272-1.
- Ludwig N., Leidinger P., Becker K. et al. Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res* 2016;44(8):3865–77. DOI: 10.1093/nar/gkw116.
- Port M., Glaesener S., Ruf C. et al. Micro-RNA expression in cisplatin resistant germ cell tumor cell lines. *Mol Cancer* 2011;10:52. DOI: 10.1186/1476-4598-10-52.
- Knyazeva M., Korobkina E., Karizky A. et al. Reciprocal dysregulation of miR-146b and miR-451 Contributes in malignant phenotype of follicular thyroid tumor. *Int J Mol Sci* 2020;21(17):5950. DOI: 10.3390/ijms21175950.
- Dieckmann K.-P., Radtke A., Geczi L. et al. Serum levels of microRNA-371a-3p (M371 Test) as a new biomarker of testicular germ cell tumors: results of a prospective multicentric study. *J Clin Oncol* 2019;37:1412–23. DOI: 10.1200/JCO.18.01480.
- Das A.V., Pillai R.M. Implications of miR cluster 143/145 as universal anti-oncomiRs and their dysregulation during tumorigenesis. *Cancer Cell Int* 2015;15:92. DOI: 10.1186/s12935-015-0247-4.
- Zabegina L., Nazarova I., Knyazeva M. et al. MiRNA let-7 from TPO(+) extracellular vesicles is a potential marker for a differential diagnosis of follicular thyroid nodules. *Cells* 2020;9(8):1917. DOI: 10.3390/cells9081917.

Вклад авторов

М.С. Князева: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа методами обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

В.А. Загоруйко: сбор биоматериала;

А.В. Хохлова, А.С. Артемьева: проведение гистологических исследований собранного биоматериала, интерпретация полученных результатов;

А.В. Шалаев, И.В. Назарова, Е.И. Сидина: получение данных для анализа методами обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции, анализ полученных результатов;

Л.М. Забегина: выделение РНК из полученного биоматериала;

А.К. Носов: анализ полученных результатов, научное редактирование;

С.А. Проценко: сбор биоматериала, научное редактирование;

А.В. Малек: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, научное редактирование, написание текста статьи.

Authors' contributions

M.S. Knyazeva: development of the research concept, obtaining data for analysis by reverse transcription and polymerase chain reaction methods, analysis of the obtained data, review of publications on the topic of the article, writing article;

V.A. Zagoruiko: collection of biomaterial;

A.V. Khokhlova, A.S. Artemyeva: conducting histological studies of the collected biomaterial, interpretation of the results obtained;

A.V. Shalaev, I.V. Nazarova, E.I. Sidina: obtaining data for analysis by reverse transcription and polymerase chain reaction methods, analysis of the results obtained; conducting histological studies of the collected biomaterial, interpretation of the results obtained;

L.M. Zabegina: isolation of RNA from the obtained biomaterial;

A.K. Nosov: analysis of the obtained results, scientific editing;

S.A. Protsenko: collection of biomaterial, scientific editing;

A.V. Malek: development of the research concept, analysis of the obtained data, review of publications on the topic of the article, scientific editing, writing article.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование финансировалось из бюджета государственного задания ФГБУ «Национальный медицинский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России по теме «Разработка и клиническая апробация методов диагностики и прогнозирования эффекта терапии онкологических заболеваний на основе анализа микроРНК в биопсийном материале».

Funding. The study was funded in the frame of state assignment to N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia to project "Development and clinical testing of methods for diagnostics and prediction of the cancer therapy effect on the base microRNA analysis in biopsy material".

Статья поступила: 17.08.2021. **Принята к публикации:** 11.01.2022.

Article submitted: 17.08.2021. **Accepted for publication:** 11.01.2022.

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-33-41



Полнотранскриптомный анализ опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии: связь с ответом на предоперационную химиотерапию

М.К. Ибрагимова^{1,2}, М.М. Цыганов¹, Н.В. Литвяков^{1,3}

¹ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; Россия, 634009 Томск, Кооперативный пер., 5;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»; Россия, 634050 Томск, проспект Ленина, 36;

³Северский биофизический научный центр Федерального медико-биологического агентства России; Россия, 636039 Северск, Коммунистический проспект, 87

Контакты: Марина Константиновна Ибрагимова imk1805@yandex.ru

Введение. Лечение рака молочной железы во многих случаях включает системную химиотерапию в неoadъювантном режиме. Согласно данным литературы частота полного морфологического ответа опухоли значительно варьирует в зависимости от ее молекулярного подтипа, однако даже при самом чувствительном, трижды негативном подтипе она не превышает 50 %. В связи с этим актуальны поиск генетических предикторов ответа опухоли на предоперационное лечение и оценка изменений, которые происходят в опухоли в процессе неoadъювантной химиотерапии.

Цель исследования – проведение полнотранскриптомного анализа опухоли молочной железы в ходе неoadъювантной химиотерапии в зависимости от ответа на предоперационное лечение.

Материалы и методы. В исследование включены 39 пациентов с раком молочной железы люминального В HER2-позитивного подтипа (human epidermal growth factor receptor 2, рецептор эпидермального фактора роста, тип 2), получавшие 6–8 курсов неoadъювантной химиотерапии. Были исследованы парные образцы биопсийного и операционного материала. Полнотранскриптомный микроматричный анализ проводился с использованием платформы Clariom™ S Assay, human (Affymetrix, США).

Результаты. При сравнении экспрессионного профиля пациентов с наличием и отсутствием объективного ответа на лечение до проведения неoadъювантной химиотерапии было выявлено 166 дифференциально экспрессирующихся генов (13 up-regulated, 153 down-regulated). При сравнении экспрессионного профиля до и после лечения у больных с полной и частичной регрессией выявлено 680 дифференциально экспрессирующихся генов, а у больных со стабилизацией или прогрессированием – 3240 этих генов. С помощью построения диаграммы Венна было показано, что 105 дифференциально экспрессирующихся генов являются общими для пациентов с наличием/отсутствием объективного ответа на неoadъювантную химиотерапию до и после лечения.

Заключение. Был проведен первичный скрининг генов в опухоли молочной железы до лечения. Выявлены гены, экспрессия которых до терапии статистически значимо различалась у больных с объективным ответом на неoadъювантную химиотерапию и его отсутствием. Дальнейшая валидация данных генов на независимой выборке даст возможность разработать генетическую панель для определения ответа на неoadъювантную химиотерапию. Оценка изменения экспрессии опухолевых генов в ходе лечения у больных в зависимости от ответа на эту терапию может быть полезна для разработки в дальнейшем панели генов, выявление изменений которых позволит судить о клиническом ответе опухоли на химиотерапию, а также выделить ключевые клеточные процессы, меняющие активность генов в процессе терапии.

Ключевые слова: рак молочной железы, неoadъювантная химиотерапия, полнотранскриптомный анализ, экспрессионный профиль опухоли, дифференциально экспрессирующиеся гены

Для цитирования: Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Литвяков Н.В. Полнотранскриптомный анализ опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии: связь с ответом на предоперационную химиотерапию. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(1):33–41. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-33-41.

Whole transcriptome analysis of breast tumors during neoadjuvant chemotherapy: association with response to preoperative chemotherapy

M. K. Ibragimova^{1,2}, M. M. Tsyganov¹, N. V. Litviakov^{1,3}

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

²Tomsk State University; 36 Lenin Prospekt, Tomsk 634050, Russia;

³Seversk Biophysical Research Center of the Federal Medical and Biological Agency; 87 Kommunistichesky Prospekt, Seversk 636039, Russia

Contacts: Marina Konstantinovna Ibragimova imk1805@yandex.ru

Introduction. Treatment of breast cancer often includes systemic neoadjuvant chemotherapy. The frequency of complete morphological response varies significantly depending on the molecular subtype of tumor. However, even in triple negative breast cancer, which is considered the most sensitive, it does not exceed 50 %. Therefore, the search for new genetic predictors of tumor response to preoperative treatment, as well as the assessment of tumor changes during neoadjuvant chemotherapy are highly relevant.

Objective – to perform whole-transcriptome analysis of breast cancer during neoadjuvant chemotherapy depending on tumor response to preoperative treatment.

Materials and methods. This study included 39 patients with luminal B HER2-positive (human epidermal growth factor receptor 2) breast cancer who received 6 to 8 cycles of neoadjuvant chemotherapy. We performed whole-transcriptome analysis of paired biopsy and surgical specimens using the Clariom™ S Assay, human (Affymetrix, USA).

Results. We observed significant differences in the pretreatment expression of 166 genes (13 were up-regulated and 153 were down-regulated) between patients with objective response to therapy and those without it. Comparison of pre- and post-treatment expression profiles demonstrated 680 differentially expressed genes in patients with complete and partial response and 3240 differentially expressed genes in patients with stable or progressive disease. Venn diagram showed that patients with and without objective response to neoadjuvant chemotherapy shared 105 differentially expressed genes.

Conclusion. We performed primary screening of genes in breast tumors before therapy and identified genes whose pre-treatment expression differed significantly between patients with objective response to neoadjuvant chemotherapy and those without it. Further validation of these genes in an independent sample will allow the development of a genetic panel to evaluate the response to neoadjuvant chemotherapy. Assessment of changes in the expression of tumor genes during treatment depending on patient's response to therapy can be useful for further development of a panel of genes, which will enable the evaluation of clinical response to chemotherapy, as well as identification of key cellular processes that change the activity of genes during therapy.

Key words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, whole-transcriptome analysis, tumor expression profile, differential gene expression

For citation: Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., Litviakov N.V. Whole transcriptome analysis of breast tumors during neoadjuvant chemotherapy: association with response to preoperative chemotherapy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(1):33–41. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-33-41.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день на рак молочной железы (PMЖ) приходится 1 из 4 случаев злокачественных новообразований (ЗНО) у женщин и 1 из 6 случаев смерти от рака. В 2020 г. PMЖ занял 1-е место в заболеваемости ЗНО у женщин, до этого такую позицию занимал рак легких. Согласно данным Global Cancer Statistics в 2020 г. в мире зарегистрировано 2,3 млн (11,7 %) новых случаев PMЖ [1].

Как известно, лечение PMЖ носит комбинированный характер и во многих случаях подразумевает системную неoadъювантную химиотерапию (НХТ) [2]. В идеальном варианте применение предоперационной терапии приводит к достижению полного морфологического ответа (pCR) опухоли. Однако в клинической практике в зависимости от молекулярного подтипа такая ситуация наблюдается только в 1–45 % случаев. Это показано в работе W. Naqе и соавт. Авторы оценили частоту

полного pCR PMЖ на НХТ в зависимости от молекулярного подтипа опухоли. В исследование были включены 13939 больных PMЖ: 322 (2 %) пациента с раком люминального А подтипа, 5941 (43 %) – с раком люминального В подтипа, 2274 (16 %) – с HER2-позитивным (human epidermal growth factor receptor 2, рецептор эпидермального фактора роста, тип 2) и 5402 (39 %) – с трижды негативным PMЖ. Было выявлено, что 19 % пациентов достигли pCR. Самый низкий pCR наблюдался при PMЖ люминального А подтипа (0,3 %), самый высокий – при HER2-позитивном PMЖ (38,7 %) [3].

L.M. Spring и соавт. провели метаанализ, посвященный определению pCR после НХТ и его влияния на развитие рецидива и показатели выживаемости при PMЖ. Были проанализированы данные по 27895 пациентам. Авторы выявили, что 5-летней безрецидивной выживаемости достигли 90 % пациентов с pCR и 65 % пациентов без pCR [4].

За исключением молекулярных подтипов отсутствуют общепринятые маркеры прогноза эффективности НХТ. Однако не совсем понятны изменения экспрессионного профиля опухоли во время лечения, неясно, какие клеточные пути задействованы при ее объективном ответе на терапию или при его отсутствии. В связи с этим актуальным является подход к предикции ответа на лечение, основывающийся на оценке более универсальных генетических маркеров. Экспрессионные маркеры являются наиболее перспективными, поскольку в отличие от геномных маркеров они довольно изменчивы, а в отличие от системы RCB (residual cancer burden – ложе остаточной опухоли) – количественные и могут иметь различные градации. Кроме того, необходимо анализировать и изменение экспрессионного профиля опухоли под действием НХТ, поскольку она может индуцировать у больных РМЖ образование новых мутаций, приводящих к формированию резистентности и прогрессированию опухолевого процесса [5]. Групповой анализ изменения экспрессионного профиля опухоли в ходе НХТ в зависимости от клинического эффекта позволит также определить ключевые гены и клеточные пути, влияющие на эффективность лечения.

В представленном исследовании для определения изменений экспрессионного профиля в процессе НХТ был проведен полнотранскриптомный анализ опухоли молочной железы у пациентов с наличием и отсутствием объективного ответа на лечение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 39 пациентов с РМЖ (T1–4N0–2M0, IА–IIIВ стадия) люминального В HER2-позитивного подтипа (ER+, PR+/-, Ki67 >30 %) и с морфологически верифицированным диагнозом 25–68 лет (средний возраст – 48,7 ± 0,3 года). Все больные получали 6–8 курсов системной НХТ: АС (доксорубин + циклофосфан), САХ (циклофосфан + доксорубин + кселода), СР (циклофосфан + платина), АСТ (доксорубин + циклофосфамид + доцетаксел) и АТ (доксорубин + доцетаксел), а также таксотер в монорежиме. Визуализация первичного поражения молочной железы была выполнена с помощью маммографии и ультразвукового исследования (УЗИ). Всем пациентам проведено хирургическое вмешательство (радикальная/подкожная мастэктомия, радикальная резекция, секторальная резекция с аксиллярной лимфаденэктомией, другой вид органосохраняющей операции) с последующей гормональной и лучевой терапией (при наличии метастазов в лимфатические узлы).

Клинические ответы были разделены, согласно классификации Всемирной организации здравоохранения, на полную регрессию (ПР, pCR), частичную регрессию (ЧР), стабилизацию (СТ) и прогрессирование (П). В табл. 1 представлена клиничко-морфологическая характеристика пациентов с РМЖ.

Таблица 1. Клиничко-морфологическая характеристика пациентов с раком молочной железы

Table 1. Clinical and morphological characteristics of patients with breast cancer

| Параметр Parameter | Число пациентов, абс. (%) Number of patients, abs. (%) |
|---|---|
| Менструальный статус: Menstrual status: | |
| репродуктивный/пременопауза reproductive/premenopausal | 22 (56,4) |
| постменопауза postmenopause | 17 (43,6) |
| Гистологический тип: Histological type: | |
| инвазивный протоковый рак invasive ductal cancer | 34 (87,2) |
| инвазивный дольковый рак invasive lobular cancer | 2 (5,1) |
| другие типы other | 3 (7,7) |
| Размеры первичной опухоли, сТ: Primary tumor size, cT: | |
| T1–2 | 36 (92,3) |
| T3–4 | 3 (7,7) |
| Поражение лимфатических узлов, сN: Lymph node involvement, cN: | |
| N0 | 16 (41,0) |
| N1–2 | 23 (58,9) |
| Схема неoadьювантной химиотерапии: Neoadjuvant chemotherapy regimen: | |
| САХ | 8 (20,5) |
| АС | 18 (46,1) |
| таксотер в монорежиме monotherapy with taxotere | 6 (15,4) |
| АТ/АСТ | 3 (7,7) |
| СР | 4 (10,3) |
| Ответ на лечение: Response to treatment: | |
| прогрессирование и стабилизация progressive disease and stable disease | 12 (30,8) |
| частичная регрессия partial response | 27 (69,2) |

Примечание. САХ – циклофосфан + доксорубин + кселода; АС – доксорубин + циклофосфан; АТ – доксорубин + доцетаксел; АСТ – доксорубин + циклофосфамид + доцетаксел; СР – циклофосфан + платина.
Note. САХ – cyclophosphamide + doxorubicin + xeloda; АС – doxorubicin + cyclophosphamide; АТ – doxorubicin + docetaxel; АСТ – doxorubicin + cyclophosphamide + docetaxel; СР – cyclophosphamide + platinum.

Материалом для исследования служили парные образцы биопсийного материала до лечения и операционного материала каждого пациента. Был проведен полнотранскриптомный анализ опухоли молочной железы до и после НХТ. Учитывая отсутствие операционного материала у пациентов с ПР, были использованы биопсийные и опухолевые образцы от пациентов с 3 типами ответов на НХТ: ЧР (объективный ответ), СТ и П (отсутствие объективного ответа).

Забор материала до начала лечения проводили с помощью pistolетной биопсии под контролем УЗИ. РНК из парных образцов выделялась с использованием набора RNeasy mini kit plus (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Микроматричный анализ. Экспрессионный ландшафт пациентов до и после НХТ оценивали при помощи полнотранскриптомного микроматричного анализа с использованием микрочипов Clariom™ S Assay, human (Affymetrix, США).

Статистический анализ. Для обработки результатов микрочипирования (анализа ДЭГ, в том числе построения тепловых карт и определения сигнальных путей) использовалась программа Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0.

Идентификация дифференциально экспрессирующихся генов. При микроматричном исследовании были получены необработанные экспрессионные данные. Далее для идентификации дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) использовался пакет программ Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0. Применена поправка на множественные сравнения FDR (false discovery rate) (FDR Pval < 0,05). Порог ДЭГ был установлен на уровне $p < 0,05$ (диапазон изменения (Fold change): >2 или < -2).

Определение значимых сигнальных путей. С помощью программы TAC software 4.0 определены все сигнальные пути, изменения экспрессии генов которых статистически значимы ($p < 0,05$).

Дизайн исследования схематично представлен на рис. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе экспрессионного профиля пациентов с РМЖ до и после НХТ было выявлено 414 ДЭГ (33 up-regulated, 381 down-regulated). Тепловая карта ДЭГ в опухоли больных РМЖ представлена на рис. 2.

Определены топ-10 up-regulated ДЭГ (*H2AFX*, *HIST1H2AL* (*HIST1H2BN*), *HIST1H2BL*, *SERINC2*, *MKI67*, *CENPF*, *UBE2C*, *HIST1H1B*, *MYB*, *RARA*) и топ-10 down-regulated ДЭГ (*RGS2*, *CD1C*, *ABCB5*, *MIR6843*, *EGR2*, *ADIPOQ*, *FCERIA*, *DCDC2*, *ADH1B*, *DUSP1*).

Также на этапе оценки изменения экспрессионного профиля больных РМЖ при проведении НХТ были выделены топ-10 сигнальных путей, активность которых в общей группе статистически значимо менялась под действием НХТ, включающие malignant pleural mesothelioma (злокачественная плевральная мезотелиома), VEGFA/VEGFR2 (эндотелиальный фактор роста сосудов А/рецептор 2 фактора роста эндотелия сосудов), orexin receptor (рецептор орексина), PI3K (фосфоинозитид-3-киназа)/Akt, focal adhesion (фокальная адгезия): PI3K/Akt/mTOR (мишень рапамицина млекопитающих), nuclear receptors meta-pathway (мета-путь ядерных рецепторов), PodNet: protein-protein interactions in the podocyte (сеть межбелковых взаимодействий подоцитов), spinal cord injury (травма спинного мозга), myometrial relaxation and contraction pathways (пути расслабления и сокращения миометрия) и MAPK (митоген-активируемые протеинкиназы). Полный список таких сигнальных путей представлен в табл. 2 (см. дополнительный материал к статье в приложении).

