

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



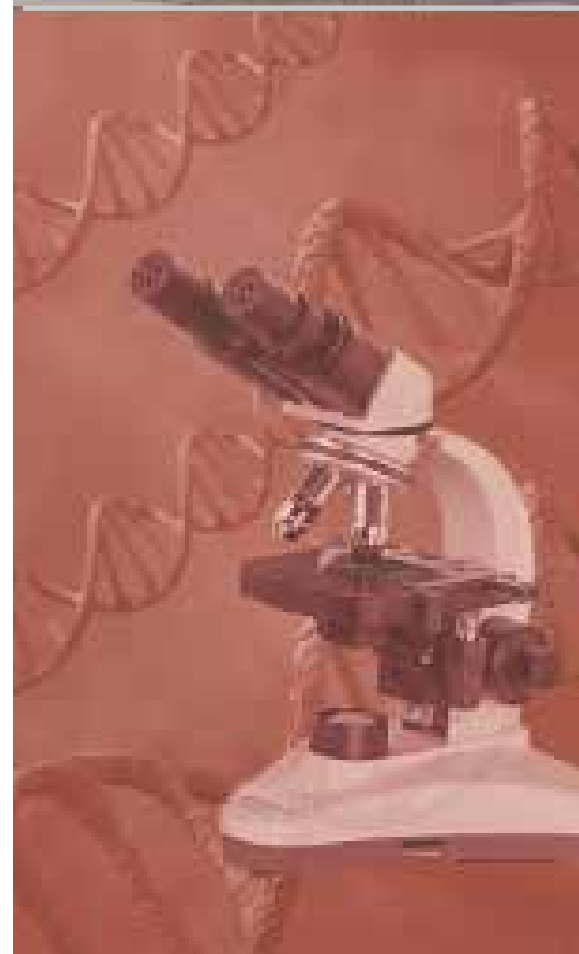
*Прогностическое значение
циркулирующей в крови опухолевой
ДНК при колоректальном раке*

*Молекулярная гетерогенность
и анализ отдаленной выживаемости
при гастроинтестинальных
стромальных опухолях*

*Маркеры прогноза ответа
на иммунотерапию
при немелкоклеточном раке легкого*

*Противоопухолевый эффект
рекомбинантного интерферона
гамма в экспериментальной
модели карциномы Эрлиха*

*Иммуногистохимическое
исследование увеальной меланомы
и клеточного микроокружения*



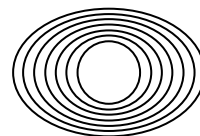
ТОМ 9 № 2
2022

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 .

ТОМ 9
2'22

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)
ISSN 2413-3787 (Online)
Успехи молекулярной онкологии.
2022. Том 9. № 2. 1–120.
Сдано в печать: 23.06.2022.
© 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 рентгенодиагностики» Минздрава России, заслуженный врач РФ (Москва, Россия)

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

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

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

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

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

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

Карамышева Анда Фуадовна, д.б.н., заведующая лабораторией генетики опухолевых клеток НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

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)

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

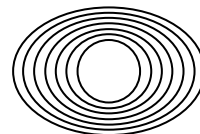
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

The journal is included in the Scientific Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor; it is registered in the 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

2^{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

(PII No. Φ C77-57560
dated 08 April 2014).

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

The editorial board is not responsible
for advertising content.

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

ISSN 2313-805X (Print)

ISSN 2413-3787 (Online)

Uspekhi molekulyarnoy onkologii.
2022. Vol. 9 No. 2. 1–120.

Submitted: 23.06.2022.

© PH "ABV-Press", 2022

Pressa Rossii catalogue index: 93562.

Printed at the Mail Technology Ltd
Bld. 16, 13 Perevedenovsky 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 Roentgenoradiology of the Ministry of Health of Russia, Honored Doctor of the Russian Federation (Moscow, Russia)

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

Karamysheva Aida F., DSci, PhD, Head of the Laboratory of the Genetics of Tumor Cells 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)

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

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

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

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

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

Shcherbakov Alexander M., Senior Researcher, Acting Head of the Laboratory of Oncoproteomics of the Department of Experimental Biology of Tumors of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

Г.М. Волгарева

Ассоциация рака молочной железы с онкогенными папилломавирусами: обнаружение ДНК папилломавирусов в клетках рака молочной железы10

С.Е. Седых, А.М. Тимофеева, А.Е. Кулешова, Г.А. Невинский

Экзосомы молока в качестве агентов доставки терапевтически значимых препаратов при онкологических заболеваниях23

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Е.М. Полянская, М.Ю. Федянин, У.А. Боярских, А.А. Кечин, Е.А. Мороз, Е.А. Храпов, И.П. Оскоробин, Д.В. Шамова, В.А. Алиев, З.З. Мамедли, А.А. Трякин, М.Л. Филипенко, С.А. Тюлядин

Прогностическое значение наличия в крови циркулирующей опухолевой ДНК как маркера минимального резидуального заболевания при колоректальном раке I–III стадии32

Н.Н. Мазуренко, В.В. Югай, И.В. Цыганова, М.П. Никулин, П.П. Архири, О.А. Анурова, Н.А. Козлов, И.С. Стилиди

Молекулярная гетерогенность и анализ отдаленной выживаемости пациентов с гастроинтестинальными стромальными опухолями43

А.М. Щербаков, Т.И. Фетисов, Д.В. Сорокин, В.Ю. Зиновьева, Н.И. Моисеева, Л.А. Лалетина, Е.М. Кирилин, А.Е. Маникайло, Л.Я. Фомина, Л.В. Мехеда, А.Ю. Бохян, Е.А. Лесовая, Л.С. Труханова, Т.Г. Горькова, Е.Е. Антошина, О.В. Морозова, К.И. Кирсанов, М.Г. Якубовская

Гипоксические белки VEGF A и CA IX и резистентность клеток сарком мягких тканей к химиопрепаратам: пилотный опыт *ex vivo* анализа58

А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, Н.В. Елкина, М.Е. Аксельрод, С.А. Кузьмичев, Е.М. Чевкина

Резистентность клеток рака молочной железы к полностью трансретиноевой кислоте ассоциирована со снижением базального уровня экспрессии ядерного рецептора RAR α и индукции экспрессии цитохромов CYP26A1 и CYP26B166

А.А. Мусаелян, С.В. Лапин, М.А. Уртенкова, С.В. Одинцова, И.В. Чистяков, А.М. Улитин, Н.Т. Исманбаев, А.Л. Аюпов, С.В. Орлов

Иммунологические маркеры прогноза ответа на иммунотерапию при немелкоклеточном раке легкого79

Е.Ю. Златник, А.Б. Сагакянц, И.А. Новикова, А.Ю. Максимов, О.П. Шатова, С.А. Апполонова, Н.Е. Москалева, С.А. Румянцев, А.В. Шестопалов

Метаболизм триптофана при различном эффекте иммунотерапии немелкоклеточного рака легкого ингибиторами PD-1/PD-L189

С.В. Саакян, Л.А. Катаргина, Е.Б. Мякошина, Г.П. Захарова, И.П. Хорошилова–Маслова, А.М. Майбогин

Иммуногистохимическое исследование увеальной меланомы и ее клеточного микроокружения97

О.И. Кит, И.А. Камаева, И.Б. Лысенко, И.А. Новикова, Н.Н. Тимошкина, Н.В. Николаева, Я.С. Гайсултанова, Н.Ю. Саманева, А.А. Пушкин

Первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома с редкой мутацией в гене *ALK*105

В.Г. Исаева, Л.Ю. Гривцова, Л.П. Жовтун, С.М. Самборский, Н.А. Фалалеева

Противоопухолевый эффект рекомбинантного интерферона гамма в экспериментальной модели билатеральной солидной карциномы Эрлиха111

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ 120

REVIEWS

G.M. Volgareva

Breast cancer association with oncogenic papillomaviruses: papillomaviral DNA detection in breast cancer cells10

S.E. Sedykh, A.M. Timofeeva, A.E. Kuleshova, G.A. Nevinskiy

Milk exosomes as delivery agents for therapy of cancer diseases23

EXPERIMENTAL REPORTS

E.M. Polyanskaya, M.Yu. Fedyanin, U.A. Boyarskikh, A.A. Kechin, E.A. Moroz, E.A. Khrapov, I.P. Oskorobin, D.V. Shamovskaya, V.A. Aliev, Z.Z. Mammadli, A.A. Tryakin, M.L. Filipenko, S.A. Tyulendin

The prognostic value of circulating in blood tumor DNA as a marker of minimal residual disease in stage I–III colorectal cancer33

N.N. Mazurenko, V.V. Yugay, I.V. Tsyganova, M.P. Nikulin, P.P. Arhiri, O.A. Anurova, N.A. Kozlov, I.S. Stilidi

Molecular heterogeneity and analysis of the long-term survival of patients with gastrointestinal stromal tumors43

A.M. Scherbakov, T.I. Fetisov, D.V. Sorokin, V.Yu. Zinovieva, N.I. Moiseeva, L.A. Laletina, E.M. Kirilin, A.E. Manikaylo, L.Ya. Fomina, L.V. Mekheda, B.Yu. Bokhyan, E.A. Lesovaya, L.S. Trukhanova, T.G. Gor'kova, E.E. Antoshina, O.V. Morozova, K.I. Kirsanov, M.G. Yakubovskaya

Hypoxia-related proteins VEGF A and CA IX and resistance of soft tissue sarcoma cells to chemotherapy: *ex vivo* pilot study58

A.D. Enikeev, A.V. Komelkov, N.V. Elkina, M.E. Akselrod, S.A. Kuzmichev, E.M. Tchevkina

Resistance of breast cancer cells to all-trans retinoic acid is associated with a decrease in the basal level of nuclear receptor RAR α expression and induction of cytochrome CYP26A1 and CYP26B1 expression66

A.A. Musaelyan, S.V. Lapin, M.A. Urtenova, S.V. Odintsova, I.V. Chistyakov, A.M. Ulitin, N.T. Ismanbaev, A.L. Akopov, S.V. Orlov

Immunological markers for predicting the response to immunotherapy in non-small cell lung cancer80

E.Yu. Zlatnik, A.B. Sagakyants, I.A. Novikova, A.Yu. Maksimov, O.P. Shatova, S.A. Appolonova, N.E. Moskaleva, S.A. Rumyantsev, A.V. Shestopalov

Metabolism of tryptophan in non-small lung cancer patients with different effect of PD-1/PD-L1 inhibitors immunotherapy89

S.V. Saakyan, L.A. Katargina, E.B. Myakoshina, G.P. Zakharova, I.P. Khoroshilova–Maslova, A.M. Maibogin

Immunohistochemical study of uveal melanoma and its cellular microenvironment97

O.I. Kit, I.A. Kamaeva, I.B. Lysenko, I.A. Novikova, N.N. Timoshkina, N.V. Nikolaeva, Ya.S. Gaisultanova, N.Yu. Khamaneva, A.A. Pushkin

Primary mediastinal large B-cell lymphoma with a rare ALK gene mutation105

V.G. Isaeva, L.Y. Gritsova, L.P. Zhovtun, S.M. Samborsky, N.A. Falaleeva

Antitumor effect of recombinant interferon-gamma in an experimental model of Ehrlich's bilateral solid carcinoma111

INFORMATION FOR AUTHORS 120

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-10-22



Ассоциация рака молочной железы с онкогенными папилломавирусами: обнаружение ДНК папилломавирусов в клетках рака молочной железы

Г.М. Волгарева

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

Контакты: Галина Михайловна Волгарева galina.volgareva@ronc.ru

Рак молочной железы – одна из острейших проблем здравоохранения во всем мире. Заболеваемость им растет. Развитие этого злокачественного новообразования связано со многими факторами риска, однако первопричина заболевания в большинстве случаев остается невыясненной. Исследования, посвященные ассоциации рака молочной железы с онкогенными папилломавирусами, проводятся на протяжении трех десятилетий, но однозначного заключения по данной проблеме пока нет. Актуальность вопроса об ассоциации с этими вирусами рака молочной железы многократно возрастает с появлением профилактических вакцин против рака шейки матки: в случае, если такая ассоциация имеет место, становится реальной перспектива предупреждения также и этой чрезвычайно распространенной формы рака.

Ключевые слова: рак молочной железы, онкогенные вирусы папилломы человека, перспектива профилактики

Для цитирования: Волгарева Г.М. Ассоциация рака молочной железы с онкогенными папилломавирусами: обнаружение ДНК папилломавирусов в клетках рака молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2):10–22. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-10-22.

Breast cancer association with oncogenic papillomaviruses: papillomaviral DNA detection in breast cancer cells

G.M. Volgareva

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

Contacts: Galina Mikhailovna Volgareva galina.volgareva@ronc.ru

Breast cancer is the most acute worldwide healthcare problem. Its incidence is rising. Development of this malignant tumor is associated with many risk factor, however primary cause of the disease stays usually obscure. Researches into breast cancer association with oncogenic papillomaviruses have been conducted for three decades, yet there is no definite conclusion on the problem. Actuality of the issue of breast cancer association with these viruses increases many times with the development of prophylactic vaccines against cervical cancer: in case such association does occur realistic perspective appears to prevent this extremely widespread cancer as well.

Key words: breast cancer, oncogenic human papillomaviruses, prospect of prevention

For citation: Volgareva G.M. Breast cancer association with oncogenic papillomaviruses: papillomaviral DNA detection in breast cancer cells. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2022;9(2):10–22. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-10-22.

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) у женщин входит в «большую четверку» форм злокачественных опухолей, наиболее часто диагностируемых в мире (наряду с раком предстательной железы у мужчин, раком лег-

ких и раком толстой и прямой кишки у лиц обоего пола) [1]. В России в 2009 г. в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женщин РМЖ составил 20,1 %, в 2018 г. – 20,9 %; за период с 2008 по 2018 г. стандартизованный показатель заболеваемости

РМЖ в России на 100 тыс. населения вырос на 22,15 %. Рак молочной железы имеет наибольший удельный вес в структуре смертности от злокачественных новообразований женщин России: в 2009 г. эти случаи составили 17,4 %, в 2018 г. — 16,2 % [2, 3]. В 2020 г. рак грудной железы явился причиной смерти 21 634 россиян [4].

Факторы риска развития РМЖ активно изучаются; для уяснения причин, совершенствования профилактических подходов и методов лечения РМЖ признан целесообразным мультидисциплинарный подход [5–7].

Представление об участии вирусов в возникновении этой опухоли восходит к работам американского исследователя Дж. Биттнера, обнаружившего возбудитель РМЖ мышей (вирус Биттнера, «фактор молока») [8, 9]. На данной модели была установлена важность сочетания нескольких факторов в возникновении опухоли: вирусного начала, определенного генотипа мышей, их принадлежности к той или иной инбредной линии, а также гормонального фона животных. В дальнейшем и у человека было показано наличие вируса, аналогичного или родственного вирусам РМЖ мышей [10]. Получены данные об ассоциации РМЖ с вирусом Эпштейна–Барр [11, 12].

Признание вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска как канцерогенов, являющихся этиологическим фактором рака шейки матки (РШМ), было зафиксировано в пресс-релизе Всемирной организации здравоохранения в 1996 г. Этому способствовало обнаружение ДНК ВПЧ в большинстве исследованных образцов РШМ [13]. В дальнейшем пополнялся как перечень канцерогенных для человека типов ВПЧ, так и перечень форм рака, которые они вызывают [14–16]. Вирусы папилломы человека двух типов, 16-го и 18-го, обнаруживаются в ~70 % образцов РШМ; признаны канцерогенами для человека также ВПЧ следующих типов: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59-го; для нескольких типов ВПЧ (26, 53, 66, 67, 68, 70, 73, 82-го) получены ограниченные свидетельства их канцерогенности (possibly carcinogenic или probably carcinogenic); ВПЧ6 и ВПЧ11 оценены как вирусы низкого онкогенного риска [16].

Рак молочной железы отнесен к категории опухолей, для которых данных о выводе «ассоциирован с вирусами папилломы» недостаточно (inadequate evidence) [14].

Строение, биологический цикл, механизм опухолеродного действия представителей этого семейства вирусов описаны ранее [17]. Приведем основные данные о ВПЧ, нужные для анализа их роли в возникновении РМЖ.

Вирусы папилломы — группа эпителиотропных видоспецифичных вирусов, объединенных в семейство *Papillomaviridae*. Вирусные частицы размером 50–60 нм в диаметре содержат ДНК, заключенную в белковый капсид. Таксономия вирусов папилломы основана

на генетическом принципе — на степени несовпадения нуклеотидной последовательности в наиболее консервативной области их генома — гене *L1*. Наибольшее внимание исследователи уделяют именно папилломавирусам человека, которые и составляют большинство среди известных папилломавирусов — более 120. ВПЧ подразделяют на 5 родов. Вирусы папилломы человека из рода α инфицируют преимущественно слизистые оболочки ротовой полости и аногенитальной сферы; все известные на сегодня канцерогенные ВПЧ относятся именно к роду α . Геном ВПЧ представлен кольцевой двуспиральной молекулой ДНК размером около 8 т. п.н., он содержит 3 области: 1) длинную регуляторную область с последовательностями, ответственными за контроль репликации и транскрипции вируса; 2) раннюю (early, *E*) область, включающую открытые рамки считывания генов *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* и *E7*, необходимые вирусу для осуществления «ранних», не связанных с продукцией зрелых вирусных частиц, функций, таких как репликация и транскрипция вирусного генома, а также придание инфицированной клетке черт злокачественности у канцерогенных ВПЧ, и 3) позднюю (late, *L*) область, кодирующую структурные белки *L1* и *L2* вирусного капсида. Основным путем заражения ВПЧ — непосредственный контакт поврежденного (имеющего трещинку, ранку) эпителия с зараженными ВПЧ эпителиальными клетками. Для трансформации инфицированной клетки необходима длительная ВПЧ-инфекция и постоянная экспрессия вирусных онкобелков *E6* и *E7*. Активности белковых продуктов генов *E6* и *E7* у ВПЧ разных типов различаются; эти различия, сложившиеся в ходе эволюции, и обусловили разделение ВПЧ на типы «низкого» и «высокого» онкогенного риска. Для онкогенных ВПЧ установлена положительная корреляция между показателем «вирусная нагрузка» (количеством вирусных геномов на зараженную клетку) и степенью опасности прогрессии вызванной вирусом дисплазии в рак. Небольшие короткоживущие вирусные онкобелки *E6* и *E7* ВПЧ типов высокого риска способны связываться со многими белками клетки-хозяина и нарушать их функционирование [18]. Главными являются следующие эффекты. Онкобелок *E7* взаимодействует с супрессором опухолевого роста, известным как белок ретинобластомы — pRB, который регулирует активность транскрипционных факторов семейства E2F. *E7*, связываясь с pRB, вызывает его разрушение. В результате этого клетки беспрепятственно преодолевают точку рестрикции G1/S клеточного цикла [19]. Онкобелок *E6* взаимодействует с супрессором опухолевого роста p53, что ведет к быстрому разрушению p53 [20]. Онкобелок *E6* активирует транскрипцию каталитической субъединицы теломеразы hTERT [18]. Тем самым клетка получает возможность дотраивать теломерные районы хромосом и становится «бессмертной». Оба онкобелка, *E6* и *E7*, резко повышают нестабильность генома клетки-хозяина [18; 21]. Это достигается несколькими

способами. Во-первых, в p53-дефектной клетке нарушаются процессы репарации генома, возрастает частота генных мутаций. Во вторых, благодаря способности онкобелка E7 нарушать удвоение центриолей в зараженном эпителии появляются многополюсные митозы и анеуплоидные клетки.

Первое сообщение о возможной ассоциации РМЖ с ВПЧ было опубликовано в 1992 г. А. Di Lonardo и соавт. [22]

В дальнейшем исследователи из разных стран получили данные о ВПЧ-положительности РМЖ, однако, как станет понятно из дальнейшего, считать этот вопрос вполне ясным несколько преждевременно. После создания эффективных вакцин для профилактики РШМ актуальность уточнения роли ВПЧ типов высокого онкогенного риска в генезе РМЖ дополнительно возросла ввиду наметившейся возможности профилактики этой распространенной формы рака [23].

Цель настоящего обзора — анализ современного состояния вопроса об ассоциации РМЖ с онкогенными ВПЧ.