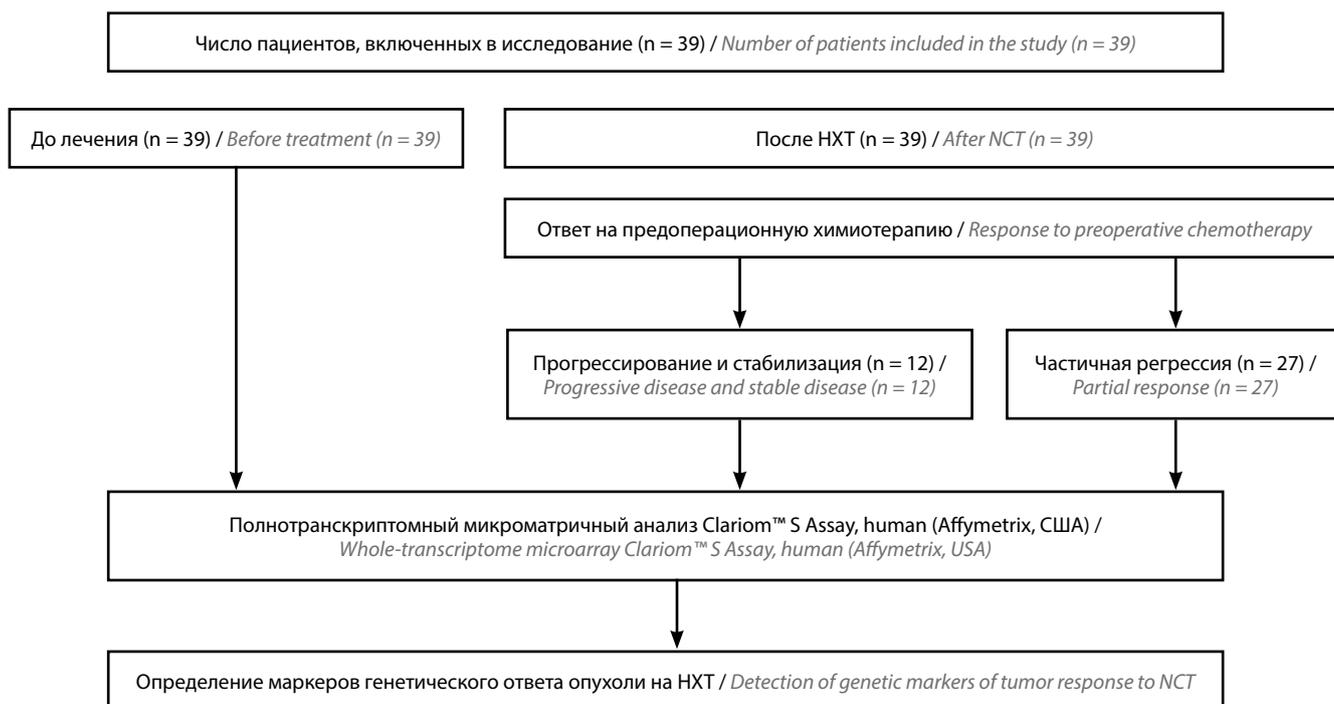


Рис. 1. Дизайн исследования. НХТ – неoadъювантная химиотерапия
Fig. 1. Study design. NCT – neoadjuvant chemotherapy

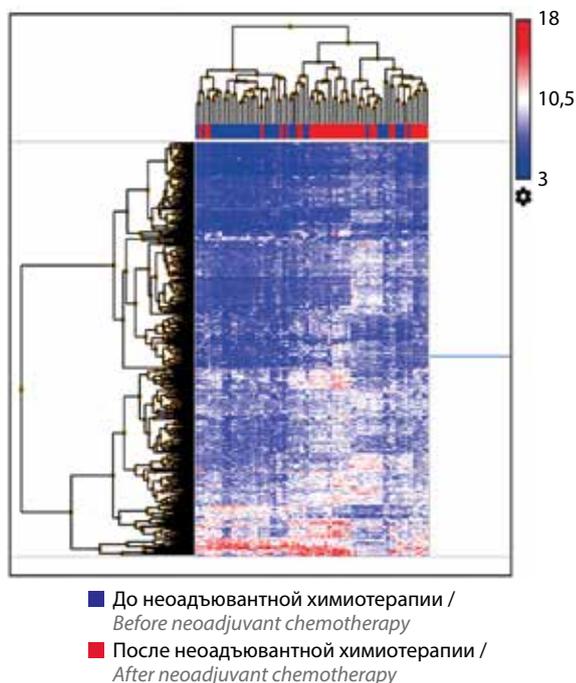


Рис. 2. Тепловая карта дифференциально экспрессирующихся генов в опухоли пациентов с раком молочной железы до и после неoadьювантной химиотерапии. Синим цветом обозначена кластеризация данных до лечения, а красным — после проведения терапии (сверху — по пациентам, слева — по генам)

Fig. 2. Heatmap demonstrating differential gene expression in breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy. Blue denotes clustering of pretreatment data; red denotes clustering of posttreatment data (top — by patients, left — by genes)

к журналу «Успехи молекулярной онкологии»: <https://umo.abvpress.ru/jour/issue/archive>).

На следующем этапе проведено сравнение экспрессионного профиля пациентов с различным ответом на лечение до НХТ. В опухоли больных с объективным ответом (ЧР) или его отсутствием (СТ + П) до терапии было выявлено 166 генов ДЭГ (153 down-regulated и 13 up-regulated). Тепловая карта ДЭГ в опухоли больных РМЖ до лечения в зависимости от ответа НХТ представлена на рис. 3, уровень экспрессии ДЭГ в опухоли молочной железы до лечения в зависимости от ответа на НХТ — в табл. 3 (см. дополнительный материал к статье в приложении к журналу «Успехи молекулярной онкологии»: <https://umo.abvpress.ru/jour/issue/archive>). Согласно данным, представленным на рис. 3, можно четко выделить пациентов с объективным ответом (PR1 — красный цвет) и его отсутствием (SD1 — синий цвет). Это свидетельствует о том, что скрининг достаточно успешен и дальнейшая валидация может выявить гены, которые можно будет использовать для предикции ответа на НХТ.

Также на этапе сравнения экспрессионного профиля пациентов до проведения предоперационной химиотерапии (ХТ) в зависимости от эффекта НХТ были выделены топ-10 клеточных сигнальных путей, активность которых до лечения у пациентов с объективным ответом на терапию и его отсутствием

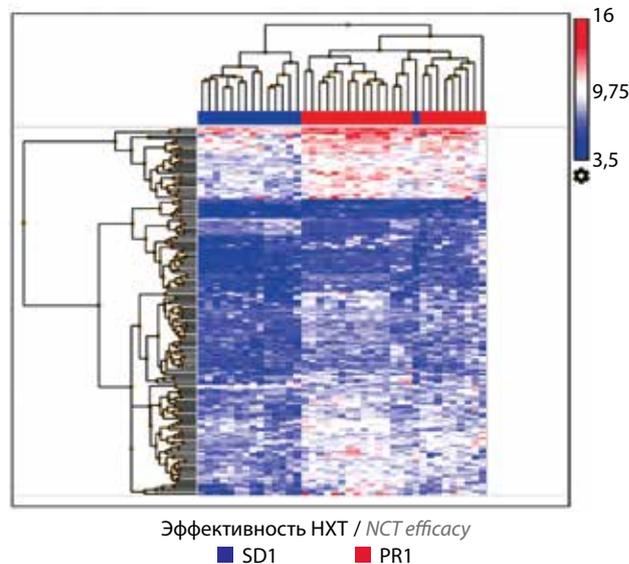


Рис. 3. Тепловая карта дифференциально экспрессирующихся генов в опухоли пациентов с раком молочной железы до лечения в зависимости от ответа на предоперационную химиотерапию. Синим цветом обозначена кластеризация данных при отсутствии объективного ответа на лечение (SD1), красным цветом — при его наличии (PR1) (сверху — по пациентам, слева — по генам). НХТ — неoadьювантная химиотерапия

Fig. 3. Heatmap demonstrating differential gene expression in breast cancer before treatment depending on the response to preoperative chemotherapy. Blue denotes clustering of data in case of no objective response to therapy (SD1); red denotes clustering of data in case of objective response to therapy (PR1) (top — by patients, left — by genes). NCT — neoadjuvant chemotherapy

статистически значимо различается: overview of proinflammatory and profibrotic mediators (провоспалительные и профибротические медиаторы), opioid receptor pathway annotation (опиоидный рецептор), fatty acid transporters (переносчики жирных кислот), extracellular vesicles in the crosstalk of cardiac cells (внеклеточные везикулы в перекрестных помехах сердечных клеток), eicosanoid synthesis (синтез эйкозаноидов), angiogenesis, biosynthesis of electrophilic omega-3 PUFA oxo-derivatives (ангиогенез и биосинтез электрофильных оксопроизводных омега-3-полиненасыщенных жирных кислот), miRNA degrading enzymes (ферменты, разрушающие miRNA), biosynthesis of DPA-derived SPMs (specialized pro-resolving mediators) (биосинтез медиаторов, полученных из докозапентаеновой кислоты), kinase-mediated control of CRTC2 and HDAC4/5/7 subcellular localization and activity 9 (киназо-опосредованный контроль субклеточной локализации и активности CRTC2 и HDAC4/5/7). Полный перечень этих сигнальных путей представлен в табл. 4 (см. дополнительный материал к статье в приложении к журналу «Успехи молекулярной онкологии»: <https://umo.abvpress.ru/jour/issue/archive>).

Далее было проведено сравнение экспрессионного профиля пациентов до и после НХТ в зависимости от ответа на лечение. В опухоли больных с ЧР выявлено 680 ДЭГ, в опухоли больных с отсутствием ответа (СТ + П) — 3240 ДЭГ. При отсутствии объективного

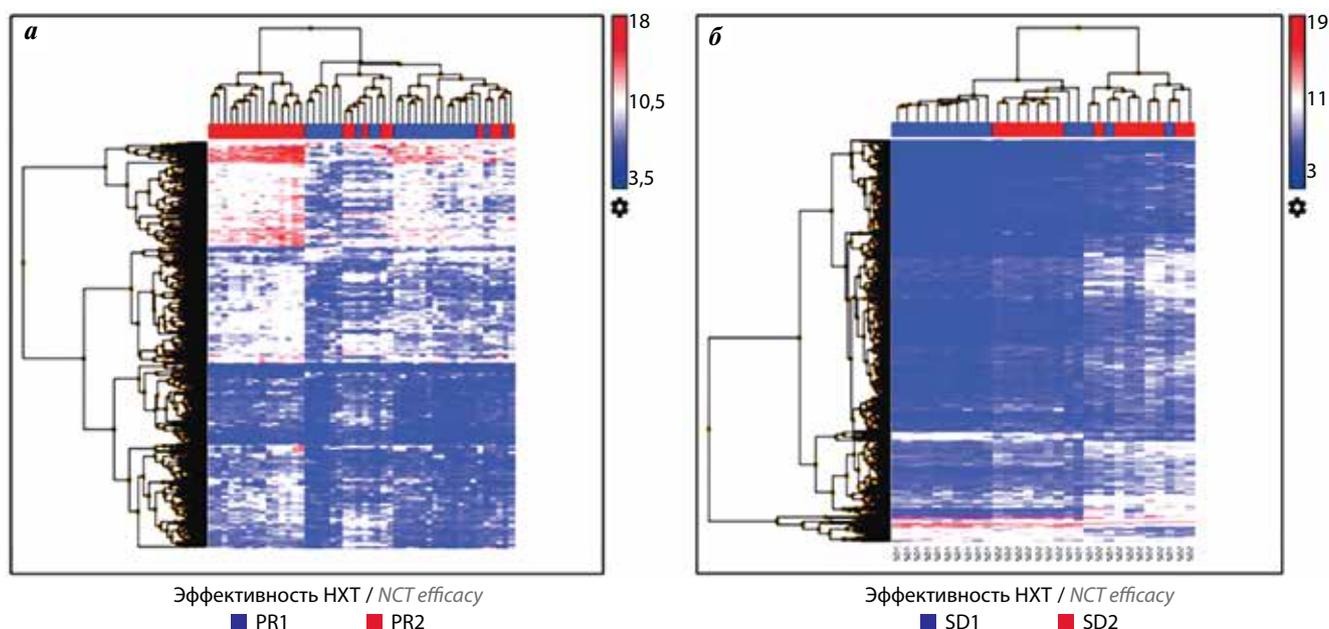


Рис. 4. Тепловая карта дифференциально экспрессирующихся генов в опухоли пациентов с раком молочной железы до и после неoadъювантной химиотерапии: а – с наличием объективного ответа на лечение (PR1 и PR2); б – с его отсутствием (SD1 и SD2). Синим цветом обозначена кластеризация данных до лечения (PR1 и SD1), красным цветом – после него (PR2 и SD2)

Fig. 4. Heatmap demonstrating differential gene expression in breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy: а – with objective response to therapy (PR1 and PR2); б – with no objective response to therapy (SD1 and SD2). Blue denotes clustering of pretreatment data (PR1 and SD1); red denotes clustering of posttreatment data (PR2 and SD2)

ответа на предоперационное лечение количество ДЭГ увеличилось почти в 5 раз. Тепловая карта ДЭГ в опухоли пациентов с РМЖ в зависимости от ответа на НХТ представлена на рис. 4.

Также на данном этапе анализа были выделены топ-10 клеточных сигнальных путей для пациентов с объективным ответом на НХТ (VEGFA/VEGFR2, nuclear receptors meta-pathway, focal adhesion: PI3K/Akt/mTOR, PI3K/Akt, orexin receptor pathway, network map of SARS-CoV-2 signaling pathway (сетевая карта сигнального пути SARS-CoV-2), PodNet: protein-protein interactions in the podocyte, focal adhesion, myometrial relaxation and contraction pathways, NRF2 (ядерный фактор, связанный с эритроидом 2, фактор 2) и с его отсутствием (olfactory receptor activity (активность обонятельных рецепторов), GPCRs (рецепторы, сопряженные с G-белком), class A rhodopsin-like (родопсиноподобные рецепторы класса A), nuclear receptors meta-pathway, PI3K/Akt, VEGFA/VEGFR2, metapathway biotransformation Phase I and II (пути биотрансформации фаз I и II), focal adhesion: PI3K/Akt/mTOR, orexin receptor pathway, overview of proinflammatory and profibrotic mediators, circadian rhythm genes (гены, связанные с циркадными ритмами)).

Полный перечень сигнальных клеточных путей, активность которых статистически значимо различается при сравнении экспрессионного профиля пациентов с наличием объективного ответа на НХТ до и после лечения приведен в табл. 5, 6 (см. дополнительный материал к статье в приложении к журналу «Успехи молекулярной онкологии»: <https://umo.abv-press.ru/jour/issue/archive>).

Далее с помощью построения диаграммы Венна было показано, что 105 ДЭГ являются общими для пациентов с наличием/отсутствием объективного ответа на НХТ до и после лечения (табл. 7). Описание ДЭГ и характерные сигнальные пути для каждого из 105 генов представленной в работе панели можно найти в табл. 8 (см. дополнительный материал к статье в приложении к журналу «Успехи молекулярной онкологии»: <https://umo.abvpress.ru/jour/issue/archive>).

Эти гены изменяют свою экспрессию в процессе НХТ и у больных с объективным ответом на НХТ, и у больных с его отсутствием, поэтому могут быть рассмотрены в качестве маркеров клинического ответа РМЖ на НХТ.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате сравнения экспрессионного профиля пациентов до проведения предоперационной ХТ в зависимости от эффекта НХТ получена предварительная панель маркеров для предсказания результативности схем лечения. Данная панель представлена 166 генами, однако с учетом ее неспецифичности после валидации полученных данных можно рассматривать группу выявленных ДЭГ в качестве маркеров определения эффективности схем НХТ, применяемых для лечения РМЖ в системной ХТ в неoadъювантном режиме.

В настоящее время в литературе встречаются данные о связи генов, включенных в указанную выше панель, с течением РМЖ. Так, по некоторым генам из 153 down-regulated генов опубликованы следующие данные. В ретроспективном исследовании, в которое

Таблица 7. Дифференциально экспрессирующиеся гены у пациентов с раком молочной железы с наличием/отсутствием объективного ответа на неoadъювантную химиотерапию до и после лечения

Table 7. Differential gene expression in breast cancer patients with/without objective response to neoadjuvant chemotherapy before and after treatment

| Хромо-сома Chromo- some | Дифференциально экспрессирующиеся гены Differential gene expression |
|-------------------------------|---|
| chr1 | <i>ST3GAL3 (MIR6079), ZFYVE9, CYR61, PLPPR4, CDIC, ATP1A2, RGL1, RGS1, CENPF, SELP, GSTM5, AKNAD1, SELE</i> |
| chr2 | <i>VIT, B3GALT1, DHRS9, MYO3B, NRXN1, TACR1, ACVR1C, PDE11A, IL1RL1, C2orf61</i> |
| chr3 | <i>SYN2, CIDEC, PROS1, BCHE, CCDC39</i> |
| chr4 | <i>PROL1, MMRN1, ANK2, MYOZ2, ADH1A, ADH1C, NR3C2, MGARP</i> |
| chr5 | <i>FBXL7, GPX3, KCNIP1, CRHBP, FAM153C, FAM169A</i> |
| chr6 | <i>NCOA7, HIST1H3F, HIST1H2BL, CLIC5, BMP5, PLAGL1 (HYMAI), MLIP</i> |
| chr7 | <i>CREB5, IGFBP1, ELN, RUNDC3B, PTPRZ1, RELN, ESYT2</i> |
| chr8 | <i>BHLHE22, EBF2</i> |
| chr9 | <i>TEK, GALNT12, NR4A3, ZNF483, FREM1, CNTNAP3, PRUNE2</i> |
| chr10 | <i>CACNB2, ZNF365, CDNF, MKI67</i> |
| chr11 | <i>GSTP1, PDGFD, TREN, H2AFX, OR56B1, IGF2 (INS-IGF2), HBG2 (HBG1)</i> |
| chr12 | <i>KCNA1, CAPZA3, KCNMB4, RERGL</i> |
| chr13 | <i>KL</i> |
| chr14 | <i>PELI2, FOS, CMA1</i> |
| chr17 | <i>C17orf51</i> |
| chr19 | <i>ZNF677, LILRB5</i> |
| chr20 | <i>TPX2, BPI, KCNB1</i> |
| chr21 | <i>SIK1, TMPRSS2</i> |
| chrX | <i>XGY2, EGFL6, CNKSR2, TCEAL7, PLP1, PAK3, ALAS2, ZC4H2, SLC7A3, CHRDL1, CAPN6, GPC3</i> |

вошли более 1000 пациентов с ранним РМЖ, было показано, что высокий уровень экспрессии гена *CXCL13* коррелирует с высокими показателями безрецидивной и общей выживаемости [6]. Также выявлено, что ген *MMP9* является важным компонентом формирования метастатической ниши на ранних стадиях туморогенеза РМЖ и способствует колонизации циркулирующих опухолевых клеток в легких [7]. К тому же при инвазивном трижды негативном РМЖ

наблюдается высокая экспрессия гена *LMNB2*, что коррелирует с клиническими особенностями данного подтипа, включая стадию и метастазирование в лимфатические узлы [8]. В недавней работе также было показано, что онколитический аденовирус, несущий ген человеческого интерлейкина-15 (IL-15), проявляет иммуномодулирующий эффект. Онколитический вирус SG400-E2F/IL-15, в свою очередь, характеризуется повышенной противоопухолевой активностью как *in vitro*, так и *in vivo*, и представляет собой экспериментальную основу для «вирус-генного» РМЖ [9]. Относительно up-regulated генов показано, что при РМЖ высокие уровни экспрессии *HOXB13* связаны не только с прогрессированием заболевания у пациентов с эстроген-рецептор-положительными опухолями, но и с возникновением устойчивости к лечению тамоксифеном [10, 11]. Обсуждается и роль *CD1d* в развитии РМЖ. Показано, что этот лиганд экспрессируется во многих опухолевых клетках, включая клетки РМЖ (MDA-MB-231, MDA-MB-361 и SUM-159) [12].

Также в результате сравнения экспрессионного профиля пациентов до и после НХТ в зависимости от ответа на лечение были выявлены изменения экспрессии генов в процессе лечения (в том числе при наличии и отсутствии объективного ответа). Обнаружено, что 105 генов изменяют свою экспрессию в опухоли в ходе НХТ и при наличии объективного ответа, и при его отсутствии. После валидации полученных результатов в перспективе с помощью данной панели генов можно будет оценивать клинический ответ опухоли на предоперационную ХТ.

Согласно данным литературы у 2 из 105 генов есть связь с РМЖ. При изучении ассоциации уровня экспрессии семейства BMP (bone morphogenetic protein) и выживаемости пациентов с РМЖ с использованием «Атласа ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA) было выявлено, что высокие уровни экспрессии *BMP1* ($p < 0,001$), *BMP3* ($p = 0,002$), *BMP5* ($p = 0,002$), *BMP7* ($p < 0,001$) и *BMPRIA* ($p < 0,001$) связаны с хорошими показателями общей выживаемости. Высокие уровни экспрессии *BMP6* ($p < 0,001$), *BMP8A* ($p = 0,031$), *BMP8B* ($p < 0,001$) и *BMPRI1B* ($p = 0,005$), напротив, ассоциированы с худшими показателями общей выживаемости [13]. Также обнаружено, что генетическая и фармакологическая инактивация гена *GSTP1* ухудшает выживаемость клеток трижды негативного РМЖ, что позволило рассматривать ингибиторы данного гена как новую терапевтическую мишень для борьбы с самым агрессивным молекулярным подтипом данного заболевания. Показано, что экспрессия гена *GSTP1* выше в группе химиорезистентного к НХТ РМЖ [14–16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования были получены данные по экспрессионному профилю пациентов до проведения предоперационной ХТ в зависимости от эффекта

НХТ, что позволило провести скрининг и определить группу неспецифических маркеров (генов) прогнозирования эффективности схем НХТ. Оценка изменения экспрессии опухолевых генов в процессе НХТ у боль-

ных в зависимости от ответа на лечение может быть полезна для разработки в дальнейшем панели генов, выявление изменения которых позволит судить о клиническом ответе опухоли на ХТ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- 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;71:209–49. DOI: 10.3322/caac.21660.
- Стенина М.Б., Жукова Л.Г., Королева И.А. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака молочной железы. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO #3s2 2020;10. [Stenina M.B., Zhukova L.G., Koroleva I.A. et al. Practical recommendations for the drug treatment of breast cancer. *Malignant tumors: Practical Recommendations of RUSSCO #3s2 2020;10.* (In Russ.)]. DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-09. Доступно по: <https://www.rosoncweb.ru/standarts/RUSSCO/2020/2020-09.pdf>.
- Haque W., Verma V., Hatch S. et al. Response rates and pathologic complete response by breast cancer molecular subtype following neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2018;170(3):559–67. DOI: 10.1007/s10549-018-4801-3.
- Spring L.M., Fell G., Arfe A. et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy and impact on breast cancer recurrence and survival: a comprehensive meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2020;26(12):2838–48. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3492.
- Ibragimova M., Tsyganov M., Litviakov N. Natural and chemotherapy-induced clonal evolution of tumors. *Biochemistry (Mosc)* 2017;82(4):413–25. DOI: 10.1134/S0006297917040022.
- Razis E., Kalogeras K.T., Kotsantis I. et al. The role of CXCL13 and CXCL9 in early breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2020(1);20:e36–53. DOI: 10.1016/j.clbc.2019.08.008.
- Owyong M., Chou J., van den Bijgaart R.J.E. et al. MMP9 modulates the metastatic cascade and immune landscape for breast cancer anti-metastatic therapy. *Life Sci Alliance* 2019;2(6): e201800226. DOI: 10.26508/lsa.201800226.
- Zhao C.-C., Chen J., Zhang L.-Y. et al. Lamin B2 promotes the progression of triple negative breast cancer via mediating cell proliferation and apoptosis. *Biosci Rep* 2021;41(1):BSR20203874. DOI: 10.1042/BSR20203874.
- Yan Y., Xu H., Wang J. et al. Inhibition of breast cancer cells by targeting *E2F-1* gene and expressing IL15 oncolytic adenovirus. *Biosci Rep* 2019;39(7):BSR20190384. DOI: 10.1042/BSR20190384.
- Liu B., Wang T., Wang H. et al. Oncoprotein HBXIP enhances HOXB13 acetylation and co-activates HOXB13 to confer tamoxifen resistance in breast cancer. *J Hematol Oncol* 2018;11(1):26. DOI: 10.1186/s13045-018-0577-5.
- Liu J., Prager-van der Smissen W.J.C., Collée J.M. et al. Germline HOXB13 mutations p.G84E and p.R217C do not confer an increased breast cancer risk. *Sci Rep* 2020;10(1):9688. DOI: 10.1038/s41598-020-65665-y.
- Shyanti R.K., Sehrawat A., Singh S.V. et al. Zerumbone modulates CD1d expression and lipid antigen presentation pathway in breast cancer cells. *Toxicol in Vitro* 2017;44:74–84. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.06.016.
- Katsuta E., Maawy A.A., Yan L. et al. High expression of bone morphogenetic protein (BMP) 6 and BMP7 are associated with higher immune cell infiltration and better survival in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncol Rep* 2019;2(4): 1413–21. DOI: 10.3892/or.2019.7275.
- Yang S.-J., Wang D.-D., Li J. et al. Predictive role of GSTP1-containing exosomes in chemotherapy-resistant breast cancer. *Gene* 2017;623:5–14. DOI: 10.1016/j.gene.2017.04.031.
- Yang M., Li Y., Shen X. et al. CLDN6 promotes chemoresistance through GSTP1 in human breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2017;36:157. DOI: 10.1186/s13046-017-0627-9.
- Louie S.M., Grossman E.A., Crawford L.A. et al. GSTP1 Is a driver of triple-negative breast cancer cell metabolism and pathogenicity. *Cell Chem Biol* 2016;23(5):567–78. DOI: 10.1016/j.chembiol.2016.03.017.

Вклад авторов

М.К. Ибрагимова: получение и анализ данных, обзор публикаций по теме статьи; написание текста статьи;

М.М. Цыганов: получение данных для анализа;

Н.В. Литвяков: разработка дизайна исследования, анализ данных, редактирование статьи.

Authors' contribution

M.K. Ibragimova: obtaining and analyzing data, review of publications on the topic of the article, article writing;

M.M. Tsyganov: obtaining data for analysis;

N.V. Litviakov: development of the research concept, data analysis, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.К. Ибрагимова / M.K. Ibragimova: <https://orcid.org/0000-0001-8815-2786>

М.М. Цыганов / M.M. Tsyganov: <https://orcid.org/0000-0001-7419-4512>

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 interest.

Финансирование. Работа выполнена в рамках конкурса 2021–2023 гг. на получение стипендии Президента РФ молодым ученым и аспирантам.

Financing. The work was carried out within the framework of the 2021–2023 competition for the scholarship of the President of the Russian Federation for young scientists and graduate students.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (9-го пересмотра, 2013 г.). Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (протокол № 1 от 14.01.2013). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with the rights of patients and the rules of bioethics. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration of 1964 (9th revision, 2013). The protocol of the study was approved by the Committee on Biomedical Ethics of the Institute of Oncology of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Protocol No. 1 of 14.01.2013). All patients signed an informed consent to participate in the study.

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-42-47



Ингибирование глюкокортикоидиндуцированной экспрессии *REDD1* рапамицином в клетках рака молочной железы

Д. Д. Григорьева¹, Е. М. Жидкова¹, Е. С. Лылова¹, Д. В. Демина², К. И. Кирсанов^{1,3}, Г. А. Белицкий¹, М. Г. Якубовская¹, Е. А. Лесовая^{1,4}

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

²ФГБУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»; Россия, 119454 Москва, проспект Вернадского, 78;

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;

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

Контакты: Екатерина Андреевна Лесовая lesovenok@yandex.ru

Введение. В комбинированной терапии рака молочной железы в качестве адъюванта для расширения терапевтического интервала основного цитотоксического препарата и снижения побочных эффектов химиотерапии применяют глюкокортикоиды. Однако они вызывают развитие серьезных осложнений и могут способствовать прогрессии опухоли. В последнее десятилетие появились данные о том, что побочные эффекты глюкокортикоидов опосредованы активацией экспрессии гена *REDD1*. На их основе мы разработали новую стратегию химиотерапии злокачественных новообразований кроветворной системы, направленную на уменьшение нежелательных явлений при применении данных препаратов. Успешное тестирование комбинаций глюкокортикоидов и ингибиторов экспрессии *REDD1* на моделях опухолей кроветворной системы позволило использовать данную схему в лечении определенных подтипов рака молочной железы.

Цель исследования – оптимизация условий обработки клеток рака молочной железы комбинацией глюкокортикоидов и ингибиторов экспрессии *REDD1* на примере рапамицина.

Материалы и методы. В работе использовались клетки рака молочной железы MCF-7 и MDA-MB-231. Антипролиферативную активность определяли путем прямого подсчета клеток, экспрессию *REDD1* – методами вестерн-блоттинга и количественной полимеразной цепной реакции.

Результаты. Было показано, что рапамицин может подавлять базальную и индуцированную глюкокортикоидами экспрессию *REDD1* в клетках рака молочной железы люминального и тройного негативного подтипов. Способность этого препарата подавлять жизнеспособность клеток рака молочной железы была гораздо менее выражена, чем клеток лейкозов и лимфом.

Заключение. Наблюдаемое подавление пролиферации клеток рака молочной железы после их инкубации с рапамицином и дексаметазоном, а также способность рапамицина снижать базальную и индуцированную глюкокортикоидами экспрессию *REDD1* в клетках рака молочной железы обуславливают актуальность исследования влияния комбинаций глюкокортикоидов и ингибиторов экспрессии *REDD1* класса модуляторов сигнального пути PI3K/Akt/mTOR (фосфоинозитид-3-киназа/ α -серин-треониновая киназа/мишень рапамицина млекопитающих) на клетки рака молочной железы.

Ключевые слова: *REDD1*, глюкокортикоиды, рецептор глюкокортикоидов, ингибиторы mTOR, рапамицин, сиролimus, рак молочной железы

Для цитирования: Григорьева Д. Д., Жидкова Е. М., Лылова Е. С. и др. Ингибирование глюкокортикоидиндуцированной экспрессии *REDD1* рапамицином в клетках рака молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(1):42–7. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-42-47.

Inhibition of glucocorticoid-induced *REDD1* expression by rapamycin in breast cancer cells

D. D. Grigorieva¹, E. M. Zhidkova¹, E. S. Lylova¹, D. V. Demina², K. I. Kirsanov^{1,3}, G. A. Belitsky¹, M. G. Yakubovskaya¹, E. A. Lesovaya^{1,4}

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

²MIREA – Russian Technological University; 78 Vernadsky Prospekt, Moscow 119454, Russia;

³Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

⁴I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 9 Vysokovoltmaya St., Ryazan 390026, Russia

Contacts: Ekaterina Andreevna Lesovaya lesovenok@yandex.ru

Introduction. Glucocorticoids are often used in combination therapy for breast cancer as an adjuvant to increase therapeutic effects of the main cytotoxic drug and to reduce side effects of chemotherapy. However, glucocorticoids can cause serious complications and trigger tumor progression. In the last decade, it was found that side effects from glucocorticoids are mediated by an increase in *REDD1* gene expression. Using this knowledge, we have developed a new chemotherapeutic strategy for blood cancers aimed at reducing adverse events from glucocorticoids. Successful experiments with a combination of glucocorticoids and *REDD1* expression inhibitors on the models of blood tumors allowed us to use this regimen for the treatment of certain subtypes of breast cancer.

Objective: to optimize the algorithm of breast cancer cell treatment with a combination of glucocorticoids and *REDD1* expression inhibitors on the example of rapamycin.

Materials and methods. We used the MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. The antiproliferative activity was estimated by direct cell count; *REDD1* expression was measured using western blotting and quantitative polymerase chain reaction.

Results. We found that rapamycin can inhibit both baseline and glucocorticoids induced *REDD1* expression in the cells of luminal and triple negative breast cancer. The drug demonstrated lower ability to inhibit the viability of breast cancer cells than that of leukemia and lymphoma cells.

Conclusion. Inhibited proliferation of breast cancer cells after their incubation with rapamycin and dexamethasone, as well as the ability of rapamycin to reduce basal and glucocorticoid-induced *REDD1* expression in breast cancer cells suggest the importance of studies analyzing the impact of combinations that include glucocorticoids and *REDD1* expression inhibitors from the class of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway modulators (phosphoinositide-3-kinase/ α -serine-threonine kinase/mammalian rapamycin target) on breast cancer cells.

Key words: *REDD1*, glucocorticoids, glucocorticoid receptor, mTOR inhibitors, rapamycin, sirolimus, breast cancer

For citation: Grigorieva D.D., Zhidkova E.M., Lylova E.S. et al. Inhibition of glucocorticoid-induced *REDD1* expression by rapamycin in breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(1):42–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-42-47.

ВВЕДЕНИЕ

Для расширения терапевтического интервала и снижения побочных эффектов генотоксичных противоопухолевых препаратов в терапии рака молочной железы (PMЖ) применяют глюкокортикоиды (ГК) [1, 2]. Однако высокие дозы и длительные курсы этих препаратов, используемые при разных подтипах PMЖ, могут способствовать прогрессии опухоли [1, 2].

В ряде исследований было показано, что ГК вызывают повышение экспрессии *REDD1* – консервативного индуцируемого стрессом ингибитора mTOR [3]. Биоинформатический скрининг предполагаемых ингибиторов *REDD1* позволил выявить группу препаратов, для которых на моделях опухолей кроветворной системы были показаны подавление базальной и ГК-индуцированной экспрессии *REDD1* на уровне белка и мРНК *in vitro*, а также синергизм противоопухолевого действия при их комбинировании с ГК и подавление ГК-индуцированного остеопороза и атрофии кожного покрова *in vivo* [4, 5].

Связь подавления экспрессии *REDD1* и снижения атрофических эффектов ГК была показана и на других моделях. Это позволяет предположить, что данный эффект является воспроизводимым вне зависимости от органа или ткани, на которые направлено действие ГК [3, 5, 6]. Стоит отметить, что роль *REDD1* в регуляции пролиферации клеток PMЖ изучена мало и данные о ней весьма противоречивы. Так, в ряде

исследований было показано, что повышение экспрессии *REDD1* после использования химиопрепаратов коррелирует со снижением жизнеспособности клеток PMЖ [7, 8]. Однако в других работах продемонстрирована взаимосвязь повышения экспрессии *REDD1* с неблагоприятным прогнозом при тройном негативном PMЖ [9]. В то же время ингибирование *REDD1* в условиях гипоксии приводит к гиперактивации mTOR и пролиферации опухолевых клеток [10].

В качестве ингибитора *REDD1* в данной работе использован рапамицин, зарекомендовавший себя как эффективный ингибитор экспрессии *REDD1* в исследованиях на модельных системах опухолей кроветворной системы [4, 5]. Задачи представленного исследования:

- определить влияние рапамицина на уровень белка *REDD1* с помощью вестерн-блоттинга;
- оценить активность транскрипции *REDD1* с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- определить влияние комбинации ГК и рапамицина на жизнеспособность клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток. Клеточные линии PMЖ люминального MCF-7 и тройного негативного подтипа MDA-MB-231 культивировали в стандартной среде в условиях, описанных ранее [11].

Обработка клеток. Клетки рассеивали в 6-луночные планшеты (по 500 тыс. клеток в лунку). После прикрепления клеток к подложке в среду вносили 100 нМ рапамицина (Rapa, LC Labs, США), инкубировали 4, 8 или 24 ч, затем добавляли 100 нМ дексаметазона (Dex, KRKA, Чехия) и инкубировали 24 ч при 37 °C при 5 % CO₂.

Вестерн-блоттинг. Лизис клеток проводили в буфере RIPA с добавлением ингибитора протеиназ (Roche, Швейцария). Уравновешивание концентраций белка осуществляли по методу Бредфорда [12]. Электрофорез проводили в 10 % полиакриламидном геле

в Tris-глициновом буфере с 0,1 % додецилсульфата натрия (SDS). Перенос на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли мокрым способом.