ОБНАРУЖЕНИЕ ДНК ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА В РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Проведенный нами анализ данных о детекции ДНК ВПЧ в РМЖ основан на 34 публикациях. Работы, которые принимались к рассмотрению, должны были содержать четкое описание использованных клинических материалов и методов выявления ВПЧ. Результаты детекции ДНК ВПЧ в РМЖ представлены в табл. 1. Был учтен тот факт, что типы онкогенных ВПЧ в цервикальном эпителии, нормальном и диспластическом, в разных регионах мира несколько различны [24]. Допуская, что этногеографическая неоднородность может проявиться и в случаях инфицирования ВПЧ тканей молочных желез, мы указали страны, где были выполнены работы.

Частота обнаружения ДНК ВПЧ в образцах РМЖ варьирует от полного отсутствия вирус-положительных образцов [25–27] до половины и более таких случаев [28–35]. Сопоставление частоты обнаружения ДНК ВПЧ в разных работах представляется не вполне правомерным. На результат могут влиять такие факторы, как размер выборки; использование ткани РМЖ, полученной и криоконсервированной непосредственно после биопсии/хирургической операции или после обработки ее формалином и заключения в парафин; особенности метода детекции ВПЧ, в частности, его чувствительность, количество типов ВПЧ, на выявление которых метод настроен. Во всех исследованиях, включая те, где ВПЧ-положительные случаи РМЖ выявлены не были, контролировали качество выделенной клеточной ДНК — в ПЦР с праймерами к β -глобиновому гену [25, 27] или спектрофотометрически [26]; образцы с неудовлетворительным качеством ДНК исключали из дальнейших экспериментов.

Детекцию генетического материала ВПЧ в образцах РМЖ чаще всего проводили в ПЦР с консенсусными праймерами к консервативной области генома ВПЧ, рамке *L1*, парой праймеров — GP5/6 или MY09/11, что позволяло обнаруживать присутствие ВПЧ разных типов [14]. Две пары праймеров в этом случае позволяли проводить гнездовую ПЦР. Нередко использовали и видоспецифичные праймеры к рамкам *E6*, *E7* и др.

О значении выбора теста для детекции ВПЧ свидетельствует следующий пример. А. Di Lonardo и соавт. с помощью ПЦР выявили ДНК ВПЧ в 29,4 % образцов РМЖ; у некоторых из пациенток ВПЧ присутствовал также в подмышечных лимфатических узлах, что указывало на начавшееся метастазирование [22]. Однако при попытке подтвердить полученный результат методом гибридизации *in situ* авторы не обнаружили ДНК ВПЧ ни в одном образце.

Чувствительность используемых методов детекции ДНК ВПЧ и непосредственный лабораторный опыт исследователей (proficiency) остаются, по-видимому, одним из важнейших источников столь значительных колебаний регистрируемых разными авторами частот ВПЧ-положительных образцов РМЖ; разработка методов детекции многочисленных типов ВПЧ, которые позволяли бы получать в разных лабораториях сопоставимые результаты, а также совершенствование этих методов остаются актуальными задачами [36, 37]. Косвенно значительные колебания частот ВПЧ-положительных случаев РМЖ в работах, выполненных в одной и той же стране (например, [26, 35] и [27, 38, 39]), дают основание считать, что не этногеографическая неоднородность РМЖ, но именно методические моменты явились тому причиной.

Идущее параллельно развитие геномики и эпидемиологии ВПЧ, помимо совершенствования собственно методов их детекции, не может не влиять на ход изучения ассоциации РМЖ с ВПЧ; в результате углубляются представления о механизмах ВПЧ-индуцированного канцерогенеза: «от эволюционно-статичной сущности к представлению о тысячах уникальных вирусных геномов с различным канцерогенным потенциалом»; так, для наиболее подробно изученного ВПЧ16, вызывающего не менее 50 % всех случаев РШМ в мире, известные на сегодня варианты нуклеотидного разнообразия сведены к 4 основным линиям и 16 сублиниям, каждой из которых соответствуют свои особенности взаимодействия вирус — хозяин, тканевого тропизма, процессов сплайсинга и трансляции [40]. Новые данные о нуклеотидном разнообразии ВПЧ учитываются при доработке методов детекции этих вирусов.

Установлен факт коинфекции образцов РМЖ одновременно несколькими ВПЧ разных типов (табл. 2).

Ряд исследовательских групп провели детекцию вирусной ДНК на неслучайных выборках РМЖ, исследуя только те случаи, когда:

- в нормальных и раковых клетках молочной железы пациенток при предварительном гистологическом

Таблица 1. Результаты попыток обнаружения ДНК вируса папилломы человека в образцах рака молочной железы

Table 1. Data of human papillomaviruses DNA detection attempts in breast cancer samples

Страна Country	Число образцов, <i>n</i> Number of samples, <i>n</i>	Методы детекции Methods of detection	ВПЧ+-образцы, % HPV+ samples, %	Основной тип ВПЧ Predominant HPV type	Источник Reference
Италия Italy	17	ПЦР PCR	29,4	16-й HPV-16	[22]
Великобритания Great Britain	80	ПЦР PCR	0	—	[25]
Норвегия Norway	41	ПЦР, гибридизация <i>in situ</i> PCR, <i>in situ</i> hybridization	46,0	16-й HPV-16	[41]
Китай China	32	ПЦР, Саузерн-блоттинг PCR, Southern blotting	43,8	33-й HPV-33	[42]
Австрия Austria	11	ПЦР PCR	63,6	16-й HPV-16	[28]
США USA	101	ПЦР, секвенирование PCR, sequencing	24,8	16-й HPV-16	[43]
Германия Germany	29	ПЦР, гибридизация <i>in situ</i> PCR, <i>in situ</i> hybridization	86,2	11-й (16 и 66-й — в единичных случаях) HPV-11 (HPV-16 and HPV-66 in rare cases)	[29]
Греция Greece	107	ПЦР, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов PCR, restriction fragment length polymorphism	15,9	16-й HPV-16	[44]
Турция Turkey	50	ПЦР PCR	74,0	33-й HPV-33	[30]
Венгрия Hungary	1	Гнездовая ПЦР, гибридизация <i>in situ</i> Nested PCR, <i>in situ</i> hybridization	Единственный образец ВПЧ+ One HPV+ case	18, 33-й HPV-18, HPV-33	[31]
Сирия Syria	113	ПЦР PCR	61,1	33-й HPV-33	[32]
Япония Japan	124	ПЦР, ПЦР в реальном времени, секвенирование PCR, real-time PCR, sequencing	21,0	16-й HPV-16	[45]
Австралия Australia	28	ПЦР, ПЦР <i>in situ</i> , секвенирование PCR, <i>in situ</i> PCR, sequencing	28,6	18-й HPV-18	[46]
Мексика Mexico	67	ПЦР, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, секвенирование PCR, restriction fragment length polymorphism, sequencing	4,4	16, 18, 33-й HPV-16, HPV-18, HPV-33	[47]
Мексика Mexico	20	ПЦР, ПЦР в реальном времени PCR, real-time PCR	40	16-й HPV-16	[48]
Индия India	228	ПЦР, ПЦР в реальном времени PCR, real-time PCR	0	Определяли только 16-й и 18-й Only HPV-16 and HPV-18 were tested	[26]
Венесуэла Venezuela	24	ПЦР PCR	41,7	51-й HPV-51	[49]
Австралия Australia	80	Гнездовая ПЦР, секвенирование Nested PCR, sequencing	16	18-й HPV-18	[50]

Окончание табл. 1

The end of table 1

Страна Country	Число образцов, <i>n</i> Number of samples, <i>n</i>	Методы детекции Methods of detection	ВПЧ+-образцы, % HPV+ samples, %	Основной тип ВПЧ Predominant HPV type	Источник Reference
Корея Korea	106	ПЦР в реальном времени Real-time PCR	17,9	51-й HPV-51	[51]
Испания Spain	251	ПЦР, типирование на микрочипах PCR, microchip typing	51,8	16-й HPV-16	[33]
Китай China	81	Метод гибридного захвата (HC2) Hybrid Capture 2 (HC2)	17,3	13 типов онкогенных ВПЧ суммарно 13 types of oncogenic HPV in total	[52]
Таиланд Thailand	350	ПЦР, типирование в ИФА PCR, typing with ELISA	4,3	16-й HPV-16	[53]
Иран Iran	150	ПЦР PCR	0	—	[27]
Иран Iran	72	ПЦР, типирование на коммерческом наборе PCR, typing with a commercial set	48,6	18, 16, 33-й в порядке убывания HPV-18, HPV-16, and HPV-33 in descending order	[38]
Иран Iran	59	Гнездовая ПЦР, ПЦР в реальном времени, секвенирование Nested PCR, real-time PCR, sequencing	11,8	18-й HPV-18	[39]
Дания Denmark	193	ПЦР на коммерческих наборах PCR with commercial kits	1,55	16-й HPV-16	[54]
Марокко Marocco	76	Мультиплексная ПЦР Multiplex PCR	25,0	11-й; по 1 случаю — 51, 58 и 59-й HPV-11; HPV-51, HPV-58, and HPV-59 — one case each	[55]
Бразилия Brazil	103	ПЦР, секвенирование PCR, sequencing	49,5	6, 11-й, реже — 18 и 33-й HPV-6, HPV-11; rarely HPV-18 and HPV-33	[56]
Италия Italy	273	Гибридизация <i>in situ</i> <i>In situ</i> hybridization	44,4	16-й HPV-16	[57]
Катар Qatar	50	Мультиплексная ПЦР Multiplex PCR	10,0	16 и 35-й HPV-16 and HPV-35	[58]
Польша Poland	383	Гнездовая ПЦР, типирование на коммерческом наборе Nested PCR, typing with a commercial set	4,4	16-й HPV-16	[59]
Австралия Australia	855	Секвенирование нового поколения, ПЦР, ПЦР <i>in situ</i> , ПЦР в реальном времени Next generation sequencing, PCR, <i>in situ</i> PCR, real-time PCR	5,9	18-й HPV-18	[60]
Австралия Australia	28	Гнездовая ПЦР, ПЦР <i>in situ</i> , ПЦР в реальном времени, секвенирование Nested PCR, <i>in situ</i> PCR, real-time PCR, sequencing	78,6	18-й HPV-18	[34]
Индия India	272	ПЦР, Саузерн-блоттинг, мультиплексная ПЦР PCR, Southern blotting, multiplex PCR	63,9	16, 18, 33-й в порядке убывания HPV-16, HPV-18, and HPV-33 in descending order	[35]

Примечание. ПЦР — полимеразная цепная реакция; ИФА — иммуноферментный анализ; ВПЧ — вирус папилломы человека.
Note. PCR — polymerase chain reaction; ELISA — enzyme-linked immunosorbent assay; HPV — human papillomavirus.

Таблица 2. Коинфекция рака молочной железы вирусами папилломы человека (ВПЧ) нескольких типов

Table 2. Breast cancer coinfection with several human papillomaviruses (HPV) types

Страна Country	Число образцов с несколькими типами ВПЧ / с ВПЧ всех типов Number of samples with several HPV types / all HPV+ samples	Основной тип ВПЧ, обнаруженный при коинфицировании Predominant HPV types in coinfection	Источник Reference
США USA	1/25	16, 18-й HPV-16, HPV-18	[43]
Германия Germany	8/25	6, 11, 16-й HPV-6, -11, -16	[29]
Греция Greece	3/17	16, 58, 59, 73, 82-й HPV-16, -58, -59, -73, -82	[44]
Сирия Syria	24/69	16, 18, 31, 33, 35-й HPV-16, -18, -31, -33, -35	[32]
Корея Korea	10/22	6, 33, 51, 53, 58-й HPV-6, -33, -51, -53, -58	[51]
Испания Spain	85/130	16, 31, 39, 51, 59-й HPV-16, -31, -51, -59	[33]
Таиланд Thailand	4/15	16, 35, 18, 33, 52-й HPV-16, -35, -18, -33, -52	[53]
Марокко Morocco	8/19	6, 11, 52, 58, 59-й HPV-6, -11, -52, -58, -59	[55]
Катар Qatar	2/5	16, 35, 58-й HPV-16, -35, -58	[58]
Индия India	44/174	16, 18, 33-й HPV-16, -18, -33	[35]

исследовании обнаруживались койлоциты (клетки плоского эпителия, ядро и цитоплазма которых претерпели ряд деформаций в результате продуктивной ВПЧ-инфекции — признанный цитологический маркер папилломавирусной инфекции в эпителии шейки матки [61]); именно так проведено исследование Е.М. de Villiers и соавт. [29];

- диагнозу РМЖ предшествовала тяжелая дисплазия шейки матки (CINIII) [34, 41];
- РМЖ развился у женщин, ранее проходивших лечение по поводу карциномы шейки матки *in situ* [31] или инвазивного РШМ [28].

Папилломавирус-положительные образцы РМЖ в этих выборках оказались особенно частыми: 86,2 % [29] (здесь преобладали ВПЧ низкого онкогенного риска), 46,0 % [41], 78,6 % [34], ВПЧ-положителен единственный исследованный образец [31], 63,6 % [28]. Авторы отметили совпадение типов ВПЧ в РМЖ с типами вирусов в диспластическом и раковом эпителии шейки матки, что послужило основанием для нетривиальной гипотезы о распространении ВПЧ по организму женщины [28, 31, 34, 41].

В случае инвазивного РМЖ предпринимались попытки детекции ДНК ВПЧ помимо первичного опухолевого очага также в регионарных лимфатических узлах и/или метастазах РМЖ в отдаленные органы [22, 28, 41]. Как упоминалось выше, А. Di Lonardo и соавт.

обнаружили ДНК ВПЧ16 в подмышечных лимфатических узлах 2 из 5 больных, у которых этот вирус присутствовал в инвазивном РМЖ [22]. Е.М. Henning и соавт. выявили ВПЧ16 в регионарных метастазах 4 из 7 больных с ВПЧ-положительным первичным РМЖ; у 1 из этих больных ВПЧ16 был обнаружен также в отдаленном метастазе в толстом кишечнике; ни в одном случае ДНК ВПЧ не была выявлена в метастазах тех 13 больных, у которых в первичной опухоли ДНК ВПЧ отсутствовала [41]. ДНК ВПЧ16 в подмышечных лимфатических узлах 2 больных РМЖ, у которых ВПЧ16 был выявлен в первичном узле опухоли, обнаружили А. Widschwendter и соавт. [28].

Несколько исследовательских групп провели детекцию ВПЧ, помимо образцов РМЖ, также в контроле — в нормальной ткани молочной железы здоровых женщин, полученной при косметологических операциях по уменьшению молочных желез (табл. 3).

ДНК онкогенных ВПЧ (18-го и 35-го типов) была обнаружена в нормальных тканях молочных желез в 4 из 5 таких работ. Во всех этих исследованиях ВПЧ-положительные образцы нормальной ткани молочной железы были обнаружены с меньшей частотой, чем ВПЧ-положительные случаи РМЖ (24,8 %; 28,6 %; 48,6 %; 49,5 % и 10,0 % соответственно) (см. табл. 1). При этом преобладающие типы ВПЧ совпали с теми, которые были выявлены в раковых образцах.

Таблица 3. Результаты детекции ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) в нормальной ткани молочной железы здоровых женщин

Table 3. Data of human papillomaviruses (HPV) DNA detection in normal mammary gland tissue of healthy women

Страна Country	Число образцов, <i>n</i> Number of samples, <i>n</i>	ВПЧ+-образцы, % HPV+ samples, %	Основной тип ВПЧ Predominant HPV type	Источник Reference
США USA	20	0	—	[43]
Австралия Australia	17	18,0	18-й HPV-18	[46]
Иран Iran	31	16,1	18-й HPV-18	[38]
Бразилия* Brazil*	95	15,8	6, 11, 18-й HPV-8, -11, -18	[56]
Катар Qatar	50	8,0	35-й HPV-35	[58]

*Не для всех ВПЧ-положительных образцов удалось определить тип вируса.

*It was not possible to determine the type of HPV in every sample.

В качестве референс-групп (условного контроля) некоторые исследователи использовали также условно-нормальную ткань молочной железы, соседствующую с РМЖ (табл. 4), или ткань молочной железы, удаленную при хирургических операциях по поводу незлокачественных заболеваний, таких как мастопатия, фиброаденома, липома (табл. 5).

В условно-нормальных тканях молочных желез, прилегающих к РМЖ, как и в нормальном эпителии молочных желез здоровых женщин, ВПЧ обнаруживался нередко (см. табл. 4). Однако во всех исследованиях в этих образцах он выявлялся реже, чем в прилегающем РМЖ (86,2 %; 74,0 % и 63,9 % соответственно) (см. табл. 1). Типы ВПЧ в этих тканях в целом не отличались от обнаруженных теми же авторами в РМЖ.

При детекции ВПЧ16 в неопухолевой ткани молочной железы, соседствующей с РМЖ, в случае, когда опухоль была ВПЧ-положительной, ВПЧ-положительными оказались также 7 из 11 изученных образцов условно-нормальной ткани; в случае, когда РМЖ был ВПЧ-отрицательным, вирусная ДНК не была обнаружена ни в одном из 11 проанализированных образцов прилегающей к опухоли ткани [45].

ДНК ВПЧ была обнаружена и в некоторых образцах патологически измененного незлокачественного эпителия молочных желез (табл. 5). Частоты ВПЧ-положительных доброкачественных новообразований молочных желез ни в одной из работ не превысили аналогичный показатель для РМЖ: 24,8 %; 16,0 %; 51,8 %; 4,3 %; 0 %; 11,8 %; 25,0 %; 10,0 %; 63,9 % соответственно (см. табл. 1). Типы обнаруженных ВПЧ

Таблица 4. Результаты детекции ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) в условно-нормальной ткани молочной железы больных раком молочной железы

Table 4. Data of human papillomavirus (HPV) DNA detection in conventionally normal tissue of breast cancer patients

Страна Country	Число образцов, <i>n</i> Number of samples, <i>n</i>	ВПЧ+-образцы, % HPV+ samples, %	Основной тип ВПЧ Predominant HPV type	Источник Reference
Германия Germany	29*	70,0	11, 6, 16-й HPV-11, -6, -16	[29]
Турция Turkey	50	32,0	33, 18-й HPV-33, HPV-18	[30]
Индия India	21	9,5	16-й HPV-16	[35]

*Неслучайная выборка: наличие койлоцитов в образцах.

*Not a random sampling: presence of coilocytes in the samples.

Таблица 5. Результаты детекции ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) в незлокачественных новообразованиях молочной железы

Table 5. Data of papillomaviruses (HPV) DNA detection in non-malignant neoplasms of mammary gland

Страна Country	Число образцов, <i>n</i> Number of samples, <i>n</i>	ВПЧ+-образцы, % HPV+ samples, %	Основной тип ВПЧ Predominant HPV type	Источник Reference
США USA	21	0	—	[43]
Австралия Australia	10	10,0	18-й HPV-18	[50]
Испания Spain	186	26,3	16-й HPV-16	[33]
Таиланд Thailand	350	2,9	16-й HPV-16	[53]
Иран Iran	150	0	—	[27]
Иран Iran	11	0	—	[39]
Марокко Morocco	12	8,3	5-й (неонкогенный, род β) HPV-5 (non-oncogenic, genus β)	[55]
Катар Qatar	50	8,0	35	[58]
Индия India	10	30,0	16	[35]

в целом и в этих выборках соответствовали тем типам, которые исследователи выявляли в РМЖ.

СТАТУС ГЕНОМА ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА В РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Наряду с эписомальными формами в РМЖ обнаружены также ВПЧ в формах, интегрированных в геном хозяйской клетки [35, 38]. Для установления этого факта исследователи определяли разрыв рамки считывания *E2* вирусного генома. Исходным служило представление о том, что в случае трансформации эпителия шейки матки интеграция генома вируса в хозяйскую хромосому происходит на определенной стадии прогрессии дисплазии в РШМ; точка 3'-разрыва вирусного генома может варьировать в разных новообразованиях, но приходится обычно на область *E1-E2*, после чего рамка *E2* не обнаруживается в ПЦР; усиливается транскрипция вирусных онкогенов *E6* и *E7*, а присутствие генома ВПЧ в интегрированной форме может служить прогностическим маркером развития рака из конкретной дисплазии, тогда как очень многие из дисплазий регрессируют [62–65].

В подавляющем большинстве случаев геном ВПЧ присутствовал в РМЖ в интегрированной форме. Так, S. Islam и соавт., определяя соотношения числа копий *E2/E6*, установили, что среди 120 ВПЧ-положительных образцов РМЖ случаи с интегрированным ВПЧ составили 87,5 %, смешанные случаи — интегрированный-эписомальный рак — 8,3 %, а случаи с исключительно эписомальными формами — 4,2 % [35]. N. Khodabandehlou и соавт., определяя долю экспрессирующих *E6* образцов, в которых экспрессировался также и *E2*, среди 35 ВПЧ-положительных образцов охарактеризовали 86 % образцов как случаи с исключительно интегрированным геномом ВПЧ, а остальные 14 % — как смешанный вариант [38].