Для предотвращения неспецифической сорбции мембрану инкубировали с 5 % раствором сухого молока в Tris-буферном солевом растворе (Tris-buffered saline, TBS), затем гибридизовали с первичными антителами к белку REDD1 (ProteinTech Group, США) или к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH) (Abcam, Великобритания) 16 ч. Далее проводили гибридизацию со вторичными антителами (Abcam, Великобритания). Количественный анализ осуществляли при

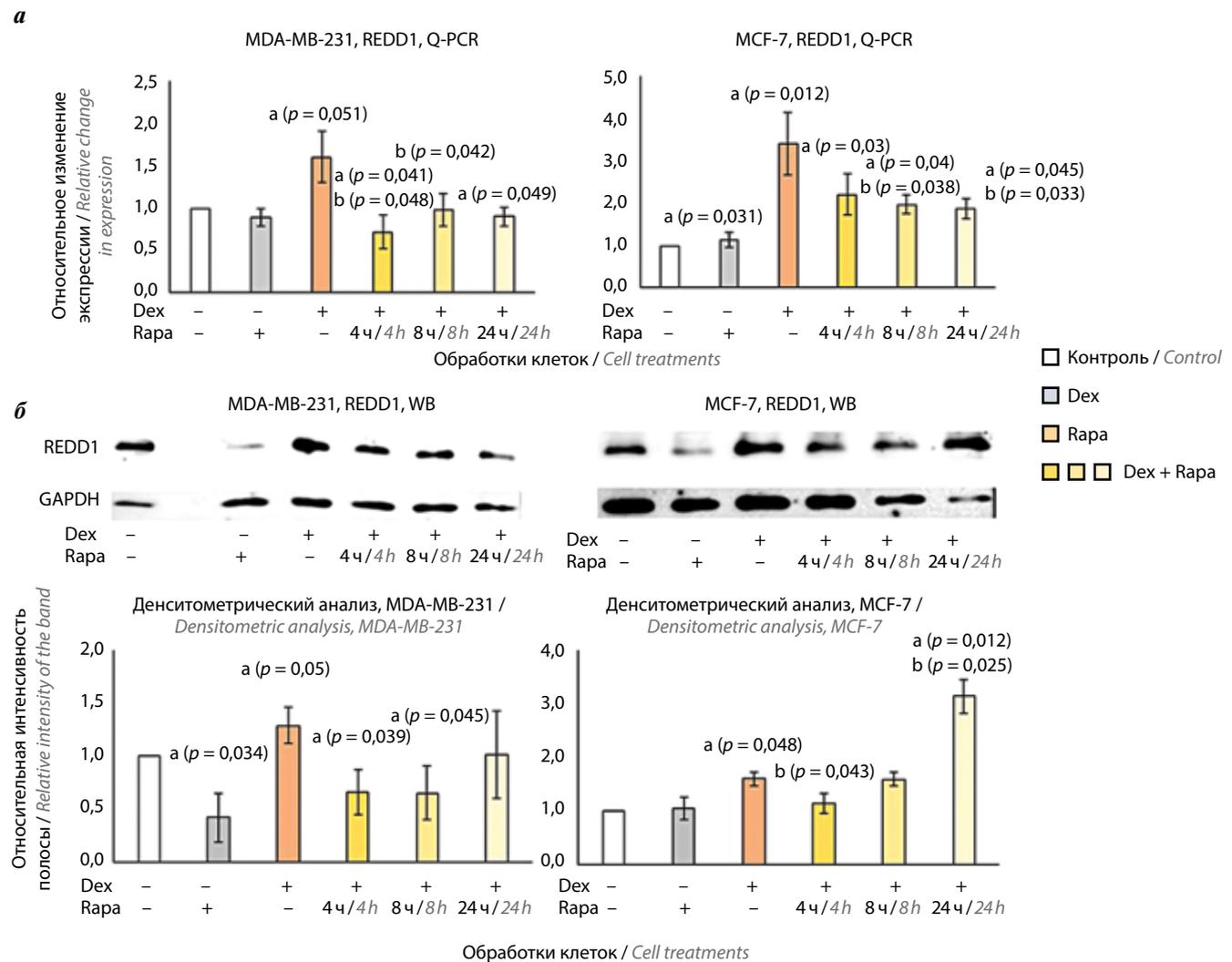


Рис. 1. Влияние рапамицина и дексаметазона на базальный уровень экспрессии REDD1 и предобработки рапамицином на индуцированный глюкокортикоидами уровень экспрессии REDD1 в клетках MCF-7 и MDA-MB-231: а – анализ изменения экспрессии гена REDD1 методом количественной полимеразной цепной реакции с нормализацией по количеству ПЦР-продукта гена RPLP; б – анализ изменения экспрессии белка REDD1 методом вестерн-блоттинга с нормализацией по количеству белка GAPDH. Клетки культивировали в течение 4, 8 или 24 ч в присутствии рапамицина (100 нМ) или растворителя и затем в течение 24 ч с дексаметазоном (100 нМ) или растворителем. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n = 3$). Dex – дексаметазон; Rapa – рапамицин; Q-PCR – количественная полимеразная цепная реакция; WB – вестерн-блоттинг; а – статистически значимое отличие от контроля; б – статистически значимое отличие от образцов, обработанных дексаметазоном

Fig. 1. Effect of rapamycin and dexamethasone on basal REDD1 expression and effect of rapamycin pretreatment on glucocorticoid-induced REDD1 expression in MCF-7 and MDA-MB-231 cells: a – changes in REDD1 gene expression evaluated using quantitative polymerase chain reaction with normalization to the RPLP gene; б – changes in REDD1 protein expression evaluated using western blotting with normalization to the GAPDH protein. Cells were cultured for 4, 8 or 24 hours with rapamycin (100 nM) or solvent, and then for 24 hours with dexamethasone (100 nM) or solvent. Data are presented as $M \pm SD$ ($n = 3$). Dex – dexamethasone; Rapa – rapamycin; Q-PCR – quantitative polymerase chain reaction; WB – western blotting; а – significant difference compared to controls; б – significant difference compared to samples treated with dexamethasone

помощи набора Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad, США) путем денситометрического сканирования и обработки изображений в программе ImageJ.

Количественная полимеразная цепная реакция. Суммарную РНК выделяли при помощи реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) по протоколу производителя. К 2 нг кДНК, полученной при помощи реакции обратной транскрипции («Синтол», Россия), добавляли по 500 нМ смеси праймеров (см. таблицу) и реакционную смесь для количественной ПЦР в присутствии EvaGreen («Синтол», Россия) и проводили амплификацию: 95 °С, 15 с; 72 °С, 30 с; 59,5 °С, 30 с (43 цикла). Относительное изменение экспрессии мРНК *REDD1* вычисляли методом $\Delta\Delta C_t$ [11]. Нормализацию проводили по количеству ПЦР-продукта гена *RPLP0*.

Последовательности праймеров, используемых в работе

Sequences of primers used in the study

| Ген Gene | Последовательность Sequence |
|--------------|--|
| <i>REDD1</i> | 5'-GCCTTTGGCCTCTCGATACA-3' For 5'-GCCTTTGGCCTCTCGATACA-3' Rev |
| <i>RPLP0</i> | 5'-CCTTCTCCTTTGGGCTGGT CATCCA-3' For 5'-CAGACACTGGCAACA TTGCGG ACAC-3' Rev |

Статистическая обработка данных. Все эксперименты выполнены в 3 биологических повторах. Средние значения и среднеквадратичные отклонения рас-

считывали с помощью пакета программ Microsoft Excel. Для определения статистической значимости выявленных различий использовали Student's t-test для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью количественной ПЦР было показано, что дексаметазон за 24 ч повышает *REDD1* в клеточных линиях MDA-MB-231 и MCF-7 РМЖ в среднем в 1,6 и 3,4 раза соответственно (рис. 1). Для линии MDA-MB-231 индукция *REDD1* была выражена слабее. Рапамицин при 24-часовой инкубации не оказывал влияния на базальный уровень мРНК *REDD1* в клетках РМЖ, однако подавлял экспрессию *REDD1* на уровне белка.

Был исследован цитотоксический эффект рапамицина как индивидуально, так и в сочетании с дексаметазоном (рис. 2). Число жизнеспособных клеток подсчитывали через 24 и 120 ч после обработки. Рапамицин слабо подавлял пролиферацию клеток обеих линий через 24 ч. Однако при обработке в течение 5 сут число жизнеспособных клеток линии MCF-7 составило 38 % от контроля (рис. 2,а), а линии MDA-MB-231 – 59 % (рис. 2,б). В случае обработки клеток MCF-7 рапамицином в сочетании с дексаметазоном в течение 24 ч наблюдали кооперацию цитотоксических эффектов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе были определены эффективные концентрации и временные интервалы обработки клеток РМЖ рапамицином для ингибирования базальной и дексаметазон-индуцированной экспрессии *REDD1*

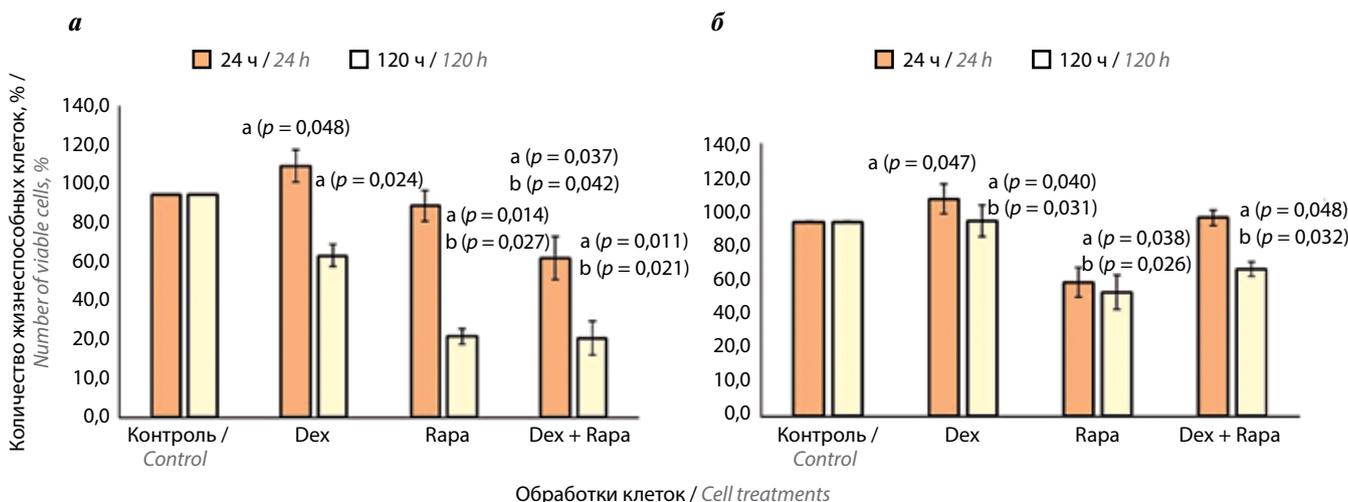


Рис. 2. Антипролиферативный эффект рапамицина при самостоятельном использовании и в комбинации с дексаметазоном на клетки MCF-7 (а) и MDA-MB-231 (б). Клетки культивировали в присутствии растворителя, дексаметазона в концентрации 100 нМ и рапамицина в концентрации 1 мкМ, а также при их комбинации. Подсчет клеток проводили через 24 и 120 ч. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n = 3$). Dex – дексаметазон; Rapa – рапамицин; а – статистически значимое отличие от контроля; б – статистически значимое отличие от образцов, обработанных дексаметазоном

Fig. 2. Antiproliferative effect of Rapamycin individually and in combination with dexamethasone on MCF-7 and MDA-MB-231 (B). Cells were cultured with the solvent, dexamethasone (100 nM) and rapamycin (1 μ M) and their combination. Cells were counted 24 and 120 h after the treatment. Data are presented as $M \pm SD$ ($n = 3$). Dex – dexamethasone; Rapa – rapamycin; а – a statistically significant difference from the control; б – a statistically significant difference from the samples treated with dexamethasone

на уровне мРНК и белка. Было продемонстрировано, что для предобработки рапамицином клеток РМЖ наиболее оптимален 4-часовой интервал, что согласуется с полученными ранее нами и другими исследователями данными на клетках злокачественных новообразований кроветворной системы и иммортализованных кератиноцитах [4–6]. В отличие от данных, полученных на трансформированных лимфоцитах, Rara и Dex оказывают умеренный антипролиферативный эффект на клетки РМЖ [4, 5]. Связи экспрессии *REDD1* с пролиферативной активностью клеток не выявлено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным результатам рапамицин может подавлять базальную и ГК-индуцированную экспрессию *REDD1* в клетках РМЖ люминального и тройного негативного подтипов. Способность данного препарата снижать жизнеспособность клеток РМЖ была гораздо менее выражена, чем клеток лейкозов и лимфом. Однако наблюдаемое подавление пролиферации клеток РМЖ после их инкубации с рапамицином свидетельствует о перспективности исследования применения этого препарата и других ингибиторов *REDD1* в качестве адьювантных препаратов в химиотерапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Volden P.A., Conzen S.D. The influence of glucocorticoid signaling on tumor progression. *Brain Behav Immun* 2013;30:S26–31. DOI: 10.1016/j.bbi.2012.10.022.
2. Belova L., Delgado B., Kocherginsky M. et al. Glucocorticoid receptor expression in breast cancer associates with older patient age. *Breast Cancer Res Treat* 2009;116(3):441–7. DOI: 10.1007/s10549-008-0136-9.
3. Baida G., Bhalla P., Kirsanov K. et al. *REDD1* functions at the crossroads between the therapeutic and adverse effects of topical glucocorticoids. *EMBO Mol Med* 2015;7(1):42–58. DOI: 10.15252/emmm.201404601.
4. Lesovaya E., Agarwal S., Readhead B. et al. Rapamycin modulates glucocorticoid receptor function, blocks atrophogene *REDD1*, and protects skin from steroid atrophy. *J Invest Dermatol* 2018;138(9):1935–44. DOI: 10.1016/j.jid.2018.02.045.
5. Lesovaya E.A., Savinkova A.V., Morozova O.V. et al. A Novel approach to safer glucocorticoid receptor-targeted anti-lymphoma therapy via *REDD1* (regulated in development and DNA damage 1) inhibition. *Mol Cancer Ther* 2020;19(9):1898–908. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-19-1111.
6. Agarwal S., Mirzoeva S., Readhead B. et al. PI3K inhibitors protect against glucocorticoid-induced skin atrophy. *EBioMedicine* 2019;41:526–37. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.01.055.
7. Lan Y.C., Chang C.L., Sung M.T. et al. Zoledronic acid-induced cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress triggered *REDD1*-mTOR pathway in breast cancer cells. *Anticancer Res* 2013;33(9):3807–14.
8. Yun S.M., Woo S.H., Oh S.T. et al. Melatonin enhances arsenic trioxide-induced cell death via sustained upregulation of *REDD1* expression in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2016;422:64–73. DOI: 10.1016/j.mce.2015.11.016.
9. Pinto J.A., Rolfo C., Raez L.E. et al. In silico evaluation of DNA damage inducible transcript 4 gene (*DDIT4*) as prognostic biomarker in several malignancies. *Sci Rep* 2017;7:1526. DOI: 10.1038/s41598-017-01207-3.
10. Tirado-Hurtado I., Fajardo W., Pinto J.A. DNA Damage inducible transcript 4 gene: the switch of the metabolism as potential target in cancer. *Front Oncol* 2018;8:106. DOI: 10.3389/fonc.2018.00106.
11. Жидкова Е.М., Кузин К.А., Тилова Л.Р. и др. Сравнительный анализ биологических эффектов селективного агониста глюкокортикоидного рецептора *CpdA* на клеточные линии рака молочной железы различных молекулярных подтипов. *Сибирский онкологический журнал* 2017;16(6):41–6. [Zhidkova E.M., Kuzin K.A., Tilova L.R. et al. Comparative analysis of biological effects of selective activator of the glucocorticoid receptor *CpdA* on different subtypes of breast cancer cell lines. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal = Siberian journal of oncology* 2017;16(6):41–6. (In Russ.)]. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-6-41-46.
12. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

Вклад авторов

Д.Д. Григорьева: проведение экспериментальной работы, статистическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала, написание первоначального варианта статьи;
 Е.М. Жидкова: проведение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов;
 Е.С. Лылова: проведение экспериментальной работы, подготовка иллюстративного материала, написание первоначального варианта статьи;
 Д.В. Демина: проведение экспериментальной работы, статистическая обработка данных;
 К.И. Кирсанов: сбор данных, разработка концепции исследования, редактирование статьи;
 К.А. Белицкий: разработка концепции исследования, редактирование статьи;
 М.Г. Якубовская: анализ литературных данных, разработка концепции исследования, редактирование статьи;
 Е.А. Лесовая: разработка дизайна и протоколов исследования, редактирование статьи.

Authors' contribution

D.D. Grigorieva: experimental work, statistical data processing, preparation of illustrative material, writing the initial version of the article;
 E.M. Zhidkova: experimental work, analysis and interpretation of the results;
 E.S. Lylova: experimental work, preparation of illustrative material, writing the initial version of the article;

D.V. Demina: experimental work, statistical data processing;
K.I. Kirsanov: data collection, research concept development, article editing;
K.A. Belitsky: development of the research concept, article editing;
M.G. Yakubovskaya: analysis of literary data, development of the research concept, article editing;
E.A. Lesovaya: development of design and research protocols, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.Д. Григорьева / D.D. Grigorieva: <https://orcid.org/0000-0003-2675-089X>
Е.М. Жидкова / E.M. Zhidkova: <https://orcid.org/0000-0003-3318-9391>
Е.С. Лылова / E.S. Lylova: <https://orcid.org/0000-0001-6388-1624>
К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>.
М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>.
Е.А. Лесовая / E.A. Lesovaya: <https://orcid.org/0000-0002-1967-9637>

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-75-20124).
Financing. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 17-75-20124).

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-48-56



Производные 3-гидроксихиназолина, аналоги эрастина, индуцируют ферроптоз в клетках карциномы молочной железы

Л.М. Борисова, В.Н. Осипов, И.С. Голубева, М.П. Киселева, Д.А. Хоченков, А.А. Вартамян

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

Контакты: Лариса Михайловна Борисова larib@inbox.ru

Введение. Программы раннего выявления опухоли заметно повысили выживаемость больных раком молочной железы, однако итоги лекарственной терапии данной патологии не всегда эффективны. Обнаруженная недавно железозависимая гибель клетки – ферроптоз – позволяет надеяться на продление ремиссии заболевания.

Цель исследования – изучение индукции ферроптоза в клетках рака молочной железы MCF7 производными 3-гидроксихиназолина, синтезированными в Научно-исследовательском институте экспериментальной диагностики и терапии опухолей Национального медицинского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, и оценка его противоопухолевой активности на перевиваемой карциноме молочной железы Ca-755.

Материалы и методы. В экспериментах *in vitro* использовали 2D-культивирование клеток, фазово-контрастную и флуоресцентную микроскопию. Исследования *in vivo* проведены на модели экспериментального роста карциномы молочной железы у самок гибридов иммунокомпетентных мышей F1 (C57Bl/6 × DBA/2).

Результаты. В работе были исследованы 5 производных 3-гидроксихиназолина – аналогов эрастина. Чистота всех соединений составила более 95 %. Гибель опухолевых клеток по типу ферроптоза идентифицировали по уровню перекисного окисления липидов при IC_{50} : 1/3 и 1/5. Уровень перекисного окисления липидов в клетках MCF7, индуцируемый соединением 3, был сравним с активностью эрастина как при 1/3, так и при 1/5 IC_{50} . Активность остальных 4 производных 3-гидроксихиназолина составляла 50–70 % активности эрастина. В экспериментах *in vivo* на карциноме молочной железы Ca-755 при использовании соединения 3 в дозе 30 мг/кг его противоопухолевый эффект был выше, чем у эрастина, применяемого в той же дозе.

Заключение. Полученные предварительные результаты позволяют предположить, что соединение 3 может рассматриваться в качестве перспективного противоопухолевого средства для лечения рака молочной железы.

Ключевые слова: производные 3-гидроксихиназолина, ферроптоз, рак молочной железы, противоопухолевая активность

Для цитирования: Борисова Л.М., Осипов В.Н., Голубева И.С. и др. Производные 3-гидроксихиназолина, аналоги эрастина, индуцируют ферроптоз в клетках карциномы молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(1): 48–56. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-48-56.

3-Hydroxyquinazoline derivatives, analogues of erastin, induced ferroptosis in breast cancer cells

L.M. Borisova, V.N. Osipov, I.S. Golubeva, M.P. Kiseleva, A.A. Vartanyan

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

Contacts: Larisa Mikhailovna Borisova larib@inbox.ru

Introduction. Early malignant tumor detection programs have significantly increased the survival rate of breast cancer patients but the results of drug therapy for this pathology are not always highly effective. Recently discovered iron-dependent cell death, ferroptosis, makes it a promising therapeutic target to reduce the recurrence rates.

Objective – to study the induction of ferroptosis in breast cancer cells MCF-7 by quinazoline derivatives synthesized at the Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia and to evaluate its antitumor activity on transplanted breast carcinoma Ca-755.

Materials and methods. Derivatives of 3-hydroxyquinazoline were obtained by chemical synthesis and have a purity of at least 95 %. In this study 2D cultivation of MCF7 cells, phase-contrast and fluorescence microscopy, and a model

of experimental growth of breast carcinoma Ca-755 in female hybrids of immunocompetent mice F1 (C57Bl/6 × DBA/2) were used.

Results. Five derivatives of 3-hydroxyquinazoline, analogues of erastine, were studied in this work. The ferroptotic cell death was identified by the level of lipid peroxidation at the concentrations of 1/3 and 1/5 IC_{50} . The level of lipid peroxidation induced by compound 3 was comparable with the activity of erastin in MCF7 cells at both 1/3 and 1/5 of IC_{50} , the activity of the other four quinazoline derivatives was 50–70 % of the activity of erastin. In *in vivo* experiments at a dose of 30 mg/kg the antitumor efficacy of the compound 3 was higher than that of erastin at the same dose.

Conclusion. The data obtained suggest that quinazoline derivative 3 might be considered as a promising antitumor agent to treat breast cancer.

Key words: 3-hydroxyquinazoline derivatives, ferroptosis, breast cancer, antitumor activity

For citation: Borisova L.M., Osipov V.N., Golubeva I.S. et al. 3-Hydroxyquinazoline derivatives, analogues of erastin, induced ferroptosis in breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(1): 48–56. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-48-56.

ВВЕДЕНИЕ

Заболеваемость раком молочной железы (РМЖ) растет не только в России, но и во всем мире. Программы раннего выявления этой опухоли в сочетании с различными методами лечения заметно повысили продолжительность жизни больных с данной патологией [1]. Несмотря на существенное улучшение результатов химиотерапии в последние годы, в большинстве случаев лечение РМЖ сопровождается развитием лекарственной резистентности: опухолевые клетки приобретают устойчивость к апоптозу [2]. Достигнуть реактивации апоптоза в резистентных к терапии опухолевых клетках практически нереально. По всей видимости, нужно искать возможности вовлечения других типов программируемой гибели клетки в их элиминирование. В последние годы появляется все больше сообщений, в которых указывается, что обнаруженный недавно новый тип регулируемой гибели клетки — ферроптоз [3] — способен вызывать гибель высокозлокачественных клеток, уцелевших после химиотерапии [4].

Ферроптоз сегодня рассматривается как железо-зависимая регулируемая гибель клетки, при которой в ней накапливаются продукты перекисного окисления фосфолипидов клеточных мембран [5]. Этот процесс происходит как в результате запуска реакции Фентона, вызывающего в присутствии железа окисление фосфолипидов, так и вследствие отказа механизмов антиоксидантной защиты клетки. Система антиоксидантной защиты включает глутатионпероксидазу 4 (GPX4), которая восстанавливает потенциально опасные гидроперекиси липидов в нетоксичные спирты, и глутатион (субстрат GPX4) — основной внутриклеточный антиоксидант [6, 7].

Недавно было показано, что клетки РМЖ репрограммируют метаболизм железа, активируя экспрессию рецептора трансферрина (CD71) и подавляя экспрессию ферритина, депонирующего железо в клетки, а также ферропортина-1 (FPN) — транспортного белка, выводящего железо из клетки [8, 9]. Ферритин на сегодняшний день рассматривается как маркер злокачественного поражения молочной железы [10]. Согласно последним данным, при повреждении клетки

по типу ферроптоза из нее высвобождаются так называемые молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями (damage-associated molecular patterns, DAMP), которые во внеклеточной среде выступают сильными провоспалительными факторами [11]. К их числу принадлежат ДНК, аденозинтрифосфат (АТФ), РНК, белки теплового шока, жирные кислоты, лейкотриены, простагландины, активирующие адаптивную иммунную систему и привлекающие к опухоли и метастазам иммунокомпетентные клетки.

Еще одним аргументом важности поиска соединений, индуцирующих ферроптоз в клетках РМЖ, стали опубликованные недавно данные о способности индукторов ферроптоза вызывать гибель клеток тройного негативного РМЖ [12]. Из-за отсутствия эффективной эндокринной и таргетной анти-HER2 (human epidermal growth factor receptor 2, рецептор эпидермального фактора роста, тип 2) терапии для пациентов с тройным негативным РМЖ характерны высокая частота развития рецидивов и плохой прогноз.

Ранее нами было показано, что производные 3-гидроксихиназолина обладают высокой цитотоксической активностью [13]: соединение OVN-002 — аналог эрастина — индуцировало ферроптоз в метастатических клетках меланомы [14], а серия производных 3-гидроксихиназолина — ферроптоз в клетках рака толстой кишки.

Цель исследования — изучение способности новых производных 3-гидроксихиназолина — аналогов эрастина — индуцировать ферроптоз в клетках РМЖ MCF7 и оценка их противоопухолевой активности на карциноме молочной железы Ca-755 мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

C11-BODIPY получен от Thermo Fisher Scientific (США), эрастин был приобретен у Sigma-Aldrich (США).

Синтез производных хиназолина

Производные 3-гидроксихиназолина были синтезированы в Научно-исследовательском институте

экспериментальной диагностики и терапии опухолей Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России.

Культивирование клеток

В работе были использованы клетки РМЖ MCF7 (ATCCR HTB-22™). Клетки культивировали в полной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, США), содержащей 10 % телячью эмбриональную сыворотку (HyClone, США), 2,2 ммоль/мл глутамина («ПанЭко», Россия) и 0,01 мг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия). В экспериментах использовали клетки 70–75 % конфлюэнтности.

Исследование влияния производных *in vitro* 3-гидроксихиназолина на индукцию ферроптоза

Клетки РМЖ MCF7 растили в полной среде DMEM в 24-луночном планшете. Через 24 ч роста клеток в CO₂-инкубаторе при 37 °С добавляли 1/3 и 1/5 IC₅₀ эрастина или 1/3 и 1/5 IC₅₀ исследуемых соединений и инкубировали в течение 5 ч. В качестве контроля использовали клетки, растущие в полной среде DMEM без индуктора ферроптоза, и клетки, инкубированные с эквимольным количеством ДМСО (диметилсульфоксида). Затем используемую среду заменяли свежей средой, не содержащей сыворотки, и добавляли 5 мкМ C11-BODIPY – флуорофор, который, переходя из тиоэфира в сульфоксид, меняет флуоресцентные характеристики (убывает поглощение красного цвета и нарастает поглощение зеленого). После инкубирования с флуоресцентной меткой в течение 30 мин клетки 3 раза промывали фосфатным буфером. Интенсивность флуоресценции определяли с помощью флуоресцентного микроскопа IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США) при 510–550 нм.

Исследования *in vivo*

Животные. Исследования *in vivo* выполняли на самках мышей – гибридов F1 (C57Bl/6 × DBA/2) массой 20–22 г. Животных содержали в виварии при естественном освещении, на стандартном рационе питания и при свободном доступе к воде [15].

Опухолевая модель. Первичную оценку противоопухолевой активности исследуемого соединения (индуктора ферроптоза) проводили на перевиваемой карциноме молочной железы Ca-755 мышей по ранее описанной методике с незначительными модификациями [16–17]. Штамм поддерживали подкожными перевивками каждые 12 дней на самках мышей линии C57Bl/6.

Схема опыта. Группы животных формировали с учетом получения статистически достоверных результатов. Контрольная группа состояла из 10 мышей, каждая из 4 опытных групп – из 6. Мышам 1-й и 2-й опытных групп вводили соединение 3 в дозах 30 мг/кг

и 50 мг/кг соответственно, мышам 3-й и 4-й опытных групп – эрастин в дозах 30 мг/кг и 50 мг/кг соответственно.

Схема введения. Действие исследуемого соединения 3 сравнивали с эффектом эрастина. Эрастин и соединение 3 вводили мышам внутрибрюшинно ежедневно в течение 5 дней с интервалом в 24 ч. Начало времени введения – через 48 ч после трансплантации карциномы молочной железы Ca-755.

Критерии оценки противоопухолевого эффекта

Противоопухолевый эффект соединений оценивали по торможению роста опухоли (ТРО) и увеличению продолжительности жизни (УПЖ) леченых мышей по сравнению с контрольными животными [17]. Наблюдение за мышами проводили до их гибели. Минимальные критерии активности – ТРО ≥ 50 %, УПЖ ≥ 25 %. Эффективными считали дозы, вызывающие ТРО ≥ 70 % продолжительностью не менее 7 дней после окончания лечения [17].

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием компьютерной программы Statistica 6.0. Различия между сравниваемыми группами считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Синтез производных 3-гидроксихиназолина

Производные 3-гидроксихиназолина (замещенные 3-гидрокси-2-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)-хиназолин-4(3H)-оны) (рис. 1), в которых к атому кислорода в 3-м положении присоединены различные бензиловые эфиры уксусной кислоты, были синтезированы по ранее описанной методике [13, 14]. Полученные соединения охарактеризованы данными спектров спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ¹H и масс-спектрометрии. Чистота всех соединений по результатам высокоэффективной жидкостной хроматографии составила более 95 %. Характеристика синтезированных соединений 1–5 представлена в табл. 1. и на рис. 1. Подробную информацию об этих соединениях можно найти в дополнительном материале к статье в приложении к журналу «Успехи молекулярной онкологии»: <https://umo.abvpress.ru/jour/issue/archive>.

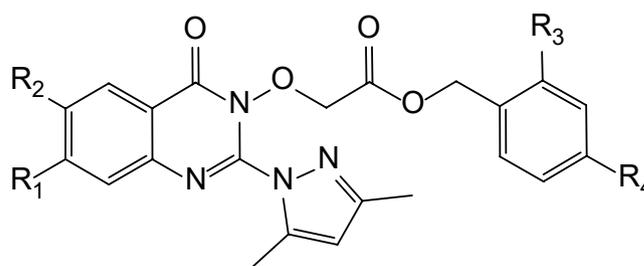


Рис. 1. Общая структура производных 3-гидроксихиназолина
Fig. 1. General structure of 3-hydroxyquinazolin derivatives

Таблица 1. Характеристика синтезированных соединений 1–5

Table 1. Characteristics of synthesized compounds 1–5

| Соединение Compound | Заместители | | | | Молекулярная масса Molecular weight | Масса молекулярного иона в масс-спектре (вид иона) The weight of a molecular ion in the mass spectrum (type of ion) | Спектр ЯМР ¹ H NMR ¹ H spectrum |
|------------------------|-------------|-----|----|-----|--|--|--|
| | R1 | R2 | R3 | R4 | | | |
| 1 | OMe | OMe | H | H | 464,48 | 465,2 (M + H) ⁺ | 7,49 (с, 1H), 7,30–7,44 (м, 5H), 7,20 (с, 1H), 6,13 (с, 1H), 5,14 (д, J = 16,9 Гц, 4H), 3,92 (д, J = 1,2 Гц, 6H), 2,39 (с, 3H), 2,09 (с, 3H) |
| 2 | OMe | OMe | F | H | 482,47 | 483,2 (M + H) ⁺ | 7,37–7,51 (м, 3H), 7,16–7,30 (м, 3H), 6,11 (с, 1H), 5,22 (с, 2H), 5,11 (с, 2H), 3,88–3,95 (м, 7H), 2,39 (с, 3H), 2,09 (с, 3H) |
| 3 | H | Br | H | H | 483,33 | 483,2 (M + H) ⁺ | 8,26 (д, J = 2,3 Гц, 1H), 8,04 (дд, J = 8,7; 2,4 Гц, 1H), 7,65 (д, J = 8,7 Гц, 1H), 7,34–7,49 (м, 4H), 6,16 (с, 1H), 5,16 (д, J = 6,9 Гц, 4H), 2,41 (с, 3H), 2,09 (с, 3H) |
| 4 | H | H | H | OMe | 434,46 | 435,2 (M + H) ⁺ | 8,14–8,23 (м, 1H), 7,90 (ддд, J = 8,5; 7,2; 1,6, 1H), 7,71 (дт, J = 8,1; 0,9 Гц, 1H), 7,62 (ддд, J = 8,2; 7,2; 1,2 Гц, 1H), 7,25–7,37 (м, 2H), 6,87–6,98 (м, 2H), 6,15 (д, J = 1,1 Гц, 1H), 5,10 (д, J = 1,4 Гц, 4H), 3,75 (с, 3H), 2,41 (д, J = 0,8 Гц, 3H), 2,10 (с, 3H) |
| 5 | H | Br | H | Cl | 517,0 | 517,2 (M + H) ⁺ , 539,1 (M + Na) ⁺ | 8,26 (д, J = 2,3 Гц, 1H), 8,04 (дд, J = 8,7, 2,4 Гц, 1H), 7,65 (д, J = 8,7 Гц, 1H), 7,34–7,51 (м, 4H), 6,16 (с, 1H), 5,16 (д, J = 7,2 Гц, 4H), 2,38–2,44 (с, 3H), 2,09 (с, 3H) |

Примечание. ЯМР – ядерный магнитный резонанс.
Note. NMR – nuclear magnetic resonance.

Исследование влияния соединений 1–5, производных 3-гидрохиназолина, на индукцию ферроптоза *in vitro*

Цитотоксичность соединений на клетках MCF7 изучали с помощью МТТ-теста. Антипролиферативную активность препаратов оценивали по величине IC₅₀. При инкубировании клеток MCF7 с соединениями в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкМ в течение 24 ч наблюдалось ингибирование роста клеток на 30–80 %. Выбранное нами время инкубирования клеток с аналогами эрастина в течение 24 ч для определения IC₅₀ согласуется с литературными данными [6]. Значения IC₅₀ соединений представлены в табл. 2. Для верификации полученных результатов мы определяли также IC₅₀ для доксорубина (DOX). Наибольшей цитотоксической активностью обладало соединение 3.

Ранее нами было показано, что инкубирование клеток меланомы и рака толстой кишки с производными гидроксихиназолина – аналогами эрастина – в течение 24 ч при 37 °С не вызывает фрагментации ядра, что является итогом апоптоза, генетически программируемой клеточной гибели I типа. Также на гибель клеток, индуцированную производными гидроксихиназолина, не оказывало влияния присутствие

Таблица 2. Результаты определения цитотоксической активности производных 3-гидроксихиназолина, эрастина и доксорубина на клетках рака молочной железы MCF7

Table 2. Results of determination of cytotoxic activity of 3-hydroxyquinazoline derivatives, erastin and doxorubicin on breast cancer cells MCF7

| Исследуемые образцы Tested samples | IC ₅₀ , мкМ IC ₅₀ , μM |
|---------------------------------------|---|
| Эрастин | 40 |
| Соединение 1 | 20 |
| Соединение 2 | 24 |
| Соединение 3 | 19 |
| Соединение 4 | 48 |
| Соединение 5 | 22 |
| Доксорубин | 2,1 |

50 мкМ панкаспазного ингибитора апоптоза zVAD-fmk или 20 мкМ ингибитора аутофагии хлорокина. Для исключения индукции других типов гибели клетки в MCF7-клетках соединениями 1–5 мы исследовали индукцию ими ферроптоза при 1/3 и 1/5 IC₅₀. В качестве контроля использовали эрастин также при

1/3 и 1/5 IC_{50} . О гибели клеток MCF7 по типу ферроптоза судили по интенсивности перекисного окисления липидов, которое фиксировали после инкубирования клеток с флуоресцентной меткой C11-BODIPY (581/591 нм). В контрольных экспериментах без добавления соединений уровень перекисного окисления липидов был незначительным (рис. 2, а).

Уровень перекисного окисления липидов, индуцированного 1/3 IC_{50} соединения 3, был сравним с уровнем перекисного окисления липидов, индуцированного 1/3 IC_{50} эрастина (рис. 2, б, в). Уровень перекисного окисления липидов, индуцированного остальными 4 соединениями при 1/3 IC_{50} , составил 50–70 % уровня перекисного окисления липидов, индуцированного 1/3 IC_{50} эрастина (рис. 2, г). В клетках, инкубированных с эквимольным количеством ДМСО, интенсивность флуоресценции была невысокой и равнялась значениям интенсивности флуоресценции

контрольных клеток. Уровень перекисного окисления липидов, индуцированного эрастином или соединениями 1–5 при 1/5 IC_{50} , менялся незначительно по сравнению с уровнем этого показателя при 1/3 IC_{50} . Интенсивность флуоресценции C11-BODIPY при 1/5 IC_{50} была также наибольшей для соединения 3 (см. рис. 2г). Чувствительность клеток РМЖ MCF7 к действию соединения 3 позволила инициировать исследование его противоопухолевой активности на модели перевиваемой карциномы молочной железы мышей.

Исследование влияния соединения 3 на индукцию ферроптоза *in vivo*

Ранее мы подобрали оптимальные условия растворения эрастина: ДМСО в сочетании с 0,05 М фосфатным буфером (рН 4,5) или 25 % раствором коллидона. Соединение 3 плохо растворялось в этой системе

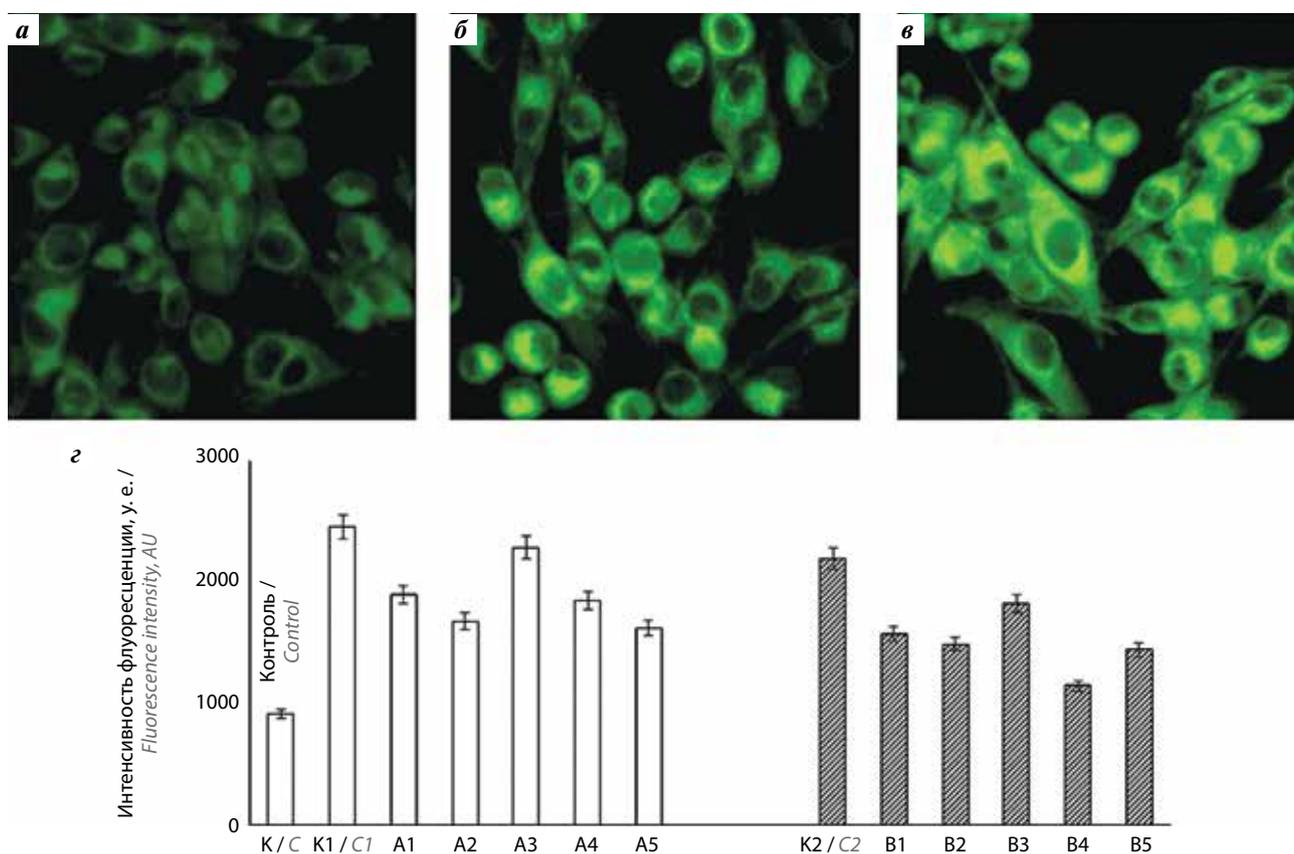


Рис. 2. Гибель клеток MCF7 по типу ферроптоза, индуцированная соединениями 1–5. Флуоресценция C11-BODIPY в клетках MCF7: а – контроль с 5 %-ным диметилсульфоксидом; б – инкубация клеток MCF7 с 1/3 IC_{50} соединения 3; в – инкубация клеток MCF7 с 1/5 IC_{50} эрастина; г – уровень перекисного окисления липидов, индуцированного соединениями 1–5 при 1/3 IC_{50} (A1–A5) и 1/5 IC_{50} (B1–B5). $\times 200$. $p < 0,05$ для всех опытных групп по сравнению с контролем. К – контроль (без добавления соединений или эрастина); K1 и K2 – перекисное окисление липидов, индуцированное 1/3 IC_{50} и 1/5 IC_{50} эрастина; A1 – 1/3 IC_{50} соединения 1; A2 – 1/3 IC_{50} соединения 2; A3 – 1/3 IC_{50} соединения 3; A4 – 1/3 IC_{50} соединения 4; A5 – 1/3 IC_{50} соединения 5; B1 – 1/5 IC_{50} соединения 1; B2 – 1/5 IC_{50} соединения 2; B3 – 1/5 IC_{50} соединения 3; B4 – 1/5 IC_{50} соединения 4; B5 – 1/5 IC_{50} соединения 5