Биологический смысл интеграции генома ВПЧ в геном клетки-хозяина до настоящего времени дискутируется: в частности, остается открытым вопрос о том, является ли интеграция необходимым условием злокачественного превращения клетки, или она только сопутствует малигнизации. В эпителии шейки матки сайты интеграции оказались весьма многочисленными и неслучайными — они тяготеют к областям, где находятся гены, к сайтам ломкости хромосом, к энхансерам, к транскрипционно активным районам [66]. Очевидно, что интеграция генома ВПЧ в геном клетки влияет на экспрессию генов, как вирусных, так и хозяйских; при этом возрастает нестабильность хозяйского генома. Интеграция генома ВПЧ в хозяйские хромосомы описана помимо РШМ также и в других формах рака, для которых вовлеченность этих вирусов в канцерогенез установлена [67–69].

ВИРУСНАЯ НАГРУЗКА В ПАПИЛЛОМАВИРУС-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Количество геномов ВПЧ в вирус-положительных тканях РМЖ (так называемую вирусную нагрузку) определили методом ПЦР в реальном времени нес-

колько исследовательских групп [35, 45, 48]. Значения этого показателя составили от 5,4 до 6,5 копий генома ВПЧ на 10 тыс. клеток [35, 45]. Для редкого метапластического ВПЧ-положительного РМЖ вирусная нагрузка оказалась выше — 204,03 копии на 10 000 клеток (в метапластической карциноме с хондронидной дифференцировкой) и 10152,11 копий на 10 000 клеток (в метапластической карциноме с плоскоклеточной дифференцировкой), среднее значение — 2089,2 копии на 10 000 клеток [48].

Для послужившего в качестве положительного контроля РШМ данный показатель был равен 130 480 копий генома ВПЧ на 10 000 клеток [45]. В ВПЧ16-положительной клеточной линии SiHa, полученной из РШМ, вирусная нагрузка была равна 39 850 копий ВПЧ на 10 000 клеток [48]. В этих 2 случаях на каждую клетку приходится, таким образом, не менее 1 копии вирусного генома, что достаточно для поддержания злокачественного фенотипа. Обращает на себя внимание тот факт, что в ВПЧ-положительном РМЖ вирусная нагрузка оказалась значительно меньшей, чем 1 копия вируса на клетку. Поскольку РМЖ рассматривается как опухоль моноклональной природы и единственная интегрированная в хозяйский геном копия ВПЧ не должна исчезнуть в ходе репликации опухолевых клеток, можно было бы ожидать присутствия хотя бы единственной копии ВПЧ в каждой опухолевой клетке. Низкая ВПЧ-нагрузка в РМЖ трактуется исследователями по-разному: как основание считать, что ВПЧ не играет существенной роли в возникновении РМЖ [45], или как свидетельство в пользу того, что ВПЧ в развитии РМЖ играет иную роль, чем в цервикальном канцерогенезе, например, что они могут проникать в ткань молочной железы, в которой процесс злокачественного превращения уже начался, на ранних доклинических стадиях этого процесса, и влиять на его течение [35, 48].

Низкая вирусная нагрузка в ВПЧ-положительных образцах РМЖ — повод усомниться в участии онкогенных папилломавирусов в генезе данной опухоли. Оказалось, что устранению этих сомнений в значительной степени способствуют результаты изучения фермента ДНК цитидиндезаминазы АРОВЕС3В (А3В) в РМЖ и влияния канцерогенных ВПЧ на экспрессию этого фермента [70, 71].

Для возникновения РМЖ необходимы соматические мутации, в спектре которых резко преобладают транзиции С → Т. Согласно результатам исследования M. V. Burns и соавт. (2013), вероятным источником этих мутаций при РМЖ является ДНК цитидиндезаминаза АРОВЕС3В (А3В). Содержание матричной РНК А3В в многочисленных клеточных линиях из РМЖ, а также в клетках первичного РМЖ превышало контрольный показатель (в качестве контроля использовали ткани молочных желез, полученные при косметических операциях) не менее чем в 3 раза в 28 из 38 линий, а в 12 из 38 — в 10 раз и более. Опухоли,

характеризовавшиеся высокими уровнями мРНК АЗВ, имели вдвое больше мутаций, чем опухоли с низким ее уровнем. Эндогенная АЗВ была единственным источником редактирующей активности $C \rightarrow T$ в экстрактах из клеточных линий РМЖ. При индукции повышения экспрессии АЗВ наблюдались сбой клеточного цикла, клеточная гибель, фрагментация ДНК, учащение транзиций $C \rightarrow T$ и другие нарушения. На основании полученных результатов авторы предложили модель, согласно которой катализируемое АЗВ дезаминирование создает постоянный источник повреждений ДНК в клетках РМЖ, в результате чего происходит селекция инактивированного TP53; модель объясняет, почему некоторые опухоли прогрессируют очень быстро и становятся гетерогенными [70].

К. Ohba и соавт. (2014) проверили, могут ли онкогенные ВПЧ явиться инициаторами канцерогенеза в молочной железе, вызывая гиперэкспрессию АЗВ, и, таким образом, быть недостающим звеном между ВПЧ и развитием РМЖ. Используя нормальные клетки эпителия молочной железы, трансфицированные ВПЧ18, авторы наблюдали гиперэкспрессию мРНК цитидиндезаминазы АРОВЕСЗВ (АЗВ). По сравнению с уровнем экспрессии в исходных клетках молочной железы, не содержащих генома ВПЧ18, в этой системе присутствие вирусного генома приводило к усилению экспрессии АЗВ в 2,5 раза. При этом экспрессия остальных цитидиндезаминаз была подавлена, таким образом, усиление экспрессии АЗВ было специфическим. Гиперэкспрессия АЗВ в клетках молочной железы, трансфицированных ВПЧ18, сопровождалась повышением нестабильности генома (показано с помощью метода ДНК-комет); этот эффект подавлялся с помощью малых РНК, образующих шпильки (shRNA) к *E6* и *E7* ВПЧ18, а также к АЗВ (нокдаун фиксировали в количественном ПЦР с обратной транскрипцией). Получив эти результаты *in vitro*, авторы исследовали уровень экспрессии АЗВ в ВПЧ18 — положительных и отрицательных образцах РМЖ. Тенденция, описанная ими *in vitro*, прослеживалась и в этом случае. В целом полученные результаты были интерпретированы авторами как аргумент в пользу вовлечения ВПЧ в канцерогенез молочной железы на ранних стадиях этого процесса [71]. В связи с этим заслуживает упоминания наблюдение J.S. Lawson и соавт., сделанное этими авторами при проведении иммуногистохимических тестов с использованием антител к *E7* ВПЧ18. Авторы предварительно отобрали группу женщин, у которых при диагнозе РМЖ в истории болезни раньше значилось доброкачественное новообразование молочной железы. Сравнивали, имея тканевые образцы как рака, так и предшествующего доброкачественного новообразования каждой женщины из данной группы, экспрессию *E7* в этих двух образцах. У больных РМЖ экспрессия данного вирусного онкобелка в раковой опухоли в ряде случаев была выражена значительно слабее, чем в предшествовавшем доброкаче-

ственном новообразовании молочной железы той же больной, а у некоторых больных в образцах РМЖ он вообще отсутствовал [60].

Роль онкогенных ВПЧ в генезе РМЖ, по-видимому, имеет принципиальные отличия от той роли, которую эти вирусы играют в случае цервикального канцерогенеза: здесь не требуется постоянного присутствия и экспрессии генома вируса. В молочной железе ВПЧ реализует свои активности на ранних этапах; индуцируемая им активация АРОВЕСЗВ ведет к геномной нестабильности.

ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПАПИЛЛОМАВИРУС-ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Больные РМЖ, опухолевая ткань которых содержала ДНК канцерогенных ВПЧ, при первичном выявлении заболевания были достоверно моложе тех больных, чья опухоль оказалась ВПЧ-отрицательной. Так, по результатам С. Kroupis и соавт., исследовавших выборку, где выявлялся преимущественно ВПЧ16, пациентки с ВПЧ-положительным РМЖ имели средний возраст 38 лет (35–51 год), тогда как женщины с ВПЧ-отрицательным — 53 года (44–63 года) ($p = 0,001$) [44]. J.S. Lawson и соавт. проанализировали группу больных РМЖ из Австралии, у которых ранее была диагностирована дисплазия шейки матки [34]. У таких больных был зафиксирован достоверно более молодой возраст заболевания РМЖ по сравнению со средним для австралийской популяции возрастом выявления этого заболевания: 51 год по сравнению с 60 годами; РМЖ в этой неслучайной выборке развивался почти у каждой второй женщины, ВПЧ-положительными оказались 78,6 % образцов РМЖ, преобладающим и в цервикальном эпителии, и в РМЖ был ВПЧ18. Авторы упоминают в этой связи известную клиницистам возрастную бимодальность РМЖ, где более «молодой» рак характеризуется большей агрессивностью.

По результатам иммуногистохимических тестов С. Kroupis и соавт. ВПЧ-положительные опухоли слабее экспрессируют эстрогеновые рецепторы ($p < 0,009$) и активнее пролиферируют; различий в экспрессии прогестероновых рецепторов эти авторы не обнаружили ($p = 0,92$). Слабо дифференцированные (grade III) случаи преобладали среди ВПЧ-положительных РМЖ — 70,6 %; среди ВПЧ-отрицательных они составляли 33,3 %, различия между данными показателями достоверны: $p = 0,005$. Протоковый рак преобладал и среди ВПЧ-положительных, и среди ВПЧ-отрицательных РМЖ [44]. Имеются, однако, сообщения об отсутствии корреляций между ВПЧ-положительностью РМЖ, гистотипом опухоли и стадией заболевания [72].

S. Islam и соавт., применив метод Каплана—Майера, сообщили о худшем прогнозе нелеченого РМЖ, положительного по ДНК ВПЧ типов высокого риска, по сравнению с ВПЧ-отрицательными случаями ($p = 0,04$) [35]. Сходную тенденцию авторы проследили и для

леченых больных, однако здесь различия по выживаемости между ВПЧ-положительными и ВПЧ-отрицательными группами больных РМЖ оказались незначительными ($p = 0,13$).

В целом имеющиеся данные указывают на существование гистопатологических и клинических особенностей у РМЖ, положительного по ДНК канцерогенных ВПЧ. Поскольку количество работ на данную тему невелико, существование таких особенностей, очевидно, требует дополнительной проверки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вирусы папилломы человека типов высокого онкогенного риска обнаружены в РМЖ большинством исследователей. Нередкой является коинфекция клеток РМЖ онкогенными ВПЧ нескольких типов. У больных с ВПЧ-положительным РМЖ ДНК ВПЧ того же типа, что и в первичном очаге, обнаружена и в метастазах. Имеют место географические колебания преобладающих типов ВПЧ в РМЖ: так, в Европе, как правило, чаще встречается ВПЧ16, в Австралии — ВПЧ18, а ВПЧ33 — в Турции, Китае, Сирии. В качестве контроля в этих работах использованы ткани молочных желез здоровых женщин (материалы, полученные при пластических операциях), ткани незлокачественных новообразований молочных желез, а также соседствующие с опухолью условно-нормальные ткани молочных желез женщин, больных РМЖ. Онкогенные ВПЧ присутствуют и в этих тканях, частота ВПЧ-положительных образцов в этих случаях оказывается, как правило, меньшей, чем в соответствующей выборке РМЖ, а типы ВПЧ в карциномах и контрольных образцах не различаются.

У больных РМЖ в молочной железе иногда обнаруживаются так называемые койлоциты — морфологически измененные эпителиальные клетки, которые в случае ВПЧ-инфицирования эпителия шейки матки служат индикатором продуктивной вирусной инфекции. В тех работах, где образцы РМЖ предварительно отбирали на основании присутствия в них койлоци-

тов, доля ВПЧ-положительных случаев оказывалась особенно высокой. Авторы, проводившие детекцию ВПЧ в РМЖ у женщин, у которых ранее были диагностированы тяжелые дисплазии или карциномы шейки матки, также фиксировали высокую частоту ВПЧ-положительных образцов; тип ВПЧ в цервикальном новообразовании и в РМЖ обычно совпадал.

Геном онкогенных ВПЧ часто присутствует в ВПЧ-положительных образцах РМЖ в форме, интегрированной в геном клетки-хозяина. Интеграция ДНК ВПЧ типа высокого риска в хозяйский геном является этапом злокачественного превращения клеток эпителия шейки матки; этот феномен описан также для других форм рака, для которых установлена этиологическая роль ВПЧ.

Вирусная нагрузка в ВПЧ-положительных образцах РМЖ оказалась меньшей, чем в РШМ, — значительно менее одного генома вируса на клетку. Это обстоятельство дает основание предполагать, что в молочной железе ВПЧ типов высокого онкогенного риска играют роль, отличную от той, которую они выполняют при цервикальном канцерогенезе.

Имеются ограниченные данные, свидетельствующие о наличии корреляций между ВПЧ-положительностью РМЖ и гистологическими и клиническими особенностями опухоли. Проверку существования таких корреляций целесообразно продолжить.

Содержание понятия «вирус как этиологический фактор развития опухоли» подразумевает комплекс факторов: вирусный генетический материал регулярно обнаруживается в опухолевых клетках; клонированные вирусные гены в системах *in vitro* способны индуцировать злокачественную трансформацию клеток человека; вирусные гены регулярно экспрессируются в опухолевых клетках; у лиц с иммунодефицитами опухоли данной локализации развиваются достоверно чаще, чем у людей с полноценным иммунитетом. Настоящий обзор мы посвятили первой из перечисленных позиций.

Представляется целесообразным исследовать наличие ВПЧ в РМЖ у российских больных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394–424. DOI: 10.3322/caac.21492.
2. Злокачественные новообразования в России в 2009 году (заболеваемость и смертность). Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2011. 260 с. [Malignant neoplasms in Russia in 2009 (morbidity and mortality). Ed. by V.I. Chissov, V.V. Starinsky, G.V. Petrova. Moscow: FSBI “MNIOI named after P.A. Herzen” of the Ministry of Health of Russia, 2011. 260 p. (In Russ.)].
3. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2019. 250 с. [Malignant neoplasms in Russia in 2018 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, G.V. Petrova. Moscow: FSBI “MNIOI named after P.A. Herzen” of the Ministry of Health of Russia, 2019. 250 p. (In Russ.)].
4. Число умерших по причинам смерти в 2020 г. в Российской Федерации. Документ с сайта rosstat.gov.ru. [Deaths number by causes of death in 2020 in the Russian Federation. Document from the website rosstat.gov.ru. (In Russ.)].
5. McPherson K., Steel C.M., Dixon J.M. ABC of breast diseases. Breast cancer — epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000;321(7261):624–8. DOI: 10.1136/bmj.321.7261.624.

6. Jakesz R. Breast cancer in developing countries: challenges for multidisciplinary care. *Breast Care (Basel)* 2008;3(1):4–5. DOI: 10.1159/000115969.
7. Kohler B.A., Sherman R.L., Howlander N. et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2011. Featuring incidence of breast cancer subtypes by race/ethnicity, poverty, and state. *J Natl Cancer Inst* 2015;107(6): djv048. DOI: 10.1093/jnci/djv048.
8. Bittner J.J. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 1936;84(2172):162. DOI: 10.1126/science.84.2172.162.
9. Bittner J.J. Bertner Foundation Lecture: Studies on mammary cancer in mice and their implications for the human problem. *Tex Rep Biol Med* 1957;15(3):659–73.
10. Narley T., Mazzanti C.M., Melana S., Glenn W.K. Mouse mammary tumor-like virus (MMTV) is present in human breast tissue before development of virally associated breast cancer. *Infect Agent Cancer* 2017;12:1. DOI: 10.1186/s13027-016-0113-6.
11. Huo Q., Zhang N., Yang Q. Epstein-Barr virus infection and sporadic breast cancer risk: a meta-analysis. *PloS one* 2012;7(2):e31656. DOI: 10.1371/journal.pone.0031656.
12. Golrokh Mofrad M., Kazeminezhad B., Faghihloo E. Prevalence of Epstein-Barr virus (EBV) in Iranian breast carcinoma patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2020;21(1):133–7. DOI: 10.31557/APJCP.2020.21.1.133.
13. Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancer — a brief historical account. *Minireview. Virology* 2009;384(2):260–5. DOI: 10.1016/j.virol.2008.11.046.
14. IARC (International Agency for Research on Cancer, World Health Organization) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 90. Human Papillomaviruses. Lyon, 2007. 672 p.
15. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 64. Human Papillomaviruses. Lyon, 1995. 6 p.
16. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol.100. A review of human carcinogens. Part B. Biological agents. Lyon, 2011. Pp. 261–320.
17. Волгарева Г.М. Папилломавирусный канцерогенез. Основные достижения и некоторые проблемы. Ч. 1. Общие представления о папилломавирусах. Формы рака, ассоциированные с вирусами папилломы человека. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(1):6–12. [Volgarova G.M. Papillomaviral carcinogenesis. Major achievements and certain challenges. Part 1. General notions of papillomaviruses. Human papillomaviruses-associated cancers. Российский биотерапевтический журнал = Russian Biotherapeutic Journal (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-6-12.
18. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):690–8. PMID: 10793105. DOI: 10.1093/jnci/92.9.690.
19. Dyson N., Howley P.M., Münger K. et al. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243(4893):934–7. DOI: 10.1126/science.2537532.
20. Werness B.A., Levine A.J., Howley P.M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248(4951):76–9. DOI: 10.1126/science.2157286.
21. Duensing S., Lee L.Y., Duensing A. et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(18):10002–7. DOI: 10.1073/pnas.170093297.
22. Di Leonardo A., Venuti A., Marcante M.L. Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992;21(2):95–100. DOI: 10.1007/BF01836955.
23. Zur Hausen H. Papillomaviruses — to vaccination and beyond. *Biochemistry (Mosc)* 2008;73(5):498–503. DOI:10.1134/S0006297908050027.
24. Kombe A.J., Li B., Zahid A. et al. Epidemiology and burden of human papillomavirus and related diseases, molecular pathogenesis, and vaccine evaluation. *Front Public Health* 2021;8:552028. DOI: 10.3389/fpubh.2020.552028.
25. Wrede D., Luqmani Y.A., Coombes R.C., Vousden K.H. Absence of HPV 16 and 18 DNA in breast cancer. *Br J Cancer* 1992;65(6):891–4. DOI: 10.1038/bjc.1992.186.
26. Hedau S., Kumar U., Hussain S. et al. Breast cancer and human papillomavirus infection: no evidence of HPV etiology of breast cancer in Indian women. *BMC Cancer* 2011;11:27. DOI: 10.1186/1471-2407-11-27.
27. Bakhtiyarizadeh S., Hosseini S.Y., Yaghobi R. et al. Almost complete lack of human cytomegalovirus and human papillomaviruses genome in benign and malignant breast lesions in Shiraz, southwest of Iran. *Asian Path J Cancer Prev* 2017;18(12):3319–24. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.12.3319.
28. Widschwendter A., Brunhuber T., Wiedemair A. et al. Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history. *J Clin Virol* 2004;31(4):292–7. DOI: 10.1016/j.jcv.2004.06.009.
29. De Villiers E.-M., Sandstrom R.E., zur Hausen H., Buck C.E. Presence of papillomavirus sequences in condylo-matous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res* 2005;7(1):R1–11. DOI: 10.1186/bcr940.
30. Gumus M., Yumuk P., Salepci T. et al. HPV DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients' normal and tumoral tissue samples. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25(4):515–21.
31. Kulka J., Kovalzsky I., Svastics E. et al. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the breast: not Epstein-Barr virus, but human papilloma virus-positive. *Hum Pathol* 2008;39(2):298–301. DOI: 10.1016/j.humpath.2007.08.006.
32. Akil N., Yasmeen A., Kassab A. et al. High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: a tissue microarray study. *Br J Cancer* 2008;99(3):404–7. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604503.
33. Delgado-Garcia S., Martinez-Escoriza J.-C., Alba A. et al. Presence of human papillomavirus DNA in breast cancer: a Spanish case-control study. *BMC Cancer* 2017;17(1):320. DOI: 10.1186/s12885-017-3308-3.
34. Lawson J.S., Glenn W.K., Salyakina D. et al. Human papilloma virus identification in breast cancer patients with previous cervical neoplasia. *Front Oncol* 2016;5:298. DOI: 10.3389/fonc.2015.00298.
35. Islam S., Dasgupta H., Roychowdhury A. et al. Study of association and molecular analysis of human papillomavirus in breast cancer of Indian patients: Clinical and prognostic implication. *PLoS One* 2017;12(2):e0172760. DOI: 10.1371/journal.pone.0172760.
36. Eklund C., Forslund O., Wallin K.L., Dillner J. Global improvement in genotyping of human papillomavirus DNA: the 2011 HPV LabNet International proficiency study. *J Clin Microbiol* 2014;52(2):449–59. DOI: 10.1128/JCM.02453-13.
37. Eklund C., Mühr L.S.A., Lagheden C. et al. The 2019 HPV Labnet international proficiency study: need of global Human Papillomavirus proficiency testing. *J Clin Virol* 2021;141:104902. DOI: 10.1016/j.jcv.2021.104902.
38. Khodabandehlou N., Mostafaei S., Etemadi A. et al. Human papilloma virus and breast cancer: the role of inflammation and viral expressed proteins. *BMC Cancer* 2019;19(1):61. DOI: 10.1186/s12885-019-5286-0.
39. Golrokh Mofrad M., Sadigh Z.A., Ainechi S., Faghihloo E. Detection of human papillomavirus genotypes, herpes simplex, varicella zoster and cytomegalovirus in breast cancer patients.