Fig. 2. MCF7 cell death by ferroptosis type induced by compounds 1–5. Fluorescence of C11-BODIPY in MCF7 cells: а – control with 5 % dimethyl sulfoxide; б – growth of MCF7 cells with 1/3 IC_{50} of the 3 compound; в – growth of cells with 1/5 IC_{50} of erastin; г – the level of lipid peroxidation induced by compounds 1–5: 1/3 IC_{50} (A1–A5) and 1/5 IC_{50} (B1–B5). $\times 200$. $p < 0.05$ for all groups compared to control. C – control (without adding compounds or erastin); C1 and C2 – lipid peroxidation induced by 1/3 IC_{50} and 1/5 IC_{50} of erastin; A1 – 1/3 IC_{50} connection 1; A2 – 1/3 IC_{50} connection 2; A3 – 1/3 IC_{50} connection 3; A4 – 1/3 IC_{50} connection 4; A5 – 1/3 IC_{50} connection 5; B1 – 1/5 IC_{50} connection 1; B2 – 1/5 IC_{50} connection 2; B3 – 1/5 IC_{50} connection 3; B4 – 1/5 IC_{50} connection 4; B5 – 1/5 IC_{50} connection 5

Таблица 3. Сравнение противоопухолевой активности соединения 3 и эрастина (при его внутрибрюшинном введении) на Ca-755 у мышей

Table 3. Comparison of antitumor activity of 3 compound and erastin (with its intraperitoneal administration) on Ca-755 mice

| Группа Group | Соединение, доза (мг/кг)/интервал (час) × число введений Compound, dose (mg/kg)/ interval (hour) × number of injections | Торможение роста опухоли, % Inhibition of tumor growth, % | | | | | | | Гибель от токсичности, n/n Death from toxicity, n/n |
|-----------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | | 1-й день после лечения 1 st day after treatment | 4-й день после лечения 4 th day after treatment | 8-й день после лечения 8 th day after treatment | 12-й день после лечения 12 th day after treatment | 16-й день после лечения 16 th day after treatment | 20-й день после лечения 20 th day after treatment | 24-й день после лечения 24 th day after treatment | |
| 1 | Соединение 3, 30/24 × 5 3 compound, 30/24 × 5 | 74*^ | 87*^ | 94*^ | 85*^ | 96*^ | 63*^ | 60*^ | 0/6 |
| 2 | Соединение 3, 50/24 × 5 3 compound, 50/24 × 5 | 71*^ | 86*^ | 85*^ | 66*^ | 96*^ | 93*^ | 86*^ | 0/6 |
| 3 | Эрастин, 30/24 × 5 Erastin, 30/24 × 5 | 62*^ | 60*^ | 81*^ | 71*^ | 74*^ | 78*^ | 76*^ | 0/6 |
| 4 | Эрастин, 50/24 × 5 Erastin, 50/24 × 5 | 81*^ | 92*^ | 92*^ | 92*^ | 87*^ | 79*^ | 63*^ | 0/6 |

* $p < 0,05$; различия достоверны по отношению к контролю. ^ $p > 0,05$; различия недостоверны между 1-й и 3-й, 2-й и 4-й группами.

* $p < 0,05$; differences are significant in relation to control. ^ $p > 0,05$; differences are insignificant between groups 1 and 3, 2 and 4.

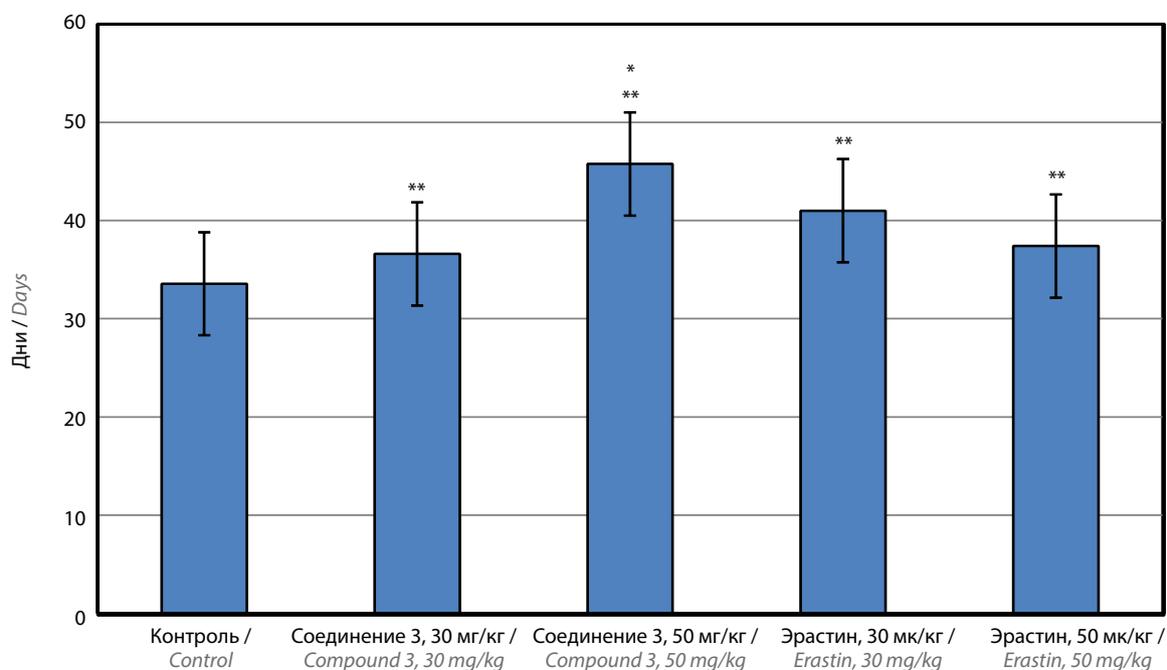


Рис. 3. Сравнение продолжительности жизни мышей с перевитой карциномой молочной железы Ca-755 в группе лечения соединением 3, эрастином и в группе контроля. * $p < 0,05$ по отношению к контролю. ** $p > 0,05$ между группами

Fig. 3. Comparison of the life expectancy of mice with transplanted breast carcinoma Ca-755 in the treatment group with compound 3, erastin and in the control group. * $p < 0,05$ versus control. ** $p > 0,05$ between groups

растворителей. Нам удалось повысить его растворимость следующим образом: субстанцию растворяли в ДМСО, далее добавляли кремофор, а затем воду для инъекций (до достижения необходимой конечной концентрации соединения 2,5 мг/мл и содержания ДМСО не более 10 %). В процессе растворения раствор подогревали на водяной бане до 60 °С для лучшей растворимости соединения. По этой же схеме растворяли и эрастин.

В дозе 30 мг/кг как соединение 3, так и эрастин оказали длительный высокий противоопухолевый эффект при карциноме молочной железы Ca-755 (табл. 3), но без значительного УПЖ животных, которая составила 9 и 22 % соответственно (рис. 3).

При лечении опухоли соединением 3 максимальный противоопухолевый эффект (ТРО 87–96 %; $p < 0,05$ по отношению к контролю) отмечался до 16-го дня наблюдения. Противоопухолевый эффект эрастина

при использовании той же дозы был недостоверно ниже в эти же сроки наблюдения: ТРО 64–74 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю; $p > 0,05$ между группами). Далее до 24-го дня после окончания лечения эффект эрастина был недостоверно выше эффекта соединения 3: ТРО 76–78 и 60–63 % соответственно ($p < 0,05$ по отношению к контролю; $p > 0,05$ между 1-й и 3-й опытными группами) (см. табл. 3).

При увеличении дозы соединения 3 до 50 мг/кг высокий противоопухолевый эффект на уровне ТРО от 71–85 до 86–96 % отмечали в более продолжительный период: до 24-го дня после окончания лечения ($p > 0,05$ между 1-й и 2-й опытными группами).

В дозе 50 мг/кг противоопухолевая активность соединения 3 была недостоверно ниже активности эрастина в той же дозе: ТРО 71–85 и 81–92 % соответственно, с 1-го по 8-й день после окончания лечения ($p > 0,05$ между 2-й и 4-й опытными группами). Однако далее, с 16-го до 24-го дня наблюдения, активность соединения 3 превзошла активность эрастина: ТРО 86–96 и 63–87 % соответственно ($p < 0,05$ между 2-й и 4-й опытными группами).

Применение соединения 3 в дозе 50 мг/кг увеличивало продолжительность жизни животных на 36 % (см. рис. 3), что выше минимального критерия активности (УПЖ ≥ 25 %), тогда как эрастин не показал эффективности по этому критерию (УПЖ – 11 %) ($p < 0,05$ по отношению к контролю; $p > 0,05$ между всеми опытными группами).

ОБСУЖДЕНИЕ

Рак молочной железы встречается у женщин любого возраста после достижения половой зрелости. Программы раннего выявления этой опухоли заметно повысили выживаемость больных, однако итоги лекарственной терапии данной патологии не всегда эффективны. В большинстве случаев лечение РМЖ сопровождается развитием лекарственной резистентности, что переводит болезнь в терминальную, более агрессивную фазу роста [18]. Утрата программы клеточной гибели дает возможность опухолевой клетке сохранять жизнеспособность в присутствии высоких концентраций противоопухолевых лекарств. По всей видимости, нужно искать новые методы лечения, направленные на запуск альтернативных типов клеточной смерти.

Интерес к исследованиям, посвященным изучению возможности использования ферроптоза в терапии рака, в последние годы заметно возрос. Кроме эрастина, блокирующего транспорт цистина в клетку, синтезированы и охарактеризованы и другие индукторы ферроптоза, вызывающие истощение GPX4 в опухолевых клетках, например RSL3 (RAS-selective lethal 3) [19]. И те, и другие индукторы ферроптоза малорастворимы в воде, нестабильны, плохо проникают через плазматическую мембрану. Показана также их высокая токсичность для нормальных клеток [20, 21].

Эрастин – классический индуктор ферроптоза – был синтезирован в 2012 г. в лаборатории Брента Стоквелла. В его молекуле содержится структурный фрагмент хиназолина, который, очевидно, важен для индукции ферроптоза. Мы синтезировали аналоги эрастина с модифицированной структурой с заменой заместителей во 2-м и 3-м положениях хиназолинового цикла. Предполагалось, что такая замена приведет к усилению активности данных соединений по сравнению с эрастином и улучшит их растворимость.

Исследование *in vitro* способности соединений 1–5, производных 3-гидроксихиназолина, индуцировать ферроптоз в клетках MCF7 показало, что активность соединения 3 была сравнима с эффектом эрастина. Эти результаты подтверждены на экспериментальной модели карциномы молочной железы Ca-755 мышей. Соединение 3 показало высокий продолжительный противоопухолевый эффект в дозах 30 и 50 мг/кг при внутривентральном ежедневном введении в течение 5 дней. При использовании этого соединения в дозе 50 мг/кг продолжительность жизни животных увеличилась на 36 % по сравнению с применением эрастина (УПЖ – 11 %; $p < 0,05$).

Полученные недавно данные о репрограммировании метаболизма железа опухолевыми клетками чрезвычайно важны [22]. Стремительный рост опухоли требует намного большего расхода железа, чем метаболизм нормальных клеток. Одной из причин такого активного поглощения железа опухолевыми клетками является необходимость этого элемента для биосинтеза ДНК [23]. Железо также входит в состав дыхательных ферментов в качестве кофактора (при его недостатке ткани не могут усваивать кислород) [24] и участвует в генерации биологической энергии в живых организмах [25]. Можно предположить, что ферроптоз возникает из-за дисбаланса клеточных метаболических процессов (например, метаболизма липидов и кратковременного повышения уровня железа).

Следует отметить, что активация ферроптоза представляет собой энергетически менее затратную систему гибели клетки в отличие от апоптоза и других форм программированной гибели клеток. Индукция ферроптоза не требует процессинга эффекторов смерти, например, каспаз или газдерминов. Несмотря на несомненную перспективность активации ферроптоза в опухолевых клетках, к настоящему времени в клинической практике нет препарата, индуцирующего его. Полученные нами данные об индукции гибели клеток РМЖ и первичная оценка противоопухолевой активности аналога эрастина – соединения 3 – могут служить основанием для продолжения поиска индукторов ферроптоза в этом классе соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе химиотерапии не всегда удается убить все опухолевые клетки. Оставшаяся клеточная попу-

ляция приобретает новые мутации, что делает опухоль нечувствительной к предыдущему лечению. Опубликованные недавно данные о способности индукторов ферроптоза вызывать гибель резистентных к терапии опухолевых клеток привели нас к поиску низкомолекулярных активаторов ферроптоза. Мы основывались на результатах исследования блокирования апоптоза хелаторами железа [26] и соединениями, ингибирующими ферроптоз [27]. Так, кардиотоксичность доксорубина в клинической практике сегодня снижают соединениями, которые нейтрализуют ионы железа

или предотвращают образование радикалов кислорода [28].

Проведенные нами исследования показали, что производные 3-гидроксихиназолина индуцируют в MCF7-клетках ферроптоз, сравнимый с активностью эрастина. Соединение 3 оказывает более выраженный эффект на рост экспериментальной опухоли Ca-755 по сравнению с эрастином. Полученные предварительные результаты демонстрируют перспективность дальнейшего поиска потенциальных индукторов ферроптоза.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Harbeck N., Gnant M. Breast cancer. *Lancet* 2017;389(10074):1134–50. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8.
- Waks A.G., Winer E.P. Breast cancer treatment: a review. *JAMA* 2019;321(3):288–300. DOI: 10.1001/jama.2018.19323.
- Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;149(5):1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- Viswanathan V.S., Ryan M.J., Dhruv H.D. et al. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature* 2017;547(7664):453–7. DOI: 10.1038/nature23007.
- Li J., Cao F., Yin H.L., Huang Z.J. et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis* 2020;11(2):88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2.
- Yang W.S., Stockwell B.R. Ferroptosis: death by lipid peroxidation. *Trends Cell Biol* 2016;26(3):165–76. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.10.014.
- Gaschler M.M., Stockwell B.R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;482(3):419–25. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086.
- Marques O., da Silva B.M., Porto G. Iron homeostasis in breast cancer. *Cancer Lett* 2014;347(1):1–14. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.01.029.
- Chang V.C., Cotterchio M., Khoo E. Iron intake, body iron status, and risk of breast cancer: a systemic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 2019;19(1):543–8. DOI: 10.1186/s12885-019-5642-0.
- Bitonto V., Alberti D., Ruiu R. et al. L-ferritin: a theranostic agent of natural origin for MRI visualization and treatment of breast cancer. *J Control Release* 2020;319:300–10. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.12.051.
- Tang R., Xu J., Zhang B. et al. Ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis in anticancer immunity. *J Hematol Oncol* 2020;13(1):110–6. DOI: 10.1186/s13045-020-00946-7.
- Yu M., Gai C., Li Z. et al. Targeted exosome-encapsulated erastin induced ferroptosis in triple negative breast cancer cells. *Cancer Sci* 2019;110(10):3173–82. DOI: 10.1111/cas.14181.
- Неганова М.Е., Александрова Ю.Р., Пухов С.А. и др. Механизмы цитотоксического действия ряда циклических гидроксамовых кислот. *Биомедицинская химия* 2020;66(4):332–8. [Neganova M.E., Alexandrova Y.R., Pukhov S.A. et al. Mechanisms of cytotoxic action of a number of cyclic hydroxamic acids. *Biomedicinskaya himiya = Biomedical Chemistry* 2020;66(4):332–8. (In Russ.)]. DOI: 10.18097/PBMC20206604332.
- Борисова Л.М., Осипов В.Н., Гусев Д.В. и др. Производное 3-гидроксихиназолина, аналог эрастина, индуцирует ферроптоз в метастатических клетках меланомы. *Российский биотерапевтический журнал* 2021;20(1):67–73. [Borisova L.M., Osipov V.N., Gusev D.V. et al. A derivative of 3 hydroxyquinazoline, an analogue of erastin, induces apoptosis in metastatic melanoma cells. *Rossiiskij bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2021;20(1):67–73. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-67-73.
- Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. 8-е изд. Пер. с англ. Под ред. И.В. Белозерцевой, Д.В. Блинова, М.С. Красильщиковой. М.: ИРБИС, 2017. 336 с. [Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Translated from English. Ed. by I.V. Belozertseva, D.V. Blinov, M.S. Krasilschikova. Moscow: IRBIS, 2017. 336 p. (In Russ.)].
- Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркиной, А. Голдина, И. Кляйн. М.: Медицина, 1980. 296 с. [Experimental evaluation of antitumor drugs in the USSR and the USA. Ed. by Z.P. Sofina, A.B. Syrkin, A. Goldin, A. Klein. Moscow: Medicine, 1980. 296 p. (In Russ.)].
- Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К., 2012. С. 642–657. [Treschalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Methodical recommendations for the preclinical study of the antitumor activity of drugs. In: *Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part 1. Moscow: Grif and K., 2012. Pp. 642–57. (In Russ.)*].
- Ji X., Lu Y., Tian H. et al. Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomed Pharmacother* 2019;114:108800. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108800.
- Weiwei M., Bittker J.A., Lewis T.A. et al. Development of small-molecule probes that selectively kill cells induced to express mutant RAS. *Bioorg Med Chem Lett* 2012;22(4):1822–6. DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.09.047.
- Lee H., Zandkarimi F., Zhang Y. et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis. *Nat Cell Biol* 2020;22(2):225–34. DOI: 10.1038/s41556-020-0461-8.
- Shibata Y., Yasui H., Higashikawa K. Erastin, a ferroptosis-inducing agent, sensitized cancer cells to X-ray irradiation via glutathione starvation *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* 2019;14(12):e0225931. DOI: 10.1371/journal.pone.0225931.
- Hecht F., Pessoa C.F., Gentile L.B. et al. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumour Biol* 2016;37(4):4281–91. DOI: 10.1007/s13277-016-4873-9.
- Zhang D.L., Ghosh M.C., Rouault T.A. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis – an update. *Front Pharmacol* 2014;5:124–9. DOI: 10.3389/fphar.2014.00124.

24. Kleingardner J.G., Bren K.L. Biological significance and applications of heme proteins and peptides. *Acc Chem Res* 2015;48(7):1845–52. DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00106.
25. Orth M., Schapira A.H. Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet* 2001;106(1):27–36. DOI: 10.1002/ajmg.1425.
26. Doroshow J.H. Prevention of doxorubicin-induced killing of MCF-7 human breast cancer cells by oxygen radical scavengers and iron chelating agents. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;135(1):330–5. DOI: 10.1016/0006-291x(86)90981-2.
27. Buranrat B., Connor J.R. Cytoprotective effects of ferritin on doxorubicin induced breast cancer cell death. *Oncol Rep* 2015;34(5):2790–6. DOI: 10.3892/or.2015.4250.
28. Gammella E., Maccarinelli F., Buratti P. et al. The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Front Pharmacol* 2014;5:25–9. DOI: 10.3389/fphar.2014.00025.

Вклад авторов

В.Н. Осипов: синтез, очистка и характеристика производных 3-гидроксикиназолина, редактирование текста статьи;
Л.М. Борисова: разработка плана эксперимента *in vivo*, обработка и анализ результатов исследования *in vivo*, написание текста статьи, редактирование статьи;
И.С. Голубева, М.П. Киселева: проведение эксперимента *in vivo*;
Д.А. Хоченков: подготовка иллюстрационного материала;
А.А. Вартамян: разработка дизайна исследования, тестирование *in vitro* эрастина и производных 3-гидроксикиназолина, написание текста статьи.

Authors contributions:

V.N. Osipov: synthesis, purification and characterization of 3-hydroxyquinazoline derivatives, article editing;
L.M. Borisova: development of an *in vivo* experiment plan, processing and analysis of *in vivo* research results, article editing, article writing;
I.S. Golubeva, M.P. Kiseleva: conducting an *in vivo* experiment;
D.A. Khochenkov: preparation of illustrative material;
A.A. Vartanyan: study design development, *in vitro* testing of erastin and 3-hydroxyquinazoline derivatives, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Л.М. Борисова / L.M. Borisova: <https://orcid.org/0000-0003-4613-4584>
В.Н. Осипов / V.N. Osipov: <https://orcid.org/0000-0001-7726-4467>
И.С. Голубева / I.S. Golubeva: <https://orcid.org/0000-0002-7263-7444>
М.П. Киселева / M.P. Kiseleva: <https://orcid.org/0000-0002-4309-6722>
Д.А. Хоченков / D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>
А.А. Вартамян / A.A. Vartanyan: <https://orcid.org/0000-0001-9342-5523>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено в рамках государственного задания по теме «Разработка подходов к созданию противоопухолевых агентов на основе соединений – потенциальных индукторов ферроптоза» (№ АААА-А19-119021890101-1, 2019–2021 гг.).

Financing. The study was performed in the framework research work No. АААА-А19-119021890101-1 “Development of approaches for search of antitumor agents based on potential inducers of ferroptosis” (2019–2021).

Соблюдение правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with the rules of bioethics. The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia. The study was performed in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the protection of vertebrates used for research and other scientific purposes.

Статья поступила: 22.06.2021. **Принята к публикации:** 13.01.2022.

Article submitted: 22.06.2021. **Accepted for publication:** 13.01.2022.

Комплексный анализ прогностической значимости aberrаций хромосомы 8 у пациентов с увеальной меланомой

В.А. Яровая¹, А.А. Яровой¹, Л.В. Чудакова², И.А. Левашов¹, А.Р. Заретский²

¹ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России; Россия, 127486 Москва, Бескудниковский бульвар, 59;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, улица Островитянова, 1

Контакты: Вера Андреевна Яровая verandreevna@gmail.com

Введение. Способность увеальной меланомы к метастазированию зависит от целого спектра прогностических факторов, среди которых генетические имеют основополагающее значение. Роль нарушений короткого плеча хромосомы 8 (8p), а также комбинации изменений 8p и длинного плеча этой хромосомы (8q) в развитии метастатического поражения при данной патологии остается недостаточно изученной.

Цель исследования – проведение комплексного анализа прогностической значимости aberrаций хромосомы 8 у пациентов с увеальной меланомой.

Материалы и методы. Были проанализированы 2 ретроспективные группы пациентов, которым была проведена энуклеация по поводу увеальной меланомы, статистически однородные по основным клиническим параметрам. В 1-ю группу вошли больные без признаков метастазов ($n = 41$) со средним сроком наблюдения 71 мес, во 2-ю группу – больные с выявленными метастазами ($n = 51$) и средним сроком наблюдения 21 мес. Анализ хромосомных нарушений проводился методом мультиплексной амплификации лигированных зондов.

Результаты. Трех- и 5-летняя выживаемость пациентов с увеальной меланомой без делеции 8p составила 64 и 54 %, с делецией 8p – 25 и 6 % соответственно. У больных с амплификацией 8q эти показатели были равны 43 и 26 %, у больных без амплификации 8q – 80 и 74 % соответственно. Для пациентов с одновременной амплификацией региона 8q и делецией региона 8p 3- и 5-летняя выживаемость составила 26 и 7 %, тогда как для пациентов с изолированной амплификацией 8q – 47 и 35 % соответственно. Уровень выживаемости пациентов с изолированной амплификацией 8q и комбинацией нарушений ($del8p + amp8q$) различается существенно и достоверно: отношение рисков 3,26 (95 % доверительный интервал 1,86–5,69) и 6,89 (95 % доверительный интервал 2,67–17,73) ($p < 0,0001$).

Заключение. Оценка амплификации 8q, делеции 8p и комбинации этих нарушений должна стать неотъемлемой частью прогнозирования риска метастазирования увеальной меланомы. Необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

Ключевые слова: офтальмоонкология, молекулярная онкология, увеальная меланома, прогнозирование, выживаемость

Для цитирования: Яровая В.А., Яровой А.А., Чудакова Л.В. и др. Комплексный анализ прогностической значимости aberrаций хромосомы 8 у пациентов с увеальной меланомой. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(1):57–63. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-57-63.

Comprehensive analysis of chromosome 8 abnormalities and its prognostic value in patients with uveal melanoma

V.A. Yarovaya¹, A.A. Yarovoy¹, L.V. Chudakova², I.A. Levashov¹, A.R. Zaretskiy²

¹S.N. Fedorov MNTC «Eye Microsurgery», Ministry of Health of Russia; 59 Beskudnikovsky Bul'var, Moscow 127486, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997 Russia

Contacts: Vera Andreevna Yarovaya verandreevna@gmail.com

Introduction. Uveal melanoma ability to metastasize depends on a few prognostic factors. The genetic ones are considered to be the most significant. The role of disorders of the short arm of chromosome 8 (8p), as well as a combination

of changes in 8p and the long arm of this chromosome (8q) in the development of metastatic lesions in this pathology remains insufficiently studied.

The study objective – to evaluate the prognostic value of chromosome 8 abnormalities in patients with uveal melanoma.

Materials and methods. We analyzed 2 retrospective groups of patients who underwent enucleation for uveal melanoma, statistically homogeneous in the main clinical parameters. Group 1 included patients without signs of metastases ($n = 41$) with an average follow-up period of 71 months, Group 2 included patients with detected metastases ($n = 51$) and an average follow-up period of 21 months. Chromosome abnormalities were tested by multiplex ligation-dependent probe amplification.

Results. Three- and five-year survival in patients with uveal melanoma without 8p deletion were 64 and 54 %, respectively; with 8p deletion significantly lower – 25 and 6 %, respectively. The same survival rates in patients with uveal melanoma with 8q amplification were 43 and 26 %, respectively, whereas in patients without 8q amplification they were significantly higher – 80 and 74 %, respectively. In patients with uveal melanoma harbouring both abnormalities, 3- and 5-year survival rates were 26 and 7 %, whereas isolated 8q amplification was associated with 47 and 35 % survival, respectively. These survival rates differ greatly and significantly: hazard ratio 3,26 (95 % confidence interval 1,86–5,69) and 6,89 (95 % confidence interval 2,67–17,73), respectively ($p < 0,0001$).

Conclusion. The findings support comprehensive evaluation of chromosome 8 abnormalities as a substantial part of uveal melanoma prognostication. 8q amplification, 8p deletion, combination of these abnormalities and its role in uveal melanoma malignancy should be further discovered. Further research in this direction is needed.

Key words: ocular oncology, molecular oncology, uveal melanoma, prognostication, survival rate

For citation: Yarovaya V.A., Yarovoy A.A., Chudakov L.V. et al. Comprehensive analysis of chromosome 8 abnormalities and its prognostic value in patients with uveal melanoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(1):57–63. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-57-63.

ВВЕДЕНИЕ

Уvealная меланома (УМ) – наиболее частая первичная злокачественная опухоль сосудистой оболочки глаза [1]. Способность УМ к метастазированию зависит от целого спектра прогностических факторов: клинических, морфологических и генетических [2, 3]. Последним из них, по данным различных исследований, придается особое значение [2–5].

При УМ встречаются различные генетические нарушения, среди которых можно выделить мутации генов-драйверов и генов-модификаторов. Драйверные мутации в генах *GNAQ* и *GNA11*, выявляемые в подавляющем большинстве образцов УМ, не влияют на прогноз заболевания [6, 7]. В то же время наличие генов-модификаторов существенно коррелирует с риском развития метастазирования при данной патологии.

К генетическим нарушениям при УМ относят изменения в генах *BAP1*, *EIF1AX* и *SF3B1*, а также цитогенетические aberrации – сбой копийности хромосом 1, 3, 6 и 8 или их крупных регионов [2, 3, 8]. Часть из них легла в основу построения прогностических классификаций, таких как GEP-профилирование (количественный анализ экспрессии генов, gene expression profiling) [1], 4-частные классификации В. Royer-Bertrand и соавт. [7] и А.Г. Robertson и соавт. [9], а также многоуровневая классификация The Cancer Genome Atlas (TCGA) [5].

Фокус большинства исследований смещен на изучение хромосомы 3, в том числе ее различных маркерных регионов [1, 8]. Анализ хромосомы 8 чаще всего включает оценку только ее длинного плеча (8q). Изменение именно этого региона лежит в основе ряда классификаций [5, 7]. При этом роль нарушений короткого плеча хромосомы 8 (8p), а также комбинации

изменений 8p и 8q не учитывается. По данным литературы, значение данных нарушений в выживаемости пациентов с УМ остается недостаточно изученным.

Цель исследования – комплексный анализ прогностической значимости хромосомы 8 у пациентов с УМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании участвовали 96 пациентов (96 глаз), которым была проведена первичная энуклеация по поводу УМ в МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова в период с 2000 по 2017 г. Больных без признаков метастазирования ($n = 41$) включали в данную группу при сроках наблюдения свыше 36 мес (средний срок – 70,5 мес, от 36 до 105 мес). У 55 человек выявлены метастазы в сроки наблюдения от 2 до 44 мес (средний срок – 21 мес). Для исключения влияния клинических факторов прогноза группы пациентов с метастазами и без них были статистически однородными по основным из них: возрасту, полу, размеру опухоли, локализации, вовлечению в процесс цилиарного тела и экстрабульбарному росту ($p > 0,1$ – уровень значимости, рассчитанный по критериям Стьюдента (Student's t-test), χ^2 , а также двустороннему точному критерию Фишера).

Для проведения комплексного анализа прогностической значимости хромосомы 8 у пациентов с УМ количество копий ее короткого плеча (8p) и длинного плеча (8q) впервые в отечественной практике оценивали методом мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA). Использовали набор реагентов Uveal Melanoma Probemix (MRC Holland, Нидерланды) в соответствии с инструкцией производителя. Математическую обработку результатов проводили в 3 этапа согласно его рекомендациям.

Финальную интерпретацию результатов выполняли на основе данных после 2 раундов нормализации (опираясь на значения параметра Final Ratio) (табл. 1).

Таблица 1. Интерпретация параметра Final Ratio при анализе результатов мультиплексной амплификации лигированных зондов

Table 1. Final ratio interpretation in multiplex ligation-dependent probe amplification

| Значение параметра Parameter value | Интерпретация Interpretation |
|---------------------------------------|--|
| FR ≤ 0,7 | Делеция Deletion |
| 0,7 < FR < 0,85 | Субклональная делеция Subclonal deletion |
| 0,85 ≤ FR ≤ 1,1 | Норма Standard |
| 1,1 < FR < 1,3 | Субклональная амплификация Subclonal amplification |
| 1,3 ≤ FR ≤ 2 | Амплификация Amplification |
| FR > 2 | Амплификация высокого уровня High-level amplification |

Примечание. FR – Final Ratio.

Note. FR – Final Ratio.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерных программ MedCalc 19.5.3 (MedCalc Software Ltd, Бельгия) и Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Количество копий короткого плеча хромосомы 8.

По результатам исследования количества копий 8p методом MLPA в 11 (12 %) образцах была выявлена делеция данного региона, в 5 (5 %) – субклональная делеция, в 17 (18 %) – амплификация и в 27 (28 %) – субклональная амплификация. В 35 (37 %) образцах значимых изменений количества копий региона 8p обнаружено не было.

Было отмечено, что в группе пациентов с метастазами УМ достоверно чаще превалирует делеция, а также субклональная делеция региона 8p (табл. 2). При этом амплификация достоверно чаще встречалась в группе пациентов без метастатического поражения ($p = 0,02$).

Данные наблюдения нашли подтверждение при проведении анализа выживаемости с помощью метода Каплана–Майера (рис. 1, а). Очевидна ассоциация низкой выживаемости пациентов с делецией 8p, в том числе с субклональной делецией. При этом разница в выживаемости при этих двух нарушениях – делеции и субклональной делеции – отсутствовала ($p = 0,9$). Пациенты с амплификацией, субклональной амплификацией, амплификацией высокой степени

Таблица 2. Распределение количества копий региона 8p у пациентов с увеальной меланомой в зависимости от наличия метастазов

Table 2. Distribution of the number of copies of region 8p in of patients with uveal melanoma depending on the presence of metastases

| Статус копийности региона 8p The copy status of the region is 8p | Пациенты без метаста- зов, абс. (%) (n = 41) Patients without metastases, abs. (%) (n = 41) | Пациенты с метастаза- ми, абс. (%) (n = 55) Patients with metastases, abs. (%) (n = 55) | p |
|---|---|--|-------|
| Норма Standard | 18 (44) | 17 (31) | 0,02* |
| Делеция Deletion | 1 (2) | 10 (18) | |
| Субклональная делеция Subclonal deletion | 0 (0) | 5 (9) | |
| Амплификация Amplification | 11 (27) | 6 (11) | |
| Субклональная амплификация Subclonal amplification | 11 (27) | 16 (29) | |
| Амплификация высокой степени High-level amplification | 0 (0) | 1 (2) | |

*Уровень значимости, рассчитанный по критерию Манна–Уитни. Статистически значимая разница между группами отсутствует, если $p > 0,05$

*The significance level calculated according to the Mann–Whitney criterion. There is no statistically significant difference between the groups if $p > 0,05$

и нормой имели достоверно более высокие показатели выживаемости ($p = 0,0003$). Выживаемость при данных изменениях 8p (амплификация, субклональная амплификация, амплификация высокой степени и норма) также сравнивали между собой; различий выявлено не было ($p = 0,6$).

Полученные данные позволяют предположить, что изменения 8p целесообразно рассматривать в обобщенном виде – с точки зрения наличия или отсутствия делеции данного региона, включая субклональную делецию (рис. 1, б). Трех- и 5-летняя выживаемость пациентов без делеции 8p составила 64 и 54 % соответственно ($p < 0,0001$), пациентов с делецией 8p – 25 и 6 % соответственно ($p < 0,0001$).

Количество копий длинного плеча хромосомы 8.

По результатам исследования количества копий 8q методом MLPA в 58 % ($n = 55$) образцов выявлена амплификация и в 15 % ($n = 14$) – субклональная амплификация. В 27 % ($n = 26$) образцов значимых изменений количества копий региона 8q обнаружено не было. Делеции и субклональные делеции региона 8q не выявлены ни в одном случае.

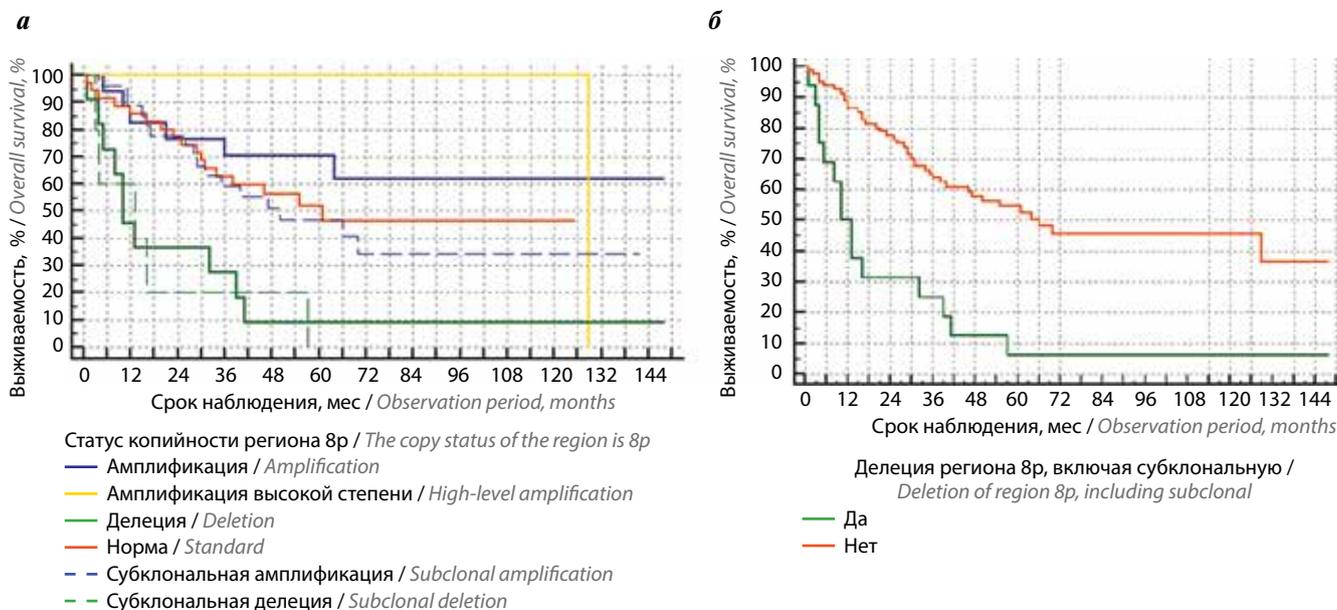


Рис. 1. Выживаемость пациентов при различных изменениях короткого плеча хромосомы 8: а – первичные данные; б – обобщенные данные (наличие или отсутствие делеции)

Fig. 1. Overall survival in patients with the short arm of chromosome 8 changes: a – primary data; б – deletion presence or absence

У пациентов без метастазов чаще выявляли нормальный статус региона 8q и субклональную амплификацию, у пациентов с метастазами – амплификацию и амплификацию высокой степени ($p < 0,0001$).