- Virol J 2021;18(1):25.
DOI: 10.1186/s12985-021-01498-z.
40. Mirabello L., Clarke M.A. NCI HPV Workshop. The intersection of HPV epidemiology, genomics and mechanistic studies of HPV-mediated carcinogenesis. *Viruses* 2018;10(2):80.
DOI: 10.3390/v10020080.
 41. Hennig E.M., Suo Z., Thoresen S. et al. Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Breast Cancer Res Treatment* 1999;53(2):121–35.
DOI: 10.1023/a:1006162609420.
 42. Yu Y., Morimoto T., Sasa M. et al. Human papillomavirus type 33 DNA in breast cancer in Chinese. *Breast Cancer* 2000;7(1):33–6. DOI: 10.1007/BF02967185.
 43. Damin A., Karam R., Zettler C. et al. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treatment* 2004;84(2):131–7. DOI: 10.1023/B:BREA.0000018411.89667.0d.
 44. Kroupis C., Markou A., Vourlidis N. et al. Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. *Clin Biochem* 2006;39(7):727–31.
DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2006.03.005.
 45. Khan N.A., Castillo A., Koriyama C. et al. Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan. *Br J Cancer* 2008;99(3):408–14.
DOI: 10.1038/sj.bjc.6604502.
 46. Heng B., Glenn W.K., Ye Y. et al. Human papilloma virus is associated with breast cancer. *Br J Cancer* 2009;101(8):1345–50.
DOI: 10.1038/sj.bjc.6605282.
 47. Mendizabal-Ruiz A.P., Morales J.A., Ramirez-Jirano L.J. et al. Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2009;114(1):189–94.
DOI: 10.1007/s10549-008-9989-1.
 48. Herrera-Goepfert R., Vela-Chavez T., Carrillo-Garcia A. et al. High-risk human papillomavirus (HPV) DNA sequences in metaplastic breast carcinomas of Mexican women. *BMC Cancer* 2013;13:445.
DOI: 10.1186/1471-2407-13-445.
 49. Fernandes A., Bianci G., Pesci Feltri A. et al. Presence of human papillomavirus in breast cancer and its association with prognostic factors. *Ecamcermadicalscience* 2015;9:548.
DOI: 10.3332/ecancer.2015.548.
 50. Gannon O.M., Antonsson A., Milevskiy M. et al. No association between HPV positive breast cancer and expression of human papilloma viral transcripts. *Sci Rep* 2015;5:18081.
DOI: 10.1038/srep18081.
 51. Choi J., Kim C., Lee H.S. et al. Detection of human papillomavirus in Korean breast cancer patients by real-time polymerase chain reaction and meta-analysis of human papillomavirus and breast cancer. *J Pathol Transl Med* 2016;50(6):442–50.
DOI: 10.4132/jptm.2016.07.08.
 52. Wang Y.-W., Zhang K., Zhao S. et al. HPV Status and its correlation with BCL2, p21, p53, Rb, and survivin expression in breast cancer in a chinese population. *BioMed Res Int* 2017;2017:6315392.
DOI: 10.1155/2017/6315392.
 53. Ngamkham J., Karalak A., Chaiwera-wattana A. et al. Prevalence of Human Papillomavirus Infection in Breast Cancer Cells from Thai Women. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017;18(7):1839–45.
DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.7.1839.
 54. Bonlokke S., Blaakar J., Steiniche T. et al. Evidence of no association between human papillomavirus and breast cancer. *Front Oncol* 2018;8:209.
DOI: 10.3389/fonc.2018.00209.
 55. ElAmrani A., Gheit T., Benhessou M. et al. Prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus in Moroccan breast cancer. *Papillomavirus Res* 2018;5:150–5.
DOI: 10.1016/j.pvr.2018.04.003.
 56. Cavalcante J.R., Pinheiro L.G.P., Almeida P.R.C. et al. Association of breast cancer with human papillomavirus (HPV) infection in Northeast Brazil: molecular evidence. *Clinics (Sao Paulo)* 2018;73:e465.
DOI: 10.6061/clinics/2018/e465.
 57. De Carolis S., Storci G., Ceccarelli C. et al. HPV DNA associates with breast cancer malignancy and it is transferred to breast cancer stromal cells by extracellular vesicles. *Front Oncol* 2019;9:860.
DOI: 10.3389/fonc.2019.00860.
 58. Sher G., Salman N.A., Kulinski M. et al. Prevalence and type distribution of high-risk human papillomavirus (HPV) in breast cancer: a Qatar based study. *Cancers (Basel)* 2020;12(6):1528.
DOI: 10.3390/cancers12061528.
 59. Biesaga B., Janecka-Widła A., Kołodziej-Rzepa M. et al. Low frequency of HPV positivity in breast tumors among patients from south-central Poland. *Infect Agent Cancer* 2021;16(1):67.
DOI: 10.1186/s13027-021-00405-z.
 60. Lawson J.S., Glenn W.K., Salyakina D. et al. Human papilloma viruses and breast cancer. *Front Oncol* 2015;5:277.
DOI: 10.3389/fonc.2015.00277.
 61. Krawczyk E., Supryniewicz F.A., Liu X., et al. Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am J Pathol* 2008;173(3):682–8.
DOI: 10.2353/ajpath.2008.080280.
 62. Schwarz E., Freese U.K., Gissmann L. et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314:111–4.
DOI: 10.1038/314111a0.
 63. Von Knebel Doeberitz M., Bauknecht T., Bartsch D., zur Hausen H. Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth-stimulating papillomavirus genes E6 and E7 in cervical carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(4):1411–5.
DOI: 10.1073/pnas.88.4.1411.
 64. Klaes R., Woerner S.M., Ridder R. et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 1999;59(24):6132–6.
 65. Ziegert C., Wentzensen N., Vinokurova S. et al. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene* 2003;22(25):3977–84.
DOI: 10.1038/sj.onc.1206629.
 66. Bodelon C., Untereiner M.E., Machiela M.J. et al. Genomic characterization of viral integration sites in HPV-related cancers. *Int J Cancer* 2016;139(9):2001–11.
DOI: 10.1002/ijc.30243. 27343048.
 67. Aldersley J., Lorenz D.R., Mouw K.W. et al. Genomic landscape of primary and recurrent anal squamous cell carcinomas in relation to HPV integration, copy-number variation, and DNA damage response genes. *Mol Cancer Res* 2021;19(8):1308–21.
DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0884.
 68. Balaji H., Demers I., Wuerdemann N. et al. Causes and consequences of HPV integration in head and neck squamous cell carcinomas: state of the art. *Cancers (Basel)* 2021;13(16):4089.
DOI: 10.3390/cancers13164089.
 69. Huang K.B., Guo S.J., Li Y.H. et al. Genome-wide profiling reveals HPV integration pattern and activated carcinogenic pathways in penile squamous cell carcinoma. *Cancers (Basel)* 2021;13(23):6104.
DOI: 10.3390/cancers13236104.
 70. Burns M.B., Lackey L., Carpenter M.A. et al. APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature* 2013;494(7437):366–70.
DOI: 10.1038/nature11881.
 71. Ohba K., Ichiyama K., Yajima M. et al. *In vivo* and *in vitro* studies suggest a possible involvement of HPV infection in the early stage of breast carcinogenesis via APOBEC3B induction. *PLoS One* 2014;9(5):e97787.
DOI: 10.1371/journal.pone.0097787. PMID: 24858917.
 72. Elagali A.M., Suliman A.A., Altayeb M. et al. Human papillomavirus, gene mutation and estrogen and progesterone receptors in breast cancer: a cross-sectional study. *Pan Afr Med J* 2021;38:43.
DOI: 10.11604/pamj.2021.38.43.22013.

ORCID автора / ORCID of the author

Г.М. Волгарева / Г.М. Волгарева: <https://orcid.org/0000-0002-6817-2103>

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was done without external funding.

Экзосомы молока в качестве агентов доставки терапевтически значимых препаратов при онкологических заболеваниях

С.Е. Седых^{1,2}, А.М. Тимофеева¹, А.Е. Кулешова¹, Г.А. Невинский^{1,2}

¹ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»; Россия, 630090 Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»; Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Контакты: Сергей Евгеньевич Седых sedyh@niboch.nsc.ru

Экзосомы – это природные нановезикулы диаметром 40–100 нм, принимающие активное участие в переносе различных биологически активных веществ, а также в межклеточной коммуникации. Природное происхождение обуславливает биологическую совместимость экзосом с культурами клеток и делает их перспективными средствами доставки противоопухолевых препаратов. В настоящее время методы искусственного получения данных нановезикул не разработаны. Препараты экзосом, полученные из опухолевых клеток, непригодны для терапии. Молоко – биологическая жидкость, которая доступна в промышленных масштабах. Оно может быть универсальным источником экзосом, используемых в лечении онкологических заболеваний. Адресная доставка противоопухолевых препаратов при помощи экзосом молока позволяет снизить токсический эффект цитостатических средств, используемых в химиотерапии. В данном обзоре рассмотрены методы выделения экзосом из молока, их дополнительная очистка, анализ биологически значимых компонентов этих везикул – белков и нуклеиновых кислот, а также перспективы применения экзосом молока в терапии онкологических заболеваний.

Ключевые слова: молоко, экзосомы, экзосомы молока, доставка лекарств, рак, выделение, везикулы, онкология, онкологические заболевания

Для цитирования: Седых С.Е., Тимофеева А.М., Кулешова А.Е., Невинский Г.А. Экзосомы молока в качестве агентов доставки терапевтически значимых препаратов при онкологических заболеваниях. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2):23–31. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-23-31.

Milk exosomes as delivery agents for therapy of cancer diseases

S.E. Sedykh^{1,2}, A.M. Timofeeva¹, A.E. Kuleshova¹, G.A. Nevinskiy^{1,2}

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 8 Prospekt Akademika Lavrentieva; Novosibirsk 630090, Russia;

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

Contacts: Sergey Evgenievich Sedykh sedyh@niboch.nsc.ru

Exosomes are natural nanovesicles with a diameter of 40–100 nm, which are actively involved in the transfer of biologically active substances and participate in intercellular communication. The natural origin of exosomes determines its biological compatibility with cell cultures and makes them promising delivery vehicles for anticancer drugs. Methods of the artificial production of exosomes are not available, and exosome preparations obtained from tumor cells are not suitable for therapy. Milk is a biological fluid that is commercially available and may be a universal source of exosomes for treatment. Target delivery of anticancer drugs using milk exosomes can reduce the toxic effect of cytostatic agents during chemotherapy. This review discusses methods for isolating exosomes from milk, their additional purification, and analysis of their biologically significant components – proteins and nucleic acids, and prospects for using milk exosomes to treat cancer.

Key words: milk, exosomes, milk exosomes, drug delivery, cancer, isolation, vesicles, oncology, oncological diseases

For citation: Sedykh S.E., Timofeeva A.M., Kuleshova A.E., Nevinskiy G.A. Milk exosomes as delivery agents for therapy of cancer diseases. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):23–31. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-23-31.

ВВЕДЕНИЕ

Экзосомы — это природные внеклеточные нановезикулы, которые участвуют в межклеточной коммуникации и переносят ряд биологически активных веществ, таких как белки, микроРНК, матричную РНК (мРНК), ДНК и другие молекулы [1]. Соединения могут транспортироваться как внутри экзосом, так и на их поверхности [2]. Из-за своего небольшого размера (диаметр 40–100 нм) эти нановезикулы можно использовать в персонализированной терапии для доставки лекарственных средств [3]. Поскольку методы искусственного синтеза экзосом на сегодняшний день еще не разработаны, актуальной задачей является их эффективное и безопасное получение в больших количествах из природных источников. Показано, что экзосомы содержатся в различных биологических жидкостях: плазме крови, моче, слюне, молоке, околоплодных водах, асцитах, спинномозговой жидкости и др. [1]. Молоко — единственная биологическая жидкость, доступная в промышленных масштабах.

Экзосомы молока человека впервые были описаны в 2007 г. На сегодняшний день они выделены из молока человека [4], крупного рогатого скота [5], свиньи [6], валлаби [7], верблюда [8], крысы [9], лошади [10], панды [11], овцы [12] и козы [13]. Базы данных содержат около 200 статей, посвященных экзосомам и другим везикулам молока.

Наиболее изучены белки и нуклеиновые кислоты экзосом молока коровы. К сожалению, использование препаратов, полученных из него, ограничено из-за прионных заболеваний и наличия аллергии на коровий белок у большей части населения. В связи с этим большую актуальность приобретает применение экзосом молока лошади, козы и других сельскохозяйственных животных [14].

Особенности экзосом молока необходимо учитывать при разработке новых терапевтических подходов к лечению различных заболеваний, в том числе онкологических. Однако в настоящее время в научной литературе содержится мало данных об использовании везикул молока, особенно экзосом, для доставки биологически активных молекул к клеткам [15]. В противоопухолевой терапии они применяются для передачи препаратов [16] и терапевтических нуклеиновых кислот [17], в том числе малых интерферирующих РНК (миРНК).

ВЫДЕЛЕНИЕ ЭКЗОСОМ МОЛОКА

Для получения экзосом из молока используют различные физические, физико-химические и иммунологические методы. Общие вопросы, касающиеся выделения и характеристики экзосом, описаны в рекомендациях Международного общества по изучению внеклеточных везикул (International Society For Extracellular Vesicles, ISEV) [18]. Чаще всего используют серию центрифугирований [5] с последующим ультрацентрифугированием [19]. Принципиально важным

является одно- или двукратное центрифугирование молока на низких оборотах перед выделением экзосом [19], поскольку хранение его необезжиренных образцов может привести к загрязнению препаратов экзосом мембранами жировых глобул молока (MFGM).

Экзосомы также можно выделить с помощью гелефильтрации, которая проводится после ультрацентрифугирования или вместо него [10, 20]. Это позволяет избавиться от совыделяющихся белков в препаратах.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ЭКЗОСОМ МОЛОКА

Биохимические компоненты экзосом молока — белки, липиды и нуклеиновые кислоты — могут существенно влиять на доставку терапевтических молекул. В связи с этим необходим детальный анализ содержания данных молекул в экзосомах молока, называемый экзосомикой (по аналогии с геномикой, протеомикой и другими омиксными технологиями) [21].

Согласно данным литературы, полученным, как правило, в ходе анализа экзосом молока после 1 или нескольких ультрацентрифугирований, препараты содержат тысячи разных белков и/или нуклеиновых кислот. Тривиальные вычисления показывают, что в везикулу объемом 40–100 нм не может поместиться более 100 молекул глобулярных белков среднего размера. Согласно результатам наших исследований [10, 14, 22] в препаратах экзосом, полученных с помощью стандартных методов (центрифугирования и ультрацентрифугирования), содержится всего 5–10 % экзосом. Большую же часть этих препаратов составляют соосажающиеся примеси — белки, нуклеиновые кислоты и их надмолекулярные комплексы [10, 23].

Белки экзосом молока. В статьях, посвященных протеомному анализу экзосом молока, описаны десятки, сотни и даже тысячи белков и пептидов, например 115 [24], 571 [23], 2107 [25] и 2698 [26] индивидуальных белков и их изоформ. Белки, наиболее часто представленные в экзосомах молока, приведены в табл. 1. По мнению Е.Д. Свердлова [27], эти показатели сильно преувеличены, что, скорее всего, связано с отнесением к экзосомам совыделяющихся белков и нуклеиновых кислот молока [28, 29].

Ранее нами был предложен оригинальный метод выделения экзосом, позволяющий получать препараты, практически не содержащие совыделяющихся белков [10, 14]. Согласно результатам наших исследований в состав экзосом молока лошади в основном входят актин, бутирофилин, β -лактоглобулин, лактадхерин, лактоферрин и ксантиндегидрогеназа, а также многочисленные пептиды.

Согласно данным литературы бутирофилин, лактадхерин и ксантиндегидрогеназа являются специфическими маркерами экзосом молока [28]. Поскольку α -, β - и κ -казеины, рибосомные белки, а также белки матрикса митохондрий не могут присутствовать в препаратах экзосом в соответствии с несовместимыми

Таблица 1. Белки экзосом молока

Table 1. Proteins of milk exosomes

Белки Proteins	Количество белков, шт. Number of proteins	Источник экзосом молока Source of milk exosomes	Метод детекции Detection method	Источник Reference
Бутирофилин, κ-казеин, лактадхерин, ксантиндегидрогеназа Butyrophilin, κ-casein, lactadherin, xanthine dehydrogenase	94	Крупный рогатый скот Cattle	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[30]
Ангиогенин-1, лактоферрин, лактопероксидаза, сульфгидрилоксидаза Angiogenin-1, lactoferrin, lactoperoxidase, sulfhydryl oxidase	920	Крупный рогатый скот Cattle	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов с iTRAQ iTRAQ-LC MS/MS of trypsin hydrolysates	[31]
Бутирофилин, CD36, компонент системы комплемента 3, синтаза жирных кислот, лактадхерин, лактотрансферрин, белок 2, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности, полимерный рецептор иммуноглобулина, ксантиндегидрогеназа Butyrophilin, CD36, complement system component 3, fatty acid synthase, lactadherin, lactotransferrin, low-density lipoprotein receptor-related protein 2, polymeric immunoglobulin receptor, xanthine dehydrogenase	1372	Крупный рогатый скот Cattle	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[32]
Белок, связывающий жирные кислоты, α-казеин, бутирофилин, лактадхерин, α-лактальбумин, β-лактоглобулин, ксантиндегидрогеназа Fatty acid-binding protein, α-casein, butyrophilin, lactadherin, α-lactalbumin, β-lactoglobulin, xanthine dehydrogenase	1879	Крупный рогатый скот Cattle	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[33]
Адилофилин, бутирофилин, лактадхерин, ксантиноксидаза Adipophilin, butyrophilin, lactadherin, xanthine oxidase	2107	Крупный рогатый скот Cattle	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[25]
Бутирофилин, лактадхерин, синтаза жирных кислот, ксантиндегидрогеназа Butyrophilin, lactadherin, fatty acid synthase, xanthine dehydrogenase	2299	Крупный рогатый скот Cattle	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов с iTRAQ iTRAQ-LC MS/MS of trypsin hydrolysates	[34]
Актин, бутирофилин, лактадхерин, лактоферрин, β-лактоглобулин Actin, butyrophilin, lactadherin, lactoferrin, β-lactoglobulin	8	Лошадь Horse	MALDI-TOF-MS/MS трипсиновых гидролизатов после 2D-электрофореза MALDI-TOF-MS/MS of trypsin hydrolysates after 2D electrophoresis	[10]
CD36, α-енолаза, синтаза жирных кислот, лактадхерин, лактотрансферрин, полимерный рецептор иммуноглобулина, ингибитор диссоциации Rab GDP, синтенин-1, ксантиндегидрогеназа CD36, α-enolase, fatty acid synthase, lactadherin, lactotransferrin, polymeric immunoglobulin receptor, Rab GDP dissociation inhibitor, syntenin-1, xanthine dehydrogenase	73	Человек Human	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[4]
β-казеин, лактоферрин, полимерный рецептор иммуноглобулина, сывороточный альбумин, тенасцин, ксантиндегидрогеназа β-casein, lactoferrin, polymeric immunoglobulin receptor, serum albumin, tenascin, xanthine dehydrogenase	115	Человек Human	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[23]

Окончание табл. 1

The end of table 1

Белки Proteins	Количество белков, шт. Number of proteins	Источник экзосом молока Source of milk exosomes	Метод детекции Detection method	Источник Reference
Аннексины, CD9, CD63, CD81, флотилин, субъединицы G-белка, лактадхерин, Rab, Ras-родственные белки, синтенин Annexins, CD9, CD63, CD81, flotillin, G protein subunits, lactadherin, Rab, Ras-related proteins, syntenin	2698	Человек Human	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[23]
Альбумин, церулоплазмин, комплемент C, α-глюкозидаза, фибронектин, лактотрансферрин, тромбоспондин Albumin, ceruloplasmin, complement C, α-glucosidase, fibronectin, lactotransferrin, thrombospondin	571	Свинья Pig	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[23]

Примечание. MS – tandemная масс-спектрометрия; LC-MS/MS – жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией; iTRAQ – изобарические метки для относительного и абсолютного количественного определения; MALDI-TOF-MS – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с tandemной масс-спектрометрией.

Note. MS – tandem mass spectrometry; LC-MS/MS – liquid chromatography-tandem mass spectrometry; iTRAQ – isobaric tags for relative and absolute quantitation; MALDI-TOF-MS – matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.

механизмами секреции [21, 35], их следует рассматривать как показатели отсутствия экзосом.

Нуклеиновые кислоты экзосом молока. В ходе исследований, проведенных в последние 10 лет, было определено содержание мРНК и микроРНК в молоке крупного рогатого скота [36], человека [37], панды [11], свиньи [6] и крысы [38].

Содержание микроРНК в экзосомах молока определяется с помощью высокопроизводительного секвенирования и технологии микрочипов. Анализ глобальных профилей экспрессии с использованием микрочипов выявил 79 различных микроРНК во фракции экзосом, 91 – в супернатанте после ультрацентрифугирования коровьего молока. Общими для обеих фракций были 39 микроРНК. Дальнейшие исследования показали, что уровень их экспрессии значительно выше в экзосомальной части по сравнению с супернатантом [39]. Были описаны около 491 микроРНК, содержащейся в экзосомах свиного молока, в том числе 176 известных микроРНК и 315 новых зрелых микроРНК. Анализ геной онтологии этих микроРНК показал, что большинство из них нацелены на гены, связанные с транскрипционными, иммунными и метаболическими процессами [40]. МикроРНК, часто встречающиеся в экзосомах молока, представлены в табл. 2.

В научных статьях сообщается о содержании 16 304 различных мРНК в экзосомах молока свиньи [24] и до 19 230 мРНК в экзосомах молока коровы [39]. Трудно представить, как такое количество мРНК может поместиться в везикуле размером 40–100 нм [27]. Поэтому следует критически относиться к информации о содержании микроРНК (и особенно мРНК) в экзосомах молока. Данные о количестве белков и микроРНК в экзосомах молока сильно преувеличе-

ны в связи с отнесением к ним совыделяющихся нуклеиновых кислот молока (как свободных, так и образующихся вследствие разрушения клеток). Следует учитывать потенциальную возможность взаимодействия нуклеиновых кислот в экзосомах молока (особенно противовоспалительный эффект и ослабление иммунного ответа) при планировании экспериментов по доставке терапевтических нуклеиновых кислот в клетки [41].

Липиды экзосом молока. Экзосомы представляют собой нановезикулы, окруженные липидным бислоем, который содержит белки, направленные во внеклеточное пространство. В связи с этим доставка фармакологически значимых соединений возможна как внутри, так и снаружи экзосом, причем гидрофильных (связанных с поверхностными белками) и гидрофобных (входящих в состав липидного бислоя) молекул. Подробный обзор липидов экзосом приведен в работе T. Skotland и соавт. [42].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКЗОСОМ МОЛОКА ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ТЕРАПИИ РАКА

В ряде работ опубликованы результаты попыток использования экзосом, выделенных из различных клеточных линий, для адресной доставки лекарственных препаратов [43]. Однако существуют препятствия для использования этих нановезикул в качестве терапевтических продуктов: их выделение из клеточных линий требует больших затрат, а получение из образцов пациентов несовместимо с коммерческим фармацевтическим производством, поскольку необходимо много биоматериала, что также увеличивает себестоимость экзосом. К тому же белковые компоненты

Таблица 2. МикроРНК экзосом молока

Table 2. MicroRNA of milk exosomes

МикроРНК MicroRNA	Количество микроРНК, шт. Number of microRNAs	Источник экзосом молока Source of milk exosomes	Метод детекции Detection method	Источник Reference
2478, 1777b, 1777a, let-7b, 1224, 2412, 2305, let-7a, 200c, 141	79	Крупный рогатый скот Cattle	Анализ на микрочипах Microchip analysis	[39]
148a, let-7c, let-7a-5p, 26a, let-7f, 30a-5p, 30d	372	Буйвол Buffalo	Секвенирование РНК RNA sequencing	[44]
30d-5p, let-7b-5p, let-7a-5p, 125a-5p, 21-5p, 423-5p, let-7 g-5p, let-7f-5p, 30a-5p, 146b-5p	219	Человек Human	Секвенирование РНК RNA sequencing	[45]
22-3p, 148a-3p, 141-3p, 181a-5p, 320a, 378a-3p, 30d-5p, 30a-5p, 26a-5p, 191-5p	308	Человек* Human*	Секвенирование РНК RNA sequencing	[46]
let-7a-5p, 148a-3p, 146b-5p, let-7f-5p, let-7 g-5p, 21-5p, 26a-5p, 30d-5p	631	Человек Human	Секвенирование РНК RNA sequencing	[47]
148a-3p, 30b-5p, let-7f-5p, 146b-5p, 29a-3p, let-7a-5p, 141-3p, 182-5p, 200a-3p, 378-3p	602	Человек Human	Секвенирование РНК RNA sequencing	[48]
let-7b-5p, 92a-3p, 148a-3p, 30a-5p, let-7a-5p, 181a-5p, let-7i-5p, let-7f-1/2-5p, let-7 g-5, 200a-3p	1191	Панда Panda	Секвенирование РНК RNA sequencing	[11]
148a-3p, 182-5p, 200c-3p, 25-3p, 30a-5p, 30d-5p, 574-3p	234	Свинья Pig	Секвенирование РНК RNA sequencing	[6]
148a, let-7b, let-7a, 21, let-7c, let-7i, 26a, let-7f, 125b, 143	84	Овца Sheep	Секвенирование РНК RNA sequencing	[49]

*Преждевременные роды.

*Preterm birth.

экзосом при системном введении могут вызвать иммунный ответ [50].

Экзосомы могут быть получены в большом количестве из коровьего молока [16]. Их введение не вызывает системной токсичности и анафилактического эффекта у мышей [51]. При этом введение ненагруженных экзосом верблюжьего молока способствует значительному снижению прогрессирования опухоли молочной железы [52]. Таким образом, экзосомы молока могут быть потенциальным средством адресной доставки лекарственных средств.

Исследование использования экзосом молока для доставки химиотерапевтического агента паклитаксела продемонстрировало небольшое увеличение размера нагруженных экзосом. Авторы объяснили это частичным включением данного препарата в липидный бислой мембраны. В то же время экзосомы, содержащие лекарство, стабильны в кишечнике, что подчеркивает их пригодность для пероральной доставки лекарств [15].

Применение экзосом молока для доставки куркумина как потенциального противоопухолевого агента позволило значительно повысить его стабильность, растворимость и биодоступность в неблагоприятных условиях пищеварительного тракта на модели клеток

колоректальной аденокарциномы человека. Было выявлено, что куркумин, нагруженный в экзосомы, выделенные из эпителиальных клеток кишечника, более эффективно абсорбируется клетками колоректальной аденокарциномы, чем куркумин в составе молочных экзосом [53].

Одной из проблем применения молочных экзосом для адресной доставки лекарственных средств является их недостаточная специфичность к клеткам-реципиентам. Показано, что экзосомы молока абсорбируются из кишечника в виде интактных частиц, которые могут быть модифицированы лигандами для удерживания в тканях-мишенях [54]. Векторы на основе экзосом молока могут быть оснащены специальными лигандами для связывания опухолеспецифических рецепторов [55]. Рецептор CD44 часто сверхэкспрессируется на поверхности различных типов раковых клеток. Специфическим лигандом данного рецептора является гиалуронан. Оснащение липидной мембраны экзосом молока молекулами гиалуронана позволяет осуществить целенаправленную доставку цитостатического агента доксорубина в клетки с повышенной экспрессией CD44 [55]. Добавление фолиевой кислоты в качестве лиганда опухолевых рецепторов к экзосомам молока, нагруженным этим химиотерапевтическим

агентом, способствует значительному ингибированию роста опухолевых клеток на модели мышинных ксено-

трансплантатов [16]. Биомолекулы, доставляемые экзосомами молока, представлены в табл. 3.

Таблица 3. Биологически и терапевтически значимые молекулы, доставляемые с экзосомами молока

Table 3. Biologically and therapeutically significant molecules delivered with milk exosomes

Молекула Molecule	Растворимость в воде Water solubility	Источник экзосом молока Source of milk exosomes	Клеточные линии, используемые для доставки Cell lines used for delivery	Источ- ник Reference
Антоцианы Anthocyanins	Растворимы Soluble	Крупный рогатый скот Cattle	A549 (рака легких), H1299 (рака легких), MDA-MB-231 (рака груди), MCF7 (рака груди), PANC1 (рака поджелудочной железы), Mia PaCa2 (рака поджелудочной железы), PC3 (рака простаты), DU145 (рака простаты), HCT116 (рака толстой кишки), OVCA432 (рака яичников), OVCA433 (рака яичников), A2780 (рака яичников), A2780/CP70 (рака яичников) A549 (lung cancer), H1299 (lung cancer), MDA-MB-231 (breast cancer), MCF7 (breast cancer), PANC1 (pancreatic cancer), Mia PaCa2 (pancreatic cancer), PC3 (prostate cancer), DU145 (prostate cancer), HCT116 (colon cancer), OVCA432 (ovarian cancer), OVCA433 (ovarian cancer), A2780 (ovarian cancer), A2780/CP70 (ovarian cancer)	[56]
Целастрол Celastrol	Нерастворим Insoluble	Крупный рогатый скот Cattle	A549 (рака легких), H1299 (рака легких) A549 (lung cancer), H1299 (lung cancer)	[57]
Куркумин Curcumin	Нерастворим Insoluble	Крупный рогатый скот Cattle	Caco-2 (рака толстой кишки), H1299 (рака легких), A549 (рака груди), HeLa (рака шейки матки), MDA-MB-231 (рака груди), T47D (рака груди) Caco-2 (colon cancer), H1299 (lung cancer), A549 (breast cancer), HeLa (cervical cancer), MDA-MB-231 (breast cancer), T47D (breast cancer)	[53]
Доцетаксел Docetaxel	Нерастворим Insoluble	Крупный рогатый скот Cattle	A549 (рака легких), H1299 (рака легких), MB-231 (рака груди), T47D (рака груди), Beas-2B (из эпителия бронхов) A549 (lung cancer), H1299 (lung cancer), MB-231 (breast cancer), T47D (breast cancer), Beas-2B (bronchial epithelium)	[16]
Доксорубицин Doxorubicin	Растворим Soluble	Крупный рогатый скот Cattle	A549 (рака легких), MDA-MB-231 (рака груди), MCF-7 (рака груди), HEK293 (из эмбриональных клеток почки) A549 (lung cancer), MDA-MB-231 (breast cancer), MCF-7 (breast cancer), HEK293 (embryonic kidney cells)	[55]
Паклитаксел Paclitaxel	Нерастворим Insoluble	Крупный рогатый скот Cattle	A549 (рака легких), H1299 (рака легких), MB-231 (рака груди), T47D (рака груди), Beas-2B (из эпителия бронхов) A549 (lung cancer), H1299 (lung cancer), MB-231 (breast cancer), T47D (breast cancer), Beas-2B (bronchial epithelium)	[15, 16]
Малые интерфериру- ющие РНК Small interfering RNAs	Растворимы Soluble	Крупный рогатый скот Cattle	A549 (рака легких), H1299 (рака легких), MDA-MB-231 (рака груди), MCF7 (рака груди), PANC1 (рака поджелудочной железы), Mia PaCa2 (рака поджелудочной железы), Caco-2 (рака толстой кишки), A2780 (рака яичников) A549 (lung cancer), H1299 (lung cancer), MDA-MB-231 (breast cancer), MCF7 (breast cancer), PANC1 (pancreatic cancer), Mia PaCa2 (pancreatic cancer), Caco-2 (colon cancer), A2780 (ovarian cancer)	[17]
Витаферин А Withaferin A	Нерастворим Insoluble	Крупный рогатый скот Cattle	A549 (рака легких), H1299 (рака легких), MB-231 (рака груди), T47D (рака груди), Beas-2B (из эпителия бронхов) 549 (lung cancer), H1299 (lung cancer), MB-231 (breast cancer), T47D (breast cancer), Beas-2B (bronchial epithelium)	[16]

Таким образом, согласно результатам исследований применение экзосом молока для доставки противоопухолевых препаратов способствует значительному повышению их эффективности и снижению токсичности терапии [16].

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ЭКЗОСОМ МОЛОКА И ИХ ДОСТАВКА В РАКОВЫЕ КЛЕТКИ

Способность экзосом переносить мРНК и микроРНК между клетками и впоследствии опосредовать изменения экспрессии генов-мишеней в клетках-реципиентах может использоваться в терапии злокачественных опухолей. Также следует подчеркнуть потенциал экзосом молока для доставки экзогенных миРНК.

Малые интерферирующие РНК являются потенциальным поколением новых терапевтических средств. С ростом знаний о молекулярных механизмах эндогенной РНК-интерференции увеличиваются возможности использования миРНК в качестве лекарственных средств на основе нуклеиновых кислот для терапии многих заболеваний, в том числе различных видов рака.

Несмотря на большой терапевтический потенциал, использование миРНК затрудняется из-за отсутствия

эффективных способов их доставки в клетку. В качестве альтернативных вариантов переноса миРНК в клетки рассматривают полимерные наночастицы, липиды и липосомы, пептиды и синтетические наночастицы. Наиболее развита сегодня система доставки с помощью липосом [58]. Однако данные методы не решают проблему неспецифического таргетирования и иммунного ответа. Преимуществом экзосом молока является их способность к адресной доставке содержимого в клетки кишечника и стабильность в желудочно-кишечном тракте [59].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка биосовместимых методов доставки лекарственных препаратов *in vitro* и *in vivo* имеет большое значение для молекулярной фармакологии. Практическое использование экзосом молока имеет большие перспективы. Основными проблемами, ограничивающими их применение в терапии различных заболеваний, в том числе различных видов рака, являются недостаточный уровень исследования белков и нуклеиновых кислот, входящих в состав экзосом и совыделяющихся с ними, тропность экзосом молока к различным клеткам и тканям.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Colombo M., Raposo G., Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014;30:255–89. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- Sawada S.I., Sato Y.T., Kawasaki R. et al. Nanogel hybrid assembly for exosome intracellular delivery: Effects on endocytosis and fusion by exosome surface polymer engineering. *Biomater Sci* 2020;8:619–30. DOI: 10.1039/c9bm01232j.
- Bunggulawa E.J., Wang W., Yin T. et al. Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *J Nanobiotechnology* 2018;16:81. DOI: 10.1186/s12951-018-0403-9.
- Admyre C., Johansson S.M., Qazi K.R. et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol* 2007;179(3):1969–78. DOI: 10.4049/jimmunol.179.3.1969.
- Yamada T., Inoshima Y., Matsuda T., Ishiguro N. Comparison of methods for isolating exosomes from bovine milk. *J Vet Med Sci* 2012;74(11):1523–5. DOI: 10.1292/jvms.12-0032.
- Gu Y., Li M., Wang T., et al. Lactation-related microRNA expression profiles of porcine breast milk exosomes. *PLoS One* 2012;7. DOI: 10.1371/journal.pone.0043691.
- Modepalli V., Kumar A., Hinds L.A. et al. Differential temporal expression of milk miRNA during the lactation cycle of the marsupial tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *BMC Genomics* 2014;15:1012. DOI: 10.1186/1471-2164-15-1012.
- Yassin A.M., Abdel Hamid M.I., Farid O.A. et al. Dromedary milk exosomes as mammary transcriptome nano-vehicle: their isolation, vesicular and phospholipidomic characterizations. *J Adv Res* 2016;7:749–56. DOI: 10.1016/j.jare.2015.10.003. Available at: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-1012>.
- Hock A., Miyake H., Li B. et al. Breast milk-derived exosomes promote intestinal epithelial cell growth. *J Pediatr Surg* 2017;52(5):755–9. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2017.01.032.
- Sedykh S.E., Purvinish L.V., Monogarov A.S. et al. Purified horse milk exosomes contain an unpredictable small number of major proteins. *Biochim Open* 2017;4:61–72. DOI: 10.1016/j.biopen.2017.02.004.
- Ma J., Wang C., Long K. et al. Exosomal microRNAs in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) breast milk: Potential maternal regulators for the development of newborn cubs. *Sci Rep* 2017;7:1–11. DOI: 10.1038/s41598-017-03707-8.
- Gao H.N., Guo H.Y., Zhang H. et al. Yak milk-derived exosomes promote proliferation of intestinal epithelial cells in hypoxic environment. *J Dairy Sci* 2019;102(2):985–96. DOI: 10.3168/jds.2018-14946.
- González M.I., Martín-Duque P., Desco M., Salinas B. Radioactive labeling of milk-derived exosomes with ^{99m}Tc and *in vivo* tracking by SPECT imaging. *Nanomaterials* 2020;10(6):1062. DOI: 10.3390/nano10061062.
- Sedykh S.E., Kuleshova A.E., Purvinish L.V. et al. Horse milk exosomes: isolation, microscopic and biochemical analysis, and prospects of use. *Biotechnologiya* 2020;36(5):62–71. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-5-62-71.
- Agrawal A.K., Aqil F., Jeyabalan J. et al. Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel. *Nanomedicine* 2017;13(5):1627–36. DOI: 10.1016/j.nano.2017.03.001.
- Munagala R., Aqil F., Jeyabalan J., Gupta R.C. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett* 2016;371(1):48–61. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.10.020.
- Aqil F., Munagala R., Jeyabalan J. et al. Milk exosomes – natural nanoparticles for siRNA delivery. *Cancer Lett* 2019;449:186–95. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.02.011.

18. Théry C., Witwer K.W., Aikawa E. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International society for extracellular vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018;7(1):1535750. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.
19. Zonneveld M.I., Brisson A.R., van Herwijnen M.J.C. et al. Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures. *J Extracell Vesicles* 2014;3:24215. DOI: 10.3402/jev.v3.24215.
20. Blans K., Hansen M.S., Sørensen L.V. et al. Pellet-free isolation of human and bovine milk extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles* 2017;6(1): 1294340. DOI: 10.1080/20013078.2017.1294340.
21. De la Torre Gomez C., Goreham R.V., Bech Serra J.J. et al. "Exosomics" – a review of biophysics, biology and biochemistry of exosomes with a focus on human breast milk. *Front Genet* 2018;9. DOI: 10.3389/fgene.2018.00092.
22. Sedykh S.E., Purvinish L.V., Burkova E.E. et al. Analysis of peptides and small proteins in preparations of horse milk exosomes, purified on anti-CD81-Sephacrose. *Int Dairy J* 2021;117:104994. DOI: 10.1016/j.idairyj.2021.104994.
23. Chen T., Xi Q.-Y., Sun J.-J. et al. Revelation of mRNAs and proteins in porcine milk exosomes by transcriptomic and proteomic analysis. *BMC Vet Res* 2017;13(1). DOI: 10.1186/s12917-017-1021-8.
24. Liao Y., Alvarado R., Phinney B., Lönnérdal B. Proteomic characterization of human milk whey proteins during a twelve-month lactation period. *J Proteome Res* 2011;10(4):1746–54. DOI: 10.1021/pr101028k.
25. Reinhardt T.A., Lippolis J.D., Nonnecke B.J., Sacco R.E. Bovine milk exosome proteome. *J Proteomics* 2012;75(5):1486–92. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.11.017.
26. Van Herwijnen M.J.C., Zonneveld M.I., Goerdal S. et al. Comprehensive proteomic analysis of human milk-derived extracellular vesicles unveils a novel functional proteome distinct from other milk components. *Mol Cell Proteomics* 2016;15(11):3412–23. DOI: 10.1074/mcp.M116.060426.
27. Sverdlov E.D. Amedeo Avogadro's cry: what is 1 µg of exosomes? *Bioessays* 2012;34(10):873–5. DOI: 10.1002/bies.201200045.
28. Sedykh S.E., Burkova E.E., Purvinish L.V. et al. Milk exosomes: isolation, biochemistry, morphology, and perspectives of use. In: *Extracellular vesicles and their importance in human health*. Rijeka, Croatia: IntechOpen; 2020.
29. Burkova E.E., Dmitrenok P.S., Bulgakov D.V. et al. Exosomes from human placenta purified by affinity chromatography on sephacrose bearing immobilized antibodies against CD81 tetraspanin contain many peptides and small proteins. *IUBMB Life* 2018;70(11):1144–55. DOI: 10.1002/iub.1928.
30. Koh Y.Q., Peiris H.N., Vaswani K. et al. Characterization of exosomes from body fluids of dairy cows. *J Anim Sci* 2017;95(9):3893–904. DOI: 10.2527/jas2017.1727.
31. Yang M., Song D., Cao X. et al. Comparative proteomic analysis of milk-derived exosomes in human and bovine colostrum and mature milk samples by iTRAQ-coupled LC-MS/MS. *Food Res Int* 2017;92:17–25. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.11.041.
32. Samuel M., Chisanga D., Liem M. et al. Bovine milk-derived exosomes from colostrum are enriched with proteins implicated in immune response and growth. *Sci Rep* 2017;7(1):5933. DOI: 10.1038/s41598-017-06288-8.
33. Benmoussa A., Gotti C., Bourassa S. et al. Identification of protein markers for extracellular vesicle (EV) subsets in cow's milk. *J Proteomics* 2019;192. DOI: 10.1016/j.jprot.2018.08.010.
34. Reinhardt T.A., Sacco R.E., Nonnecke B.J., Lippolis J.D. Bovine milk proteome: quantitative changes in normal milk exosomes, milk fat globule membranes and whey proteomes resulting from *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Proteomics* 2013;82:141–54. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.02.013.
35. Burgoyne R.D., Duncan J.S. Secretion of milk proteins. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998;3(3):275–86. DOI: 10.1023/a:1018763427108.
36. Hata T., Murakami K., Nakatani H. et al. Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396(2):528–33. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.04.135.
37. Kosaka N., Izumi H., Sekine K., Ochiya T. MicroRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence* 2010;1(1):7. DOI: 10.1186/1758-907X-1-7.
38. Izumi H., Kosaka N., Shimizu T. et al. Time-dependent expression profiles of microRNAs and mRNAs in rat milk whey. *PLoS One* 2014;9(2):e88843. DOI: 10.1371/journal.pone.0088843.
39. Izumi H., Tsuda M., Sato Y. et al. Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages. *J Dairy Sci* 2015;98(5):2920–33. DOI: 10.3168/jds.2014-9076.
40. Zhang L., Chen T., Yin Y. et al. Dietary microRNA – a novel functional component of food. *Adv Nutr* 2019;10(4):711–21. DOI: 10.1093/advances/nmy127.
41. Benmoussa A., Provost P. Milk microRNAs in health and disease. *Compr rev food sci food saf* 2019;18(3):703–22. DOI: 10.1111/1541-4337.12424.
42. Skotland T., Hessvik N.P., Sandvig K., Llorente A. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J Lipid Res* 2019;60(1):9–18. DOI: 10.1194/jlr.R084343.
43. Smyth T., Kullberg M., Malik N. et al. Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. *J Control Release* 2015;199:145–55. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.12.013.
44. Chen Z., Xie Y., Luo J. et al. Milk exosome-derived miRNAs from water buffalo are implicated in immune response and metabolism process. *BMC Vet Res* 2020;16(1):123. DOI:10.1186/s12917-020-02339-x.
45. Leiferman A., Shu J., Upadhyaya B. et al. Storage of extracellular vesicles in human milk, and microRNA profiles in human milk exosomes and infant formulas. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2019;69(2):235–8. DOI: 10.1097/MPG.0000000000002363.
46. Chen T., Xi Q.-Y., Ye R.-S. et al. Exploration of microRNAs in porcine milk exosomes. *BMC Genomics* 2014;15(1):100. DOI: 10.1186/1471-2164-15-100.
47. Kim K.-U., Kim W.-H., Jeong C.H. et al. More than Nutrition: therapeutic potential of breast milk-derived exosomes in cancer. *Int J Mol Sci* 2020;21(19):7327. DOI: 10.3390/ijms21197327.
48. Mirza A.H., Kaur S., Nielsen L.B. et al. Breast milk-derived extracellular vesicles enriched in exosomes from mothers with type 1 diabetes contain aberrant levels of microRNAs. *Front Immunol* 2019;10:2543. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02543.
49. Quan S., Nan X., Wang K. et al. Characterization of sheep milk extracellular vesicle-miRNA by sequencing and comparison with cow milk. *Animals* 2020;10(2):331. DOI: 10.3390/ani10020331.
50. Hagiwara K., Ochiya T., Kosaka N. A paradigm shift for extracellular vesicles as small RNA carriers: from cellular waste elimination to therapeutic applications. *Drug Deliv Transl Res* 2014;4(1):31–7. DOI: 10.1007/s13346-013-0180-9.
51. Somiya M., Yoshioka Y., Ochiya T. Biocompatibility of highly purified bovine milk-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2018;7(1):1440132. DOI: 10.1080/20013078.2018.1440132.
52. Badawy A.A., El-Magd M.A., AlSadrah S.A. Therapeutic effect of camel milk and its

- exosomes on MCF7 cells *in vitro* and *in vivo*. Integr Cancer Ther 2018;17(4):1235–46. DOI: 10.1177/1534735418786000.
53. Carobolante G., Mantaj J., Ferrari E., Vllasaliu D. Cow milk and intestinal epithelial cell-derived extracellular vesicles as systems for enhancing oral drug delivery. Pharmaceutics 2020;12(3):226. DOI: 10.3390/pharmaceutics12030226.
54. Betker J.L., Angle B.M., Graner M.W., Anchordoquy T.J. The potential of exosomes from cow milk for oral delivery. J Pharm Sci 2019;108(4):1496–1505. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.11.022.
55. Li D., Yao S., Zhou Z. et al. Hyaluronan decoration of milk exosomes directs tumor-specific delivery of doxorubicin. Carbohydr Res 2020;493:108032. DOI: 10.1016/j.carres.2020.108032.
56. Munagala R., Aqil F., Jeyabalan J. et al. Exosomal formulation of anthocyanidins against multiple cancer types. Cancer Lett 2017;393:94–102. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.02.004.
57. Aqil F., Kausar H., Agrawal A.K. et al. Exosomal formulation enhances therapeutic response of celastrol against lung cancer. Exp Mol Pathol 2016;101(1):12–21. DOI: 10.1016/j.yexmp.2016.05.013.
58. Tatiparti K., Sau S., Kashaw S., Iyer A. siRNA Delivery strategies: a comprehensive review of recent developments. Nanomaterials 2017;7(4):77. DOI: 10.3390/nano7040077.
59. Shandilya S., Rani P., Onteru S.K., Singh D. Small interfering RNA in milk exosomes is resistant to digestion and crosses the intestinal barrier *in vitro*. J Agric Food Chem 2017;65(43):9506–13. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03123.

Вклад авторов

С.Е. Седых: получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;
А.М. Тимофеева, А.Е. Кулешова, Г.А. Невинский: обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи.

Authors's contribution

S.E. Sedykh: obtaining data for analysis, review of publications on the topic of the article, article writing;
A.M. Timofeeva, A.E. Kuleshova, G.A. Nevinsky: review of publications on the topic of the article, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.Е. Седых / S.E. Sedykh: <http://orcid.org/0000-0003-0882-8171>
А.М. Тимофеева / A.M. Timofeeva: <http://orcid.org/0000-0002-1270-7164>
Г.А. Невинский / G.A. Nevinsky: <http://orcid.org/0000-0002-4988-8923>

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 № 18-74-10055).

Financing. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 18-74-10055).

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-32-42



Прогностическое значение наличия в крови циркулирующей опухолевой ДНК как маркера минимального резидуального заболевания при колоректальном раке I–III стадии

Е.М. Полянская¹, М.Ю. Федянин^{1–3}, У.А. Боярских⁴, А.А. Кечин⁴, Е.А. Мороз¹, Е.А. Храпов⁴, И.П. Оскорбин⁴, Д.В. Шамовская⁴, В.А. Алиев¹, З.З. Мамедли¹, А.А. Трякин¹, М.Л. Филипенко⁴, С.А. Тюлядин¹

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

²ГБУЗ «Московский многопрофильный клинический центр «Коммунарка» Департамента здравоохранения г. Москвы; Россия, 108814 Москва, пос. Сосенское, пос. Коммунарка, Сосенский Стан, 8;

³ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, Москва 105203, ул. Нижняя Первомайская, 70;

⁴ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»; Россия, 630090 Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8

Контакты: Елизавета Максимовна Полянская Lazimira@mail.ru

Введение. Исследования, посвященные неметастатическому колоректальному раку, продемонстрировали прогностическое значение анализа циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) после операции, что в перспективе позволит персонализировать как неоадъювантное, так и адъювантное лечение.

Цель исследования – изучить прогностическое значение статуса цоДНК до и после операции у пациентов с колоректальным раком I–III стадии.

Материалы и методы. В исследование были включены данные пациентов с морфологически верифицированным колоректальным раком I–III стадии, проходивших лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина в период с 2016 по 2021 г. Забор образцов крови осуществлялся до и после хирургического лечения (на 7–10-е сутки после операции). Минимально допустимая концентрация, при которой цоДНК в образце плазмы считали позитивной, – 0,4 копий мутантного ДНК в 1 мкл плазмы. Основным критерием эффективности являлась выживаемость без признаков болезни (ВБПБ).

Результаты. В исследование были включены 146 пациентов с колоректальным раком I–III стадии. Прогрессирование выявлено у 34 больных. Медиана времени наблюдения составила 22 мес (1–66 мес). Данные о прогрессировании заболевания получены для 119 пациентов. Положительный цоДНК-статус до операции выявлен у 55 (45 %) из 120 больных, после хирургического вмешательства – у 46 (38,6 %) из 119. В группе цоДНК+ медиана ВБПБ до операции составила 35 мес (95 % доверительный интервал (ДИ) 24,0–45,9), в группе цоДНК– она не была достигнута (отношение рисков (ОР) 4,6; 95 % ДИ 2,0–10,4). Однолетняя ВБПБ в группах положительного и отрицательного статуса цоДНК оказалась равна 62 и 100 % соответственно ($p < 0,001$). При цоДНК+ медиана ВБПБ после операции составила 20 мес (95 % ДИ 8,1–31,9), при цоДНК– она не была достигнута (ОР 27,7; 95 % ДИ 6,6–116,6; $p < 0,001$). Пациенты с положительным статусом цоДНК после операции имели худшие показатели ВБПБ, несмотря на проведение адъювантной химиотерапии. При колоректальном раке II стадии и отрицательном цоДНК-статусе после операции в 100 % случаев прогрессирования заболевания не наблюдалось (независимо от проведения адъювантной химиотерапии).

Заключение. Наличие цоДНК до и после операции является негативным прогностическим фактором прогрессирования заболевания при колоректальном раке I–III стадии. Высокое негативное прогностическое значение цоДНК позволяет выбирать пациентов с заболеванием II стадии, не нуждающихся в проведении адъювантной химиотерапии.

Ключевые слова: операбельный колоректальный рак, рак I–III стадии, циркулирующая опухолевая ДНК, адъювантная химиотерапия

Для цитирования: Полянская Е.М., Федянин М.Ю., Боярских У.А. и др. Прогностическое значение наличия в крови циркулирующей опухолевой ДНК как маркера минимального резидуального заболевания при колоректальном раке I–III стадий. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2):32–42. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-32-42.

The prognostic value of circulating in blood tumor DNA as a marker of minimal residual disease in stage I–III colorectal cancer

E.M. Polyanskaya¹, M.Yu. Fedyanin^{1–3}, U.A. Boyarskikh⁴, A.A. Kechin⁴, E.A. Moroz¹, E.A. Khrapov⁴, I.P. Oskorobin⁴, D.V. Shamovskaya⁴, V.A. Aliev¹, Z.Z. Mammadli¹, A.A. Tryakin¹, M.L. Filipenko⁴, S.A. Tyulendin¹

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

²Moscow Multidisciplinary Clinical Center “Kommunarka” of the Moscow Department of Health; 8 Sosenskiy Stan, Moscow, Sosenskoye, Kommunarka 108814, Russia;

³N.I. Pirogov National Medical and Surgical Center, Ministry of Health of Russia; 70 Nizhnyaya Pervomayskaya St., Moscow 105203, Russia;

⁴Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 8 Akademika Lavrentieva Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia

Contacts: Elizaveta Maximovna Polyanskaya Lazimira@mail.ru

Introduction. Studies on non-metastatic colorectal cancer have demonstrated the prognostic role of circulating tumor (ctDNA) after surgery, and the ability to identify patients with the greatest risk of progression. This makes it possible in the future to personalize neoadjuvant and adjuvant treatment.

The study objective – to evaluate the correlation of the ctDNA status before and after surgery with a clinical outcome in patients with stage I–III colorectal cancer.

Materials and methods. The study included data from patients with morphologically verified colorectal cancer with stage I–III who were treated at the N.N. Blokhin National Oncology Research Center in the period from 2016 to 2021. Blood samples were collected before and after surgical treatment (on the 7–10th day after surgery). The minimum permissible concentration at which ctDNA in a plasma sample was considered positive was 0.4 copies of mutant DNA in 1 mL of plasma. The main criterion of effectiveness was disease-free survival (DFS). The presence of cDNA before and after surgery was a negative prognostic factor for progression in stage I–III of CRC. Patients with positive cDNA after surgery had worse DFS results despite adjuvant chemotherapy. Patients with stage II CRC with negative ctDNA, regardless of adjuvant CT after surgery, did not have disease progression in 100 % of cases.

Results. The study included 146 patients with stage I–III colorectal cancer. Progression was detected in 34 patients. The median follow-up time was 22 months (0–66 months). Data on progression were known in 119 patients. Positive cDNA data were detected before surgery in 55 of 120 patients (45 %), after surgery in 46 of 119 (38.6 %). In the group with positive cDNA before surgery, the median DFS was 35 months (95 % confidence interval (CI) 24.0–45.9), in the group with negative cDNA before surgery, the median DFS was not achieved (hazard ratio (HR) 4.6; 95 % CI 2.0–10.4), 1-year DFS in the cDNA positive group was 62 % versus 100 % in the cDNA negative group ($p < 0.001$). In the group with positive cDNA after surgery, the median DFS was 20 months (95 % CI 8.1–31.9), in the group with negative cDNA was not achieved (HR 27.7; 95 % CI 6.6–116.6; $p < 0.001$). Patients with positive cDNA after surgery had worse DFS scores despite adjuvant chemotherapy. Patients with stage II CRC without ctDNA after surgery in 100 % did not have disease progression regardless of adjuvant CT.

Conclusion. The presence of cDNA before and after surgery was a negative prognostic factor of progression after surgical treatment at stage I–III. The high negative prognostic value of cDNA makes it possible to select patients with stage II who do not need adjuvant chemotherapy.

Key words: localized colorectal cancer, stage I–III cancer, circulating tumor DNA, adjuvant therapy

For citation: Polyanskaya E.M., Fedyanin M.Yu., Boyarskikh U.A. et al. The prognostic value of circulating in blood tumor DNA as a marker of minimal residual disease in stage I–III colorectal cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):32–42. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-32-42.

ВВЕДЕНИЕ

По данным GLOBOCAN, в 2020 г. колоректальный рак (КРР) занял 3-е место среди злокачественных новообразований по заболеваемости и 2-е — по смертности [1]. В подавляющем большинстве случаев диагноз КРР удается поставить при I–III стадиях болезни, при которых для минимизации рисков прогрессирования необходимо рассматривать проведение адъювантной химиотерапии (ХТ). Данное лечение показано для всех пациентов с заболеванием II стадии (при наличии факторов неблагоприятного прогноза) и III стадии. Как известно, положительные результаты адъювантной ХТ наблюдаются лишь в 12–18 % случаев. Это означает, что более чем у 80 % пациентов ее проведе-

ние неоправданно [2–4]. Для оптимизации назначения этой терапии необходимо изучать маркеры высокого риска прогрессирования заболевания после радикального лечения.

Большой интерес у исследователей вызывает вопрос о том, позволяет ли выявление циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) после операций определить минимальное резидуальное заболевание (МРЗ). Работы, посвященные неметастатическому КРР, продемонстрировали прогностическое значение анализа цоДНК после хирургического вмешательства. Также ее определение способствует выявлению пациентов с наибольшим риском прогрессирования заболевания. В перспективе это позволит персонализировать как

неoadъювантное [5], так и адъювантное лечение, провести эскалацию или деэскалацию системной терапии, что потенциально может улучшить показатели выживаемости и снизить токсичность лечения [6]. Все перечисленное определило актуальность создания тест-системы по выявлению цоДНК у онкологических пациентов. На 1-м этапе мы обнаружили высокую чувствительность разработанной совместно с коллегами из лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук тест-системы для выявления генетических альтераций в опухолевом материале и плазме крови [7]. Это позволило продолжить исследование по определению прогностической роли цоДНК в плазме крови после хирургического лечения при резектабельных стадиях КРР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе Научно-исследовательского института клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России совместно с лабораторией фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук было проведено проспективное нерандомизированное одноцентровое исследование в рамках экспериментального государственного задания Минздрава России. В него были включены данные пациентов, которые проходили хирургическое лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина в период с 2016 по 2021 г.

Критерием включения в исследование был морфологически подтвержденный КРР I–III стадии, критериями исключения — отсутствие морфологической верификации злокачественного новообразования, опухоли червеобразного отростка, тонкой кишки, а также отсутствие образцов крови или недоступность гистологического материала первичной опухоли для выполнения генетического анализа. В случаях, когда пациентам проводили предоперационную ХТ или химиолучевую терапию, забор крови выполняли до предоперационного лечения. Его осуществляли при локализованном КРР до и после (на 7–10-е сутки после операции) хирургического вмешательства. По каждому пациенту была собрана информация о клинико-морфологических характеристиках опухоли, проведенному лечению и факту развития прогрессирования после терапии, а также определены показатели общей выживаемости.

Выделение ДНК из блока первичной опухоли осуществлялось при помощи набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Германия). Мутации опухоли были определены с использованием секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS). С целью обогащения NGS-библиотеки применяли мультиплексную полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

Для секвенирования библиотек использовали платформу MiniSeq (Illumina, США) и набор реагентов High Output (Illumina, США). В общей сложности были исследованы мутации в 50 генах (*ACVR2A*, *AKT1*, *APC*, *B2M*, *BAX*, *BMPT2*, *BRAF*, *CBFB*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *CTNNA1*, *DOCK3*, *EEF1B2*, *EGFR*, *ERBB2*, *ESR1*, *FAM39B*, *FBXW7*, *FOXA1*, *GATA3*, *GNAS*, *IRF5*, *KEAP1*, *KRAS*, *MB21D2*, *MED12*, *NFE2L2*, *NRAS*, *NRXN3*, *OR5K3*, *PGM5*, *PIK3CA*, *PRPF19*, *RHPN2*, *RNF43*, *RPL22*, *RPSAP58*, *RUNX1*, *SEMA5A*, *SF3B1*, *SMAD4*, *SPTA1*, *TCF7L2*, *TP53*, *TRIM48*, *TTK*, *U2AF1*, *VHL*, *XYLT2*). Выявленные в опухолевом материале мутации в дальнейшем мониторировались в плазме крови. Опухолеспецифические соматические мутации в цоДНК из образцов плазмы крови определяли с помощью ddPCR. Минимально допустимой концентрацией, при которой цоДНК в образце плазмы считали позитивной, была концентрация 0,4 копий мутантного ДНК в 1 мкл плазмы. Более подробное описание процедуры анализа образцов ткани первичной опухоли и цоДНК представлено в ранее опубликованной нашей статье [7].

Основным критерием эффективности лечения являлись показатели выживаемости без признаков заболевания (ВБПБ), вторичными критериями — время до прогрессирования, общая выживаемость (ОВ), частота выявления цоДНК после хирургического лечения. Показатели ВБПБ рассчитывались от даты операции до дат прогрессирования заболевания, смерти от любой причины или последнего наблюдения, показатели ОВ — от даты начала лечения до даты последнего визита пациента к онкологу на основании электронной карты больного, информации из органов записи и актов гражданского состояния, последнего контакта с пациентом по телефону или смерти больного по любой причине.

Для подтверждения прогностического влияния наличия в крови цоДНК на показатели ВБПБ необходимо было принять во внимание, что количество больных с положительным цоДНК-статусом составит 10 % всей популяции. Следовательно, для изменения показателей 1-летней выживаемости без прогрессирования с 60 до 90 % при длительности исследования в 2 года, $\alpha = 0,01$, мощности исследования 90 %, потери данных 10 % пациентов для выполнения статистической гипотезы необходимо включить в исследование минимум 265 больных. Поскольку в ходе промежуточного анализа данных выявлено, что цоДНК после операции наблюдается у 20 % больных, число пациентов, которых необходимо включить в исследование, уменьшилось до 116. Расчет показателей выживаемости проведен с помощью метода Каплана–Майера, сравнительный анализ выживаемости — с использованием логрангового теста. Взаимосвязь определения цоДНК и различных факторов была оценена путем корреляционных и регрессионных анализов. Влияние признаков на прогноз заболевания оценивали с помощью

регрессионного анализа Кокса. Статистический анализ результатов выполняли с использованием программ Microsoft Excel 2016 и IBM SPSS Statistics v. 26, а также онлайн-ресурса <https://www.medcalc.org>.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки МРЗ контроль цоДНК проводили у 146 пациентов с заболеванием I–III стадии. У 33 из них было выявлено прогрессирование заболевания после операции. Медиана времени наблюдения составила 22 мес (1–66 мес). Распределение пациентов в зависимости от статуса цоДНК до и после операции представлено в табл. 1.

Мы проанализировали значимость цоДНК как маркера МРЗ. Статус цоДНК до операции был известен у 120 пациентов (у 19 (15,8 %) – с заболеванием I стадии, у 54 (45,0 %) – с заболеванием II стадии, у 47 (39,2 %) – с заболеванием III стадии), после операции – у 119 пациентов (у 20 (16,8 %) с заболеванием I стадии, у 56

(47,0 %) – с заболеванием II стадии, у 43 (36,2 %) – с заболеванием III стадии). До операции положительный цоДНК-статус выявлен у 55 из 120 (45 %) больных, после операции – у 46 из 119 (38,6 %) (табл. 2). Данные о прогрессировании заболевания были известны по 119 пациентам. Сведения о прогрессировании опухоли при выявлении МРЗ в зависимости от статуса цоДНК и стадии заболевания представлены в табл. 3.

У 24 из 33 (72,7 %) больных с прогрессированием заболевания до операции был выявлен положительный цоДНК-статус (95 % доверительный интервал (ДИ) 54,5–86,7 %). Отрицательный цоДНК-статус до операции обнаружен у 56 из 87 (64,4 %) пациентов без прогрессирования (95 % ДИ 53,4–74,4 %) ($p < 0,001$). У 30 из 33 (90,9 %) больных с прогрессированием заболевания после операции выявлен положительный цоДНК-статус (95 % ДИ 75,7–98,0 %), у 70 из 86 (81,4 %) больных без прогрессирования – отрицательный (95 % ДИ 71,5–88,9 %) ($p < 0,001$).

Таблица 1. Распределение пациентов с колоректальным раком (КРР) I–III стадии в зависимости от статуса циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) до и после операции

Table 1. Distribution of patients with stage I–III colorectal cancer (CRC) depending on their circulating tumor DNA status (ctDNA) before and after surgery

Параметр Parameter	Всего пациентов (n = 146) Total number of patients (n = 146)	Статус цоДНК до операции (n = 120) Preoperative ctDNA status (n = 120)			Статус цоДНК после операции (n = 119) Postoperative ctDNA status (n = 119)		
		цоДНК– (n = 65; 54,2%) ctDNA– (n = 65; 54,2%)	цоДНК+ (n = 55; 45,8%) ctDNA+ (n = 55; 45,8%)	p	цоДНК– (n = 73; 61,3%) ctDNA– (n = 73; 61,3%)	цоДНК+ (n = 46; 38,6%) ctDNA+ (n = 46; 38,6%)	p
Стадия по классификации Tumor, Nodus и Metastasis (TNM) 8-го пересмотра, абс. (%): Tumor, nodus and metastasis (TNM) stage (8 th edition), abs. (%):							
I	25	10	9	1,0	12	7	1,0
II	66	27	27	0,63	36	20	0,74
IIA без факторов риска IIA without risk factors	33	14	7	0,35	16	6	0,6
IIA с 1 фактором риска IIA with 1 risk factor	18	8	10	0,46	11	7	0,79
IIA с ≥2 факторами риска IIA with ≥2 risk factors	8	4	5	0,73	6	3	1,0
IIIB	7	1	5	0,1	2	4	0,19
III	55	28	19	0,6	25	19	0,71
T-стадия, абс. (%): T stage, abs. (%):							
1	6 (4,1)	2 (3,1)	3 (5,5)	0,66	4 (5,5)	2 (4,3)	1,0
2	27 (18,5)	11 (16,9)	9 (16,4)	1,0	14 (19,2)	7 (15,2)	0,8
3	96 (65,8)	46 (70,7)	35 (63,6)	0,77	50 (68,5)	30 (65,2)	0,88
4	17 (11,6)	6 (9,2)	8 (14,5)	0,56	5 (6,8)	7 (15,3)	0,22
N-стадия, абс. (%): N stage, abs. (%):							
0	91 (65,8)	38 (58,4)	35 (63,6)	0,88	47 (64,4)	28 (65,1)	0,22
1	40 (27,4)	21 (32,3)	13 (23,6)	0,65	20 (27,4)	12 (27,9)	1,00
2	15 (10,3)	6 (9,2)	7 (12,7)	0,77	6 (8,2)	6 (14)	0,54
Возраст (медиана), лет Age (median), years	62 (28–87)	60 (22–87)	63 (35–81)	1,00	62 (22–87)	61 (37–82)	1,00

Окончание табл. 1

The end of table 1

Параметр Parameter	Всего пациентов (n = 146) Total number of patients (n = 146)	Статус цоДНК до операции (n = 120) Preoperative ctDNA status (n = 120)			Статус цоДНК после операции (n = 119) Postoperative ctDNA status (n = 119)		
		цоДНК– (n = 65; 54,2%) ctDNA– (n = 65; 54,2%)	цоДНК+ (n = 55; 45,8%) ctDNA+ (n = 55; 45,8%)	p	цоДНК– (n = 73; 61,3%) ctDNA– (n = 73; 61,3%)	цоДНК+ (n = 46; 38,6%) ctDNA+ (n = 46; 38,6%)	p
Пол, абс. (%): Sex, abs. (%):							
женский female	72 (49,3)	36 (55,4)	25 (45,5)	0,63	36 (49,3)	21 (45,7)	0,86
мужской male	74 (50,7)	29 (44,6)	30 (54,5)	0,63	37 (50,7)	25 (54,3)	0,87
Локализация, абс. (%): Tumor location, abs. (%):							
правые отделы толстой кишки right colon	37 (25,3)	18 (27,7)	11 (20)	0,53	17 (23,3)	10 (21,8)	1,00
левые отделы толстой кишки left colon	61 (41,8)	24 (36,9)	23 (41,8)	0,73	31 (42,5)	18 (39,1)	0,86
прямая кишка rectum	48 (32,9)	23 (35,3)	21 (38,2)	0,86	25 (34,2)	18 (39,1)	0,72
Гистологический тип опухоли, абс. (%): Histological tumor type, abs. (%):							
аденокарцинома adenocarcinoma	142 (97,3)	63 (96,9)	54 (98,2)	1,00	70 (95,9)	46 (100)	0,89
муцинозная аденокарцинома mucinous adenocarcinoma	4 (2,7)	2 (3,1)	1 (1,8)	1,00	3 (4,1)	0 (0)	0,29
Степень дифференцировки, абс. (%): Tumor grade, abs. (%):							
низкая степень злокачественности (G ₁₋₂) low grade (G ₁₋₂)	133 (91,1)	60 (92,3)	50 (90,9)	1,00	67 (91,8)	44 (95,7)	0,89
высокая степень злокачественности (G ₃₋₄) high grade (G ₃₋₄)	13 (8,9)	5 (7,7)	5 (9,1)	1,00	6 (8,2)	2 (4,3)	0,70

Таблица 2. Прогрессирование опухоли у пациентов с колоректальным раком I–III стадии (n = 119) при выявлении минимального резидуального заболевания (МРЗ) в зависимости от статуса циркулирующей опухолевой ДНК

Table 2. Disease progression in patients with stage I–III colorectal cancer (n = 119) and minimal residual disease (MRD) depending on their circulating tumor DNA (ctDNA) status

Статус цоДНК ctDNA status	Без прогрессирования, абс. (%) No progression, abs. (%)	С прогрессированием, абс. (%) Progression, abs. (%)	Статус цоДНК ctDNA status
До операции Preoperative			
цоДНК– ctDNA–	56 (64,4)	9 (27,3)	цоДНК– цоДНК+ ctDNA+
цоДНК+ ctDNA+	31 (35,6)	24 (72,7)	
После операции (МРЗ – 38%) Postoperative (MRP – 38%)			
цоДНК– ctDNA –	70 (81,4)	3 (9,1)	цоДНК– ctDNA–
цоДНК+ ctDNA+	16 (18,6)	30 (90,9)	

Таблица 3. Прогрессирование опухоли при выявлении минимального резидуального заболевания (МРЗ) в зависимости от статуса циркулирующей опухолевой ДНК (цОДНК) после операции и стадии заболевания

Table 3. Disease progression in patients with minimal residual disease (MRD) depending on their postoperative circulating tumor DNA (ctDNA) status and disease stage

Статус цОДНК ctDNA status	Без прогрессирования, абс. (%) No progression, abs. (%)	С прогрессированием, абс. (%) Progression, abs. (%)	p
I стадия (n = 20): Stage I (n = 20): цОДНК– ctDNA– цОДНК+ ctDNA+	13 (72,2) 4 (27,7)	0 (0) 3 (100)	0,025
II стадия (n = 56; МРЗ – 35%): Stage II (n = 56; МРЗ – 35%): цОДНК– ctDNA– цОДНК+ ctDNA+	36 (83,7) 7 (16,3)	0 (0) 13 (100)	<0,001
III стадия (n = 43; МРЗ – 44%): Stage III (n = 43; МРЗ – 44%): цОДНК– ctDNA– цОДНК+ ctDNA+	21 (80,8) 5 (19,2)	3 (17,6) 14 (82,4)	<0,001

Чувствительность тест-системы для определения цОДНК при выявлении прогрессирования при КРР I–III стадии до и после операции составила 72,7 % (95 % ДИ 54,5–86,7 %) и 90,9 % (95 % ДИ 75,7–98,0 %) соответственно, специфичность – 64,4 % (95 % ДИ 53,6–74,4 %) и 81,4 % (95 % ДИ 71,5–88,9 %) соответственно, прогностическая ценность положительного результата – 43,6 % (95 % ДИ 35,3–52,4 %) и 65,2 % (95 % ДИ 54,3–74,7 %) соответственно, прогностическая ценность отрицательного результата – 86,2 % (95 % ДИ 77,7–91,7 %) и 95,9 % (95 % ДИ 88,8–98,5 %) соответственно, точность – 66,7 % (95 % ДИ 57,5–75 %) и 84,0 % (95 % ДИ 76,2–90,1 %) соответственно.

Влияние выявления циркулирующей опухолевой ДНК на выживаемость пациентов. При оценке ВБПБ в зависимости от статуса цОДНК выявлено, что у пациентов с цОДНК+ до операции медиана этого показателя составила 35 мес (95 % ДИ 24–45,9), а у пациентов с цОДНК– она не была достигнута (ОР 4,6; 95 % ДИ 2,0–10,4) ($p < 0,001$) (рис. 1).

У пациентов с положительным цОДНК-статусом после операции медиана ВБПБ составила 20 мес (95 % ДИ 8,14–31,9), при отрицательном – она не была достигнута (ОР 27,7; 95 % ДИ 6,6–116,6) ($p < 0,001$) (рис. 2). При проведении многофакторного анализа наличие

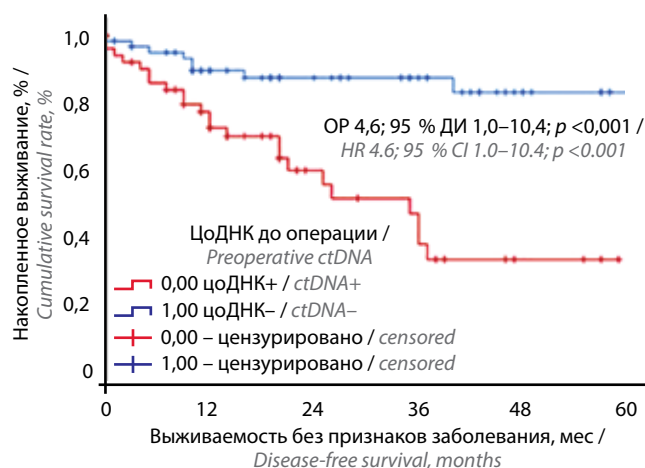


Рис. 1. Выживаемость без признаков заболевания в зависимости от наличия циркулирующей опухолевой ДНК до операции у пациентов с колоректальным раком I–III стадии. ОР – отношение рисков; ДИ – доверительный интервал; цОДНК – циркулирующая опухолевая ДНК
Fig. 1. Disease-free survival of patients with stage I–III colorectal cancer depending on their preoperative circulating tumor DNA status. HR – hazard ratio; CI – confidence interval; ctDNA – circulating tumor DNA

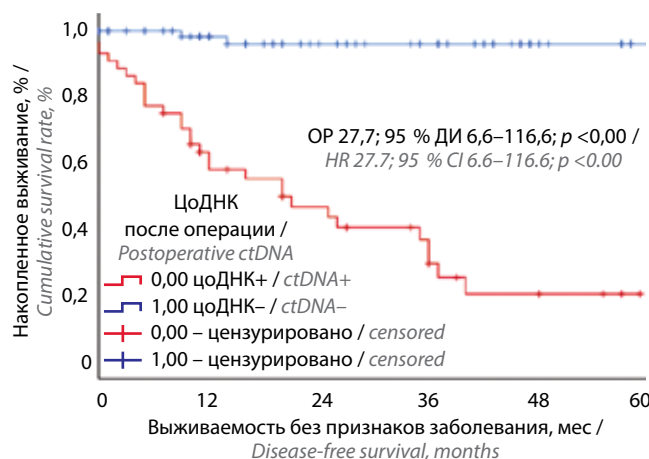


Рис. 2. Выживаемость без признаков заболевания в зависимости от наличия циркулирующей опухолевой ДНК после операции у пациентов с колоректальным раком I–III стадии. ОР – отношение рисков; ДИ – доверительный интервал; цОДНК – циркулирующая опухолевая ДНК
Fig. 2. Disease-free survival of patients with stage I–III colorectal cancer depending on their postoperative circulating tumor DNA status. HR – hazard ratio; CI – confidence interval; ctDNA – circulating tumor DNA

в крови цОДНК после операции явилось независимым предиктором прогрессирования заболевания при КРР I–III стадии (регрессионный β -коэффициент = 3,048; ОР 21,07; 95 % ДИ 4,85–91,54; $p < 0,001$).

В табл. 4 представлены показатели 1-, 2- и 3-летней ВБПБ при КРР I–III стадии в зависимости от уровня цОДНК в крови до и после операции.

Статистически значимых различий показателей ОВ в зависимости от уровня цОДНК до (ОР 0,75; 95 % ДИ 0,19–3,04; $p = 0,69$) и после операции (ОР 1,39; 95 % ДИ 0,37–5,20; $p = 0,62$) при КРР I–III стадии выявлено не было. В группе положительной цОДНК после операции умерли 4 пациента, в группе отрицательной цОДНК – также 4 пациента.

Прогностическая роль динамики циркулирующей опухолевой ДНК до и после операции. Пациенты, у которых выявляли наличие цоДНК для определения МРЗ, были разделены на 4 группы в зависимости от динамики изменений уровня цоДНК. В 1-ю группу вошли больные с отрицательным цоДНК-статусом

Таблица 4. Выживаемость без признаков болезни в зависимости от статуса циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) до и после операции

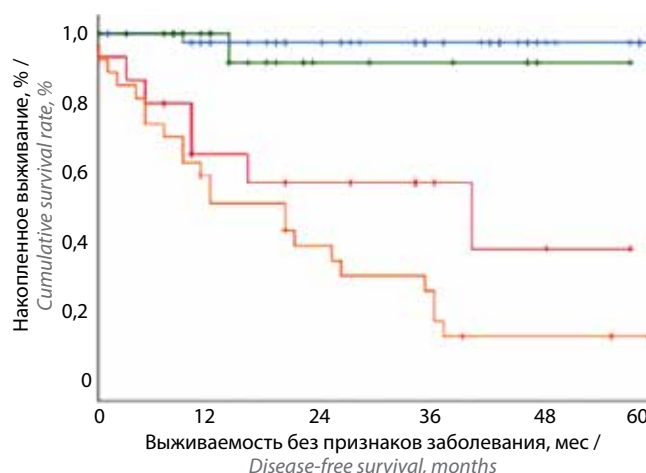
Table 4. Disease-free survival (DFS) depending on the circulating tumor DNA status (ctDNA) before and after surgery

Стадия Stage	1-летняя, % 1-year, %	2-летняя, % 2-year, %	3-летняя, % 3-year, %
ЦоДНК+ до операции ctDNA+ before surgery			
I	70	35	35
II	72	66	45
III	63	54	27
ЦоДНК– до операции ctDNA– after surgery			
I	100	100	100
II	91	91	91
III	84	78	78
ЦоДНК+ после операции ctDNA+ before surgery			
I	62	41	41
II	52	46	27
III	62	49	29
ЦоДНК– после операции ctDNA– after surgery			
I	100	100	100
II	100	100	100
III	94	87	87

Таблица 5. Изменение уровня циркулирующей опухолевой ДНК до и после операции

Table 5. Changes in the level of circulating tumor DNA before and after surgery

Циркулирующая опухолевая ДНК до операции Preoperative circulating tumor DNA status	Циркулирующая опухолевая ДНК после операции Postoperative circulating tumor DNA status	I стадия (n = 18), абс. (%) Stage I (n = 18), abs. (%)	II стадия (n = 52), абс. (%) Stage II (n = 52), abs. (%)	III стадия (n = 42), абс. (%) Stage III (n = 42), abs. (%)	Всего (n = 112), абс. (%) Total (n = 112), abs. (%)
–	–	7 (38,9)	22 (42,3)	16 (38,1)	45 (40,2)
–	+	2 (11,1)	5 (9,6)	9 (21,4)	16 (14,3)
+	–	4 (22,2)	12 (23,1)	7 (16,7)	23 (20,5)
+	+	5 (27,8)	13 (25)	10 (23,8)	28 (25)

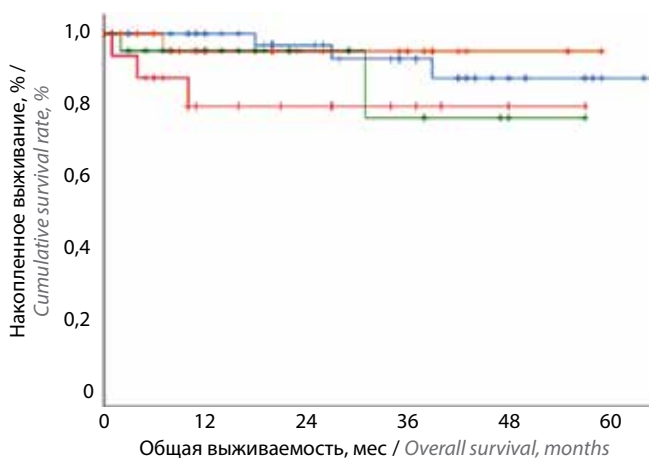


- 1,00 – цоДНК– до операции и после нее / ctDNA– before and after surgery
- 2,00 – цоДНК– до операции, цоДНК+ после нее / ctDNA– before surgery and ctDNA+ after surgery
- 3,00 – цоДНК+ до операции, цоДНК– после нее / ctDNA+ before surgery and ctDNA– after surgery
- 4,00 – цоДНК+ до операции, цоДНК+ после нее / ctDNA+ before and after surgery
- + 1,00 – цензурировано / censored
- + 2,00 – цензурировано / censored
- + 3,00 – цензурировано / censored
- + 4,00 – цензурировано / censored

Рис. 3. Выживаемость без признаков заболевания в зависимости от изменения уровня циркулирующей опухолевой ДНК до и после операции при колоректальном раке I–III стадии. ЦоДНК – циркулирующая опухолевая ДНК

Fig. 3. Disease-free survival of patients with stage I–III colorectal cancer depending on their changes in the circulating tumor DNA level before and after surgery. ctDNA – circulating tumor DNA

и до, и после операции, во 2-ю – те, у кого до операции он был отрицательным, а после нее стал положительным, в 3-ю – с наличием цоДНК до хирургического вмешательства и отсутствием после него, в 4-ю – с положительным цоДНК-статусом и до, и после операции. Данные о динамике цоДНК до и после хирургического вмешательства имелись у 112 пациентов (табл. 5).



- 1,00 – цоДНК– до операции и после нее / ctDNA– before and after surgery
- 2,00 – цоДНК– до операции, цоДНК+ после нее / ctDNA– before surgery and ctDNA+ after surgery
- 3,00 – цоДНК+ до операции, цоДНК– после нее / ctDNA+ before surgery and ctDNA– after surgery
- 4,00 – цоДНК+ до операции, цоДНК+ после нее / ctDNA+ before and after surgery
- 1,00 – цензурировано / censored
- 2,00 – цензурировано / censored
- 3,00 – цензурировано / censored
- 4,00 – цензурировано / censored

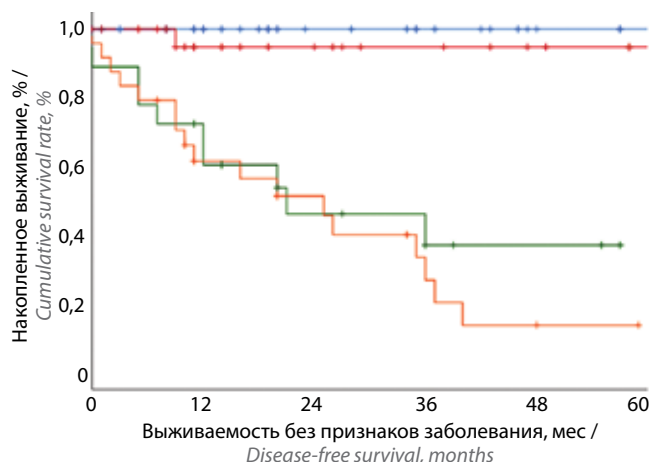
Рис. 4. Общая выживаемость пациентов с колоректальным раком I–III стадии в зависимости от динамики циркулирующей опухолевой ДНК до и после операции при выявлении минимального резидуального заболевания. ЦоДНК – циркулирующая опухолевая ДНК

Fig. 4. Overall survival of patients with stage I–III colorectal cancer and minimal residual disease depending on their dynamics of circulating tumor DNA (ctDNA) before and after surgery. ctDNA – circulating tumor DNA

В 1-й и 3-й группах медиана ВБПБ достигнута не была, во 2-й группе она составила 40 мес (95 % ДИ 0–84,3), в 4-й – 20 мес (95 % ДИ 9,2–30,8). Отношение рисков 2,6 (95 % ДИ 1,7–3,8; $p < 0,001$) (рис. 3). При заболевании I–III стадии динамика изменения цоДНК не влияла на ОВ (ОР 0,97; 95 % ДИ 0,57–1,6; $p = 0,91$), что, скорее всего, связано с небольшим числом событий ($n = 8$) (рис. 4).

Эффективность адъювантной химиотерапии в зависимости от выявления циркулирующей опухолевой ДНК после операции. У 105 пациентов с I–III стадией заболевания было оценено влияние цоДНК на ВБПБ после операции в зависимости от проведения адъювантной ХТ. У больных с отрицательным цоДНК-статусом не выявлено улучшения показателей ВБПБ при проведении адъювантной ХТ ($p = 0,16$). Медиана ВБПБ при отрицательной цоДНК вне зависимости от проведения адъювантной ХТ не была достигнута. У пациентов с положительным цоДНК-статусом также не было обнаружено статистически значимых различий в показателях ВБПБ ($p = 0,33$) (рис. 5).

При КРР II стадии значимых различий в ВБПБ в группе адъювантной ХТ и группе без ее использования выявлено не было. У всех пациентов с отрицательным



- 1,00 – цоДНК–, АХТ– / ctDNA–, ACT–
- 2,00 – цоДНК–, АХТ+ / ctDNA–, ACT+
- 3,00 – цоДНК+, АХТ– / ctDNA+, ACT–
- 4,00 – цоДНК+, АХТ+ / ctDNA+, ACT+
- 1,00 – цензурировано / censored
- 2,00 – цензурировано / censored
- 3,00 – цензурировано / censored
- 4,00 – цензурировано / censored

Рис. 5. Выживаемость без признаков заболевания в зависимости от наличия циркулирующей ДНК после операции и проведения адъювантной химиотерапии при колоректальном раке I–III стадии. АХТ – адъювантная химиотерапия; цоДНК – циркулирующая опухолевая ДНК

цоДНК-статусом не наблюдалось прогрессирования заболевания независимо от проведения данной терапии (рис. 6).

Число пациентов с III стадией КРР без проведения адъювантной ХТ было незначительным, поэтому проведение анализа различий в ВБПБ в зависимости от назначения АХТ при III стадии неинформативно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Были проанализированы данные 25 (17,1 %) пациентов с КРР I стадии, 66 (45,2 %) – с КРР II стадии и 55 (37,7 %) – с КРР III стадии. В нашем исследовании положительный цоДНК-статус до операции выявлен в 45 % случаев, после операции – в 38,6 %. Частота обнаружения цоДНК до операции согласуется с ранними исследованиями [8]. После операции в нашем исследовании данный показатель был выше. Возможно, это объясняется ранним забором крови для определения цоДНК после операции (медиана – на 7-е сутки). Так, например, в исследовании J. Tie и соавт. [9] средний срок забора крови после операции при КРР III стадии составил 42 дня. При этом положительный цоДНК-статус после операции определялся у 21 % пациентов. В исследовании E. Oki и соавт., [10] несмотря на то что забор крови после операции в среднем проводился через 46 нед (через 12–97 нед), при КРР II стадии положительный цоДНК-статус был

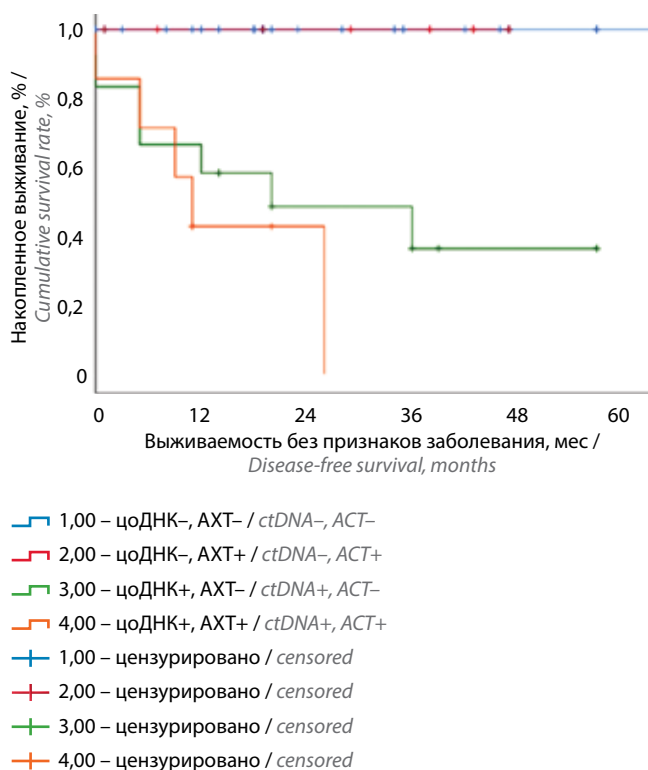


Рис. 6. Выживаемость без признаков заболевания в зависимости от наличия циркулирующей опухолевой ДНК после операции и проведения адъювантной химиотерапии при колоректальном раке II стадии
Fig. 6. Disease-free survival depending on the postoperative circulating tumor DNA status and adjuvant chemotherapy in patients with stage II colorectal cancer

обнаружен у большего числа больных – в 34,8 % случаев. Также в исследовании S. McNamara и соавт. [11], опубликованном в 2022 г., при выявлении МРЗ с помощью сверхглубокого секвенирования ДНК, выделенной из плазмы крови при КРР II–III стадии через 1–34 дня после R0-резекции (медиана 7 дней), чувствительность метода составила 44 %, специфичность – 94 %.

Еще одним объяснением расхождения данных о частоте выявления цоДНК может быть пороговое значение ее уровня, принятое за положительное, а также метод определения этого маркера. Как и в большинстве исследований [8–19], в ходе которых применялись различные тест-системы для определения цоДНК, в нашей работе показано независимое прогностическое значение наличия цоДНК после операции.

Так, в ходе оценки прогностического значения цоДНК как маркера МРЗ при КРР I–III стадии положительный цоДНК-статус после операции выявлен у 90,9 % пациентов с прогрессированием заболевания (95 % ДИ 77,7–97,4 %), отрицательный цоДНК-статус при отсутствии прогрессирования заболевания – у 81,4 % (95 % ДИ 72,6–89,0 %). Это согласуется с данными T. Reinert и соавт. [15]. В их исследовании при цоДНК+ чувствительность тест-системы для определения рецидивов составила 87,5 %. В отличие от других исследований частота выявления прогрессирования

в группе положительной цоДНК в нашей работе была выше, что обусловлено большим числом пациентов с заболеванием III стадии в выборке.

Мы проанализировали эффективность адъювантной терапии при различных значениях цоДНК. Было выявлено, что послеоперационное лечение не улучшало показатели выживаемости больных независимо от стадии заболевания. Эти данные несколько отличаются от результатов других работ. Так, в ходе поданализа исследования III фазы IDEA-France, в котором сравнивали эффективность адъювантной ХТ через 3 и 6 мес у пациентов с КРР III стадии, положительным цоДНК-статусом и благоприятным прогнозом (pT1–3N1), было выявлено, что проведение адъювантной ХТ в течение 6 мес улучшало показатели ВБПБ [17]. В группе больных с неблагоприятным прогнозом эффективность такой терапии была выше независимо от уровня цоДНК. Эти различия могут быть обусловлены методом выявления цоДНК, использованным французскими авторами (метилирование генов *WIFI* и *NPY*), и особенностями дизайна исследования (всем пациентам проводили адъювантную ХТ). Более приближены к полученным нами данным результаты поданализа исследования GALAXY. Оно показало, что адъювантная ХТ при положительном цоДНК-статусе была эффективной независимо от стадии заболевания. Однако при отрицательном цоДНК-статусе адъювантная ХТ не улучшала результаты хирургического лечения, что было показано и в нашей работе.

Полученные данные согласуются с результатами исследования J. Tie и соавт. [14] и свидетельствуют о возможности отказа от адъювантной ХТ в группе отрицательного цоДНК-статуса как минимум при КРР II стадии. Мы выявили, что прогноз пациентов с цоДНК+ после операции был плохим независимо от уровня этого показателя до операции. Аналогично при цоДНК– после операции независимо от уровня цоДНК до нее наблюдался благоприятный прогноз. Похожие результаты получены и в исследовании IDEA-France [17].

Статистически значимых различий в ОВ в зависимости от уровня цоДНК не было получено ни до (ОР 0,75; 95 % ДИ 0,19–3,04; $p = 0,69$), ни после операции (ОР 1,39; 95 % ДИ 0,37–5,2; $p = 0,62$) в отличие от post-hoc анализа исследования IDEA-France, согласно данным которого при КРР III стадии положительный цоДНК-статус имел негативное влияние на показатели ОВ (ОР 1,65; 95 % ДИ 1,12–2,43; $p = 0,011$) [17]. В данном случае это, скорее всего, связано с малым числом событий в нашем исследовании ($n = 8$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружение цоДНК до и после операции является негативным прогностическим признаком прогрессирования при КРР I–III стадии. Наличие цоДНК после операции является независимым прогностическим признаком прогрессирования заболевания.

У пациентов с положительным цоДНК-статусом после операции наблюдались худшие показатели ВБПБ, несмотря на проведение адъювантной ХТ, тогда как у всех больных с КРР II стадии и отрицательным цоДНК-статусом после операции прогрессирования заболева-

ния не было выявлено независимо от того, получали они адъювантную ХТ или нет. Эти результаты свидетельствуют о возможности отказа от проведения адъювантной ХТ в группе пациентов с отрицательным цоДНК-статусом и КРР II стадии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Ferlay J. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer J Clin* 2021;71(3):209–24. DOI: 10.3322/caac.21660.
2. Auclin E., Zaanen A., Vernerey D. et al. Subgroups and prognostication in stage III colon cancer: future perspectives for adjuvant therapy. *Ann Oncol* 2017;28(5):958–68. DOI: 10.1093/annonc/mdx030.
3. Sobrero A.F., Puccini A., Shi Q. et al. A new prognostic and predictive tool for shared decision making in stage III colon cancer. *Eur J Cancer* 2020;138:182–8. DOI: 10.1016/j.ejca.2020.07.031.
4. André T., de Gramont A., Vernerey D. et al. Adjuvant fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in stage ii to iii colon cancer: updated 10-year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC Study. *J Clin Oncol* 2015;33(35):4176–87. DOI: 10.1200/JCO.2015.63.4238.
5. Khakoo S., Carter P.D., Brown G. et al. MRI tumor regression grade and circulating tumor DNA as complementary tools to assess response and guide therapy adaptation in rectal cancer. *Clin Cancer Res* 2020;26(1):183–92. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1996.
6. Naidoo M., Gibbs P., Tie J. ctDNA and adjuvant therapy for colorectal cancer: time to re-invent our treatment paradigm. *Cancers* 2021;13(2):346. DOI: 10.3390/cancers13020346.
7. Полянская Е.М., Федянин М.Ю., Боярских У.А. и др. Оценка конкурентности мутационного статуса опухолевого материала и циркулирующей в крови опухолевой ДНК при колоректальном раке. *Тазовая хирургия и онкология* 2022;12(1):27–34. [Polyanskaya E.M., Fedyanin M.Yu., Boyarskikh U.A. et al. Concordance between the tumor mutational status and circulating tumor DNA in patients with colorectal cancer. *Tazovaya Khirurgiya i Onkologiya = Pelvic Surgery and Oncology* 2022;12(1):27–34. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2686-9594-2022-12-1-27-34.
8. Bettgeowda C., Sausen M., Leary R.J. et al. Detection of circulating tumor dna in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014;6(224):224ra24. DOI: 10.1126/scitranslmed.3007094.
9. Tie J., Cohen J.D., Wang Y. et al. Circulating tumor DNA analyses as markers of recurrence risk and benefit of adjuvant therapy for stage III colon cancer. *JAMA Oncol* 2019;5(12):1710. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.3616.
10. Oki E., Ando K., Hisamatsu Y. et al. Plasma-informed minimal residual disease (MRD) assay: A multicenter prospective study in Japanese patients with stage II colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2022;40(4_suppl):161. DOI: 10.1200/JCO.2022.40.4_suppl.161.
11. McNamara S., Patel R.D., Adams H.P. et al. Detection of minimal residual disease (MRD) in colorectal cancer (CRC) patients UICC stage II/III by ultra-deep sequencing of cfDNA from post-surgery plasma. *J Clin Oncol* 2022;40(4_suppl):26. DOI: 10.1200/JCO.2022.40.4_suppl.026.
12. Phallen J., Sausen M., Adleff V. et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 2017;9(403):eaan2415. DOI: 10.1126/scitranslmed.aan2415.
13. Schöler L.V., Reinert T., Ørntoft M.B.W. et al. Clinical implications of monitoring circulating tumor dna in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23(18):5437–45. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0510.
14. Tie J., Wang Y., Tomasetti C. et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016;8(346):346ra92. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf6219.
15. Reinert T., Henriksen T.V., Christensen E. et al. Analysis of plasma cell-free dna by ultradeep sequencing in patients with stages I to III Colorectal Cancer. *JAMA Oncol* 2019;5(8):1124. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.0528.
16. Lumish M.A., Jayakumaran G., Fox M. et al. Frequency of minimal residual disease as measured by ctDNA in mismatch repair deficient tumors following curative resection. *J Clin Oncol* 2021;39(15_suppl):e14520. DOI: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.e14520.
17. Taieb J., Taly V., Henriques J. et al. Prognostic value and relation with adjuvant treatment duration of ctDNA in stage III colon cancer: a post hoc analysis of the PRODIGE-GERCOR IDEA-France Trial. *Clin Cancer Res* 2021;27(20):5638–46. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-0271.
18. Gu J., Lei F., Wang X. et al. Circulating tumor DNA analysis predicting recurrence risk in patients with stage I–III colorectal cancer. *Ann Oncol* 2021;32:S561. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.08.979.
19. Kotaka M., Shirasu H., Watanabe J. et al. Association of circulating tumor DNA dynamics with clinical outcomes in the adjuvant setting for patients with colorectal cancer from an observational GALAXY study in CIRCULATE-Japan. *J Clin Oncol* 2022;40(4_suppl):9. DOI: 10.1200/JCO.2022.40.4_suppl.009.

Вклад авторов

Е.М. Полянская: сбор и анализ данных, статистический анализ данных, написание текста статьи;
 М.Ю. Федянин: разработка дизайна и концепции исследования, координация исследования, редактирование статьи;
 У.А. Боярских, А.А. Кечин, Е.А. Храпов, И.П. Оскоробин, Д.В. Шамовская: определение цоДНК, мутационного статуса цоДНК и ткани первичной опухоли;
 Е.А. Мороз: сбор гистологических образцов, проведение гистологических исследований первичной опухоли;
 В.А. Алиев, З.З. Мамедли: хирургическое лечение больных, сбор биологических образцов, материала для анализа;
 А.А. Трякин, С.А. Тюляндин: редактирование статьи;
 М.Л. Филипенко: координирование исследования.

Authors' contribution

E.M. Polyanskaya: data collection and analysis, statistical data analysis, article writing;
 M.Y. Fedyanin: development of the design and concept of the study, research coordination, article editing;
 U.A. Boyarskikh, A.A. Kechin, E.A. Khrapov, I.P. Oskorobin, D.V. Shamovskaya: determination of DNA, mutational status of ctDNA and primary tumor tissue;
 E.A. Moroz: collecting histological samples, conducting histological studies of the primary tumor;
 V.A. Aliyev, Z.Z. Mammadli: surgical treatment of patients, collection of biological samples, material for analysis;
 A.A. Tryakin, S.A. Tyulyandin: article editing;
 M.L. Filipenko: coordination of research.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.М. Полянская / E.M. Polyanskaya: <https://orcid.org/0000-0001-7193-1169>
 М.Ю. Федянин / M.Yu. Fedyanin: <https://orcid.org/0000-0001-5615-7806>
 З.З. Мамедли / Z.Z. Mammadli: <https://orcid.org/0000-0002-9289-1247>
 А.А. Трякин / A.A. Trykin: <https://orcid.org/0000-0003-0428-260X>
 С.А. Тюляндин / S.A. Tyulyandin: <https://orcid.org/0000-0001-9807-2229>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено в рамках экспериментального государственного задания Минздрава России.

Financing. The study was conducted as part of an experimental state task of the Ministry of Health of Russia.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированные согласия перед забором крови.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

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

All patients signed informed consent before blood collection.

Статья поступила: 31.03.2022. **Принята к публикации:** 05.05.2022.

Article submitted: 31.03.2022. **Accepted for publication:** 05.05.2022.

Молекулярная гетерогенность и анализ отдаленной выживаемости пациентов с гастроинтестинальными стромальными опухолями

Н.Н. Мазуренко, В.В. Югай, И.В. Цыганова, М.П. Никулин, П.П. Архири, О.А. Анурова, Н.А. Козлов, И.С. Стилиди

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

Контакты: Наталья Николаевна Мазуренко nnmazurenko@mail.ru

Введение. Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) – наиболее частые мезенхимальные опухоли желудочно-кишечного тракта, диагностической особенностью которых, является экспрессия CD117 (KIT). Гастроинтестинальные стромальные опухоли отличаются широким спектром генетических нарушений, которые имеют предиктивное и прогностическое