Таблица 3. Распределение количества копий региона 8q у пациентов в зависимости от наличия метастазов

Table 3. Distribution of the number of copies of region 8q in patients with uveal melanoma depending on the presence of metastases

| Статус копийности региона 8q The copy status of the region is 8q | Пациенты без метастазов, абс. (%) (n = 41) Patients without metastases, abs. (%) (n = 41) | Пациенты с метастазами, абс. (%) (n = 55) Patients with metastases, abs. (%) (n = 55) | p |
|---|--|--|----------|
| Норма Standard | 19 (46) | 7 (13) | <0,0001* |
| Амплификация Amplification | 11 (27) | 26 (47) | |
| Субклональная амплификация Subclonal amplification | 9 (22) | 5 (9) | |
| Амплификация высокой степени High-level amplification | 2 (5) | 17 (31) | |

*Уровень значимости, рассчитанный по критерию Манна–Уитни. Статистически значимая разница между группами отсутствует, если $p > 0,05$

*The significance level calculated according to the Mann–Whitney criterion. There is no statistically significant difference between the groups if $p > 0.05$

Анализ данных показал, что разница в показателях выживаемости пациентов с субклональной амплификацией и нормой отсутствует ($p = 0,4$), тогда как разница в этих показателях у пациентов с субклональной амплификацией и амплификацией имеет слабую тенденцию к достоверности ($p = 0,09$). Этот факт, а также преобладание субклональной амплификации в группе больных без метастазов позволяют предположить, что субклональную амплификацию 8q не стоит расценивать как прогностически неблагоприятный фактор (табл. 3). Сравнение данных по выживаемости пациентов с амплификацией и амплификацией высокой степени показывает, что пациенты с амплификацией высокой степени имеют выживаемость ниже, чем пациенты с амплификацией с тенденцией к достоверности ($p = 0,06$) (рис. 2, а). Так, уровень 3- и 5-летней выживаемости при наличии амплификации составил 49 и 32 % соответственно, а амплификации высокой степени – 26 и 16 % соответственно. Однако для подтверждения предположения о роли амплификации высокой степени в увеличении риска метастазирования УМ необходимо исследовать больше больных с таким изменением региона 8q.

Полученные данные позволяют предположить, что изменения региона 8q целесообразно рассматривать в обобщенном виде – с точки зрения наличия или отсутствия амплификации данного региона, исключая субклональную амплификацию (рис. 2, б). Трех- и 5-летняя выживаемость пациентов с амплификацией 8q составила 43 и 26 % ($p < 0,0001$), а пациентов без амплификации 8q – 80 и 74 % соответственно ($p < 0,0001$).

Интегральная оценка aberrаций хромосомы 8. С целью интегральной оценки роли aberrаций хромосомы 8 в определении прогноза пациентов с УМ была

проанализирована выживаемость больных 4 групп: с нормой ($n = 39$), изолированной амплификацией региона 8q ($n = 41$), изолированной делецией 8p ($n = 1$) и комбинацией этих 2 молекулярных нарушений ($n = 15$). В нашем исследовании для больных с одновременной амплификацией региона и делецией региона 8p 3- и 5-летняя выживаемость составила 26 и 7 % соответственно, тогда как для больных с изолированной амплификацией 8q – 47 и 35 % соответственно (рис. 3). Уровень выживаемости пациентов с изолированной амплификацией 8q и комбинацией нарушений (делеция 8p + амплификация 8q) различается существенно и достоверно: отношение рисков (ОР) 3,26; (95 % доверительный интервал (ДИ) 1,86–5,69) и 6,89 (95 % ДИ 2,67–17,73) соответственно ($p < 0,0001$). Это позволяет предположить, что при УМ изолированная амплификация 8q и комбинация амплификации региона 8q с делецией 8p могут быть рассмотрены как маркеры 2 различных прогностических классов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании М. Mazloumi и соавт. при сравнении клинической значимости 2 классификационных подходов выявлена большая роль молекулярно-генетических факторов в прогнозировании течения УМ [4]. Классический подход Американского объединенного комитета по раку (American Joint Committee on Cancer, AJCC) основан исключительно на клинических данных (размер и локализация опухоли, вовлеченность цилиарного тела и экстраокулярный рост), в то время как в проекте «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA) предлагается новый подход, учитывающий хромосомный и геномный ландшафты УМ [5]. Основываясь на результатах сравнительного

анализа, авторы сделали вывод, что молекулярно-генетический подход позволяет более точно определить риск развития метастазов у пациентов с УМ.

В работах по изучению молекулярно-генетических особенностей УМ наибольшее внимание традиционно уделяется копийности хромосомы 3, а также ассоциированным изменениям гена *BAP1* [1, 5, 7, 8, 10]. В отличие от подходов COMS (The Collaborative Ocular Melanoma Study) и A.G. Robertson и соавт., фокус которых направлен преимущественно на статус хромосомы 3, коллективы авторов из исследовательской группы TCGA и Швейцарии изучают aberrации хромосомы 8 и их влияние на риск развития метастазов [5–7, 11, 12]. Благодаря их работам интерес к этой проблеме в последнее время возрастает. Изучение широкого спектра нарушений хромосомы 8 (как его короткого, так и длинного плеча) обусловлено необходимостью выделения наиболее значимых изменений, которые позволили бы самостоятельно или с учетом других генетических аномалий с высокой достоверностью определять риск развития метастатических поражений у пациентов с УМ.

Анализ 8p встречается преимущественно в работах авторов из Wills Eye Hospital (Филадельфия, США) [13, 14]. Согласно их данным нормальный статус 8p встречается в 59 % случаев, амплификация 8p – в 7 %, делеция 8p – в 10 %. В ходе нашего исследования норма выявлена в 37 % случаев, амплификация – в 18 %, субклональная амплификация – в 28 %, делеция – в 12 % случаев, субклональная делеция – в 5 %. При интерпретации субклональных изменений в сторону нормы (в сумме – 70 %) результаты встречаемости изменений 8p, полученные авторами, оказываются вполне сопоставимыми с результатами нашей работы.

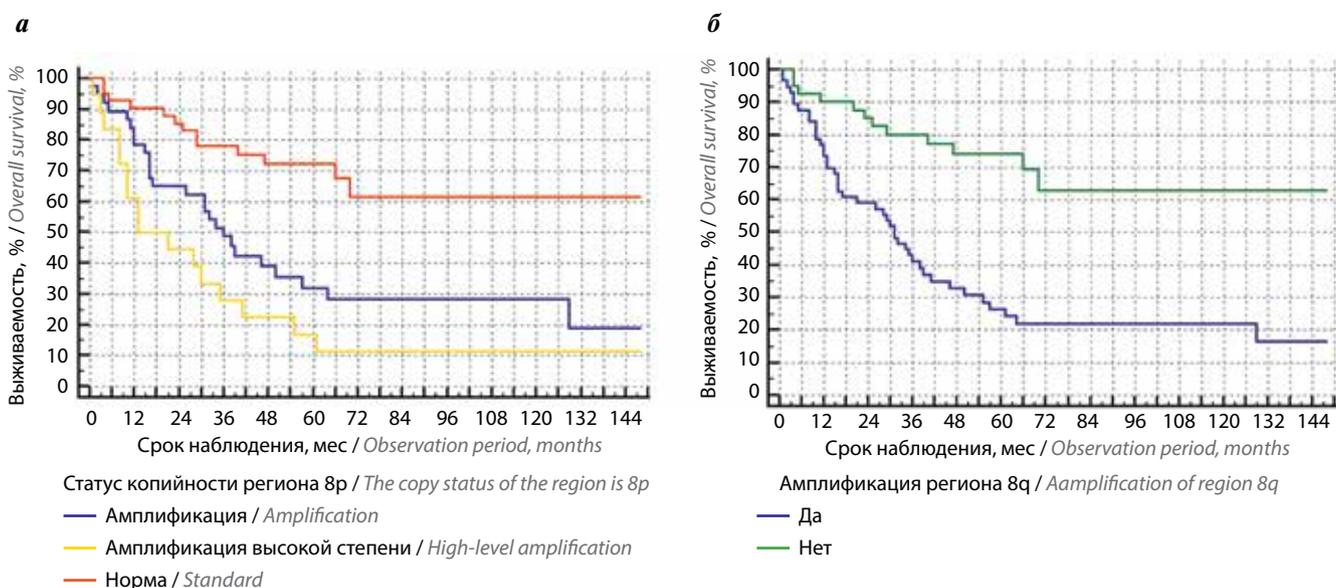


Рис. 2. Выживаемость пациентов при различных изменениях длинного плеча хромосомы 8: а – первичные данные; б – обобщенные данные (наличие или отсутствие амплификации)

Fig. 2. Survival of patients with various changes in the long arm of chromosome 8: а – primary data; б – amplification presence or absence

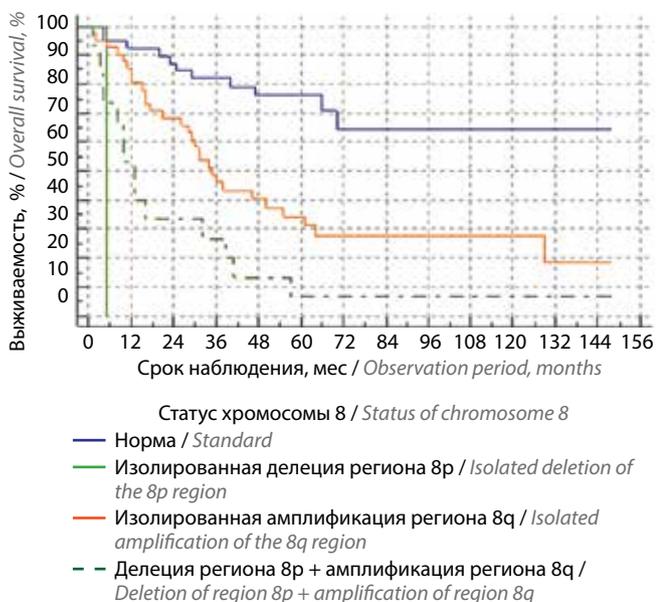


Рис. 3. Выживаемость пациентов с различным статусом хромосомы 8
Fig. 3. Overall survival in patients with various chromosome 8 status

В работах P. Vichitvejpaisal и соавт. и С. L. Shields и соавт., которые включали наиболее крупные выборки (658 и 1059 пациентов соответственно), нормальный статус 8q встречается в 52–59 % случаев, амплификация 8q – в 32–40 % [12, 13]. Амплификацию высокой степени оценивали только P. Vichitvejpaisal и соавт.; она была выявлена в 16 % случаев. Согласно полученным нами данным частота встречаемости нормального статуса 8q составила 27 %, субклональной амплификации (не оценивалась в аналогичных работах) – 15 %, амплификации – 38 %, амплификации высокой степени – 20 %, что сопоставимо с результатами приведенных исследований.

С. L. Shields и соавт. пришли к выводу, что показатели ОР имеют наибольшие прогностические значения при делеции 8p (ОР 21,5; $p < 0,001$), амплификации 8q (ОР 9,77; $p < 0,001$) и моносомии 3 (ОР 6,68; $p < 0,001$) [13]. Также их результаты указывают на высокую прогностическую значимость следующих сочетаний: моносомия 3 и дисомия 6 + амплификация 8q +/- делеция 8p (ОР 31,6; $p < 0,001$ – для комбинации с делецией 8p; ОР 19,5; $p < 0,001$ – для комбинации без делеции 8p). В связи с крайне редкой встречаемостью изолированной делеции 8p (без сочетанных нарушений 8q), как по данным С. L. Shields и соавт., так и по нашим дан-

ными, достоверно оценить прогностическую значимость этого фактора не представляется возможным. В то же время стоит отметить высокую ценность комбинации нарушений 8p и 8q в прогнозировании выживаемости, на которую указывают как результаты исследования С. L. Shields и соавт., так и наши данные.

Полученные нами результаты подтверждают высокую прогностическую значимость различных изменений хромосомы 8 при УМ. Как и следовало ожидать, наблюдается весьма сильная ассоциация между амплификацией 8q и риском метастазирования ($p < 0,0001$). Однако не менее важной оказывается роль делеции 8p: уровень общей выживаемости пациентов с таким нарушением был значительно ниже (3-летняя выживаемость – 25 %, 5-летняя – 6 %) по сравнению с выживаемостью пациентов без него (3-летняя выживаемость – 64 %, 5-летняя – 54 %) ($p < 0,0001$).

Анализ делеции 8p, амплификации 8q и их комбинации, а также оценка прогностической значимости этих молекулярных нарушений до настоящего времени не привлекали особого внимания исследователей. Тем не менее изолированную амплификацию 8q можно рассматривать как признак сравнительно небольшого ухудшения прогноза: пациенты с делецией 8p и амплификацией 8q, а, возможно, и пациенты с изолированной делецией 8p характеризуются крайне неблагоприятным прогнозом. Полученные нами результаты ставят под сомнение имеющиеся прогностические номенклатуры, учитывающие лишь такое изменение хромосомы 8, как амплификация 8q. Отсутствие внимания к статусу региона 8p может стать причиной неточного определения риска метастазирования у пациентов с УМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У 37 % пациентов с УМ не выявлено изменений 8p. Изменения в регионе 8q встречаются в 73 % случаев. У пациентов с УМ с делецией 8p или амплификацией 8q показатели выживаемости намного хуже, чем у пациентов без этих нарушений ($p < 0,0001$ для всех). Наличие и делеции 8p, и амплификации 8q ассоциировано с низкими показателями выживаемости больных с данной патологией ($p < 0,0001$).

Оценка амплификации 8q, делеции 8p и комбинации этих нарушений должна стать неотъемлемой частью прогнозирования риска метастазирования УМ и требует активного изучения в дальнейшем.

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

1. Onken M.D., Worley L.A., Char D.H. et al. Collaborative Ocular Oncology Group Report Number 1: prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma. *Ophthalmology* 2012;119(8):1596–603. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.02.017.
2. Singh A.D., Zabor E.C., Radivoyevitch T. Estimating cured fractions of uveal melanoma. *JAMA Ophthalmol* 2021;139(2):174–81. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2020.5720.
3. Jager M.J., Shields C.L., Cebulla C.M. et al. Uveal melanoma. *Nat Rev Dis Primers* 2020;6(1):24. DOI: 10.1038/s41572-020-0158-0.
4. Mazloumi M., Vichitvejpaisal P., Dalvin L.A. et al. Accuracy of The Cancer Genome Atlas Classification vs american joint committee on cancer classification for prediction of metastasis in patients with uveal melanoma. *JAMA Ophthalmol* 2020;138(3):260–7. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2019.5710.
5. Jager M.J., Brouwer N.J., Esmali B. The Cancer Genome Atlas Project: an integrated molecular view of uveal melanoma. *Ophthalmology* 2018;125(8):1139–42. DOI: 10.1016/j.ophtha.2018.03.011.
6. Dogrusöz M., Jager M.J. Genetic prognostication in uveal melanoma. *Acta Ophthalmol* 2018;96(4):331–47. DOI: 10.1111/aos.13580.
7. Royer-Bertrand B., Torsello M., Rimoldi D. et al. Comprehensive genetic landscape of uveal melanoma by whole genome sequencing. *Am J Hum Genet* 2016;99(5):1190–8. DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.09.008.
8. Shields C.L., Ganguly A., Bianciotto C.G. et al. Prognosis of uveal melanoma in 500 cases using genetic testing of fine-needle aspiration biopsy specimens. *Ophthalmology* 2011;118(2):396–401. DOI: 10.1016/j.ophtha.2010.05.023.
9. Robertson A.G., Shih J., Yau C. et al. Integrative analysis identifies four molecular and clinical subsets in uveal melanoma. *Cancer Cell* 2017;32(2):204–20.e15. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.07.003.
10. Damato B., Duke C., Coupland S.E. et al. Cytogenetics of uveal melanoma. *Ophthalmology* 2007;114(10):1925–31. DOI: 10.1016/j.ophtha.2007.06.012.
11. Shields C.L., Say E.A.T., Hasanreisoglu M. et al. Cytogenetic abnormalities in uveal melanoma based on tumor features and size in 1059 patients. *Ophthalmology* 2017;124(5):609–18. DOI: 10.1016/j.ophtha.2016.12.026.
12. Vichitvejpaisal P., Dalvin L.A., Mazloumi M. et al. Genetic analysis of uveal melanoma in 658 patients using the cancer genome atlas classification of uveal melanoma as A, B, C, and D. *Ophthalmology* 2019;126(10):1445–53. DOI: 10.1016/j.ophtha.2019.04.027.
13. Shields C.L., Say E.A.T., Hasanreisoglu M. et al. Personalized prognosis of uveal melanoma based on cytogenetic profile in 1059 patients over an 8-year period. *Ophthalmology* 2017;124(10):1523–31. DOI: 10.1016/j.ophtha.2017.04.003.
14. Ewens K.G., Kanetsky P.A., Richards-Yutz J. et al. Genomic profile of 320 uveal melanoma cases: chromosome 8p-loss and metastatic outcome. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2013;54(8):5721–9. DOI: 10.1167/iovs.13-12195.

Вклад авторов

V.A. Яровая: разработка концепции и дизайна исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;
 A.A. Яровой: разработка концепции и дизайна исследования, научное редактирование;
 Л.В. Чудакова: проведение молекулярно-генетических тестов, сбор и анализ данных;
 И.А. Левашов: сбор, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;
 А.Р. Зарещкий: разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, научное редактирование.

Authors' contribution

V.A. Yarovaya: development of the concept and design of research, collection, analysis and interpretation of data, article writing;
 A.A. Yarovoy: development of the concept and design of research, scientific editing;
 L.V. Chudakova: conducting molecular genetic tests, data collection and analysis;
 I.A. Levashov: data collection, analysis and interpretation, article writing;
 A.R. Zaretsky: development of the concept and design of research, data analysis and interpretation, scientific editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

V.A. Яровая / V.A. Yarovaya: <https://orcid.org/0000-0001-8937-7450>
 A.A. Яровой / A.A. Yarovoy: <https://orcid.org/0000-0003-2219-7054>
 Л.В. Чудакова / L.V. Chudakova: <https://orcid.org/0000-0002-8592-1188>
 И.А. Левашов / I.A. Levashov: <https://orcid.org/0000-0001-6949-1002>
 А.Р. Зарещкий / A.R. Zaretsky: <https://orcid.org/0000-0002-7778-6617>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (государственное задание 300060056 для ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России).

Financing. The study was conducted with the support of the Ministry of Health of Russia (state task 300060056 for the Federal State Educational Institution of the N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia).

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: 19.10.2021. **Принята к публикации:** 18.01.2022.

Article submitted: 19.10.2021. **Accepted for publication:** 18.01.2022.

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 (большой объем допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции).

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

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

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

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

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

- введение,
- цель,
- материалы и методы,
- результаты,
- обсуждение,
- заключение (выводы),
- вклад всех авторов в работу,
- конфликт интересов для всех авторов (в случае его отсутствия необходимо указать: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»),
- одобрение протокола исследования комитетом по биоэтике (с указанием номера и даты протокола),

- информированное согласие пациентов (для статей с авторскими исследованиями и описаниями клинических случаев),
- при наличии финансирования исследования – указать его источник (грант и т.д.),
- благодарности (раздел не является обязательным).

7. Иллюстративный материал

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

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

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

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подрисовочными 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 подрисовочной 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 графов 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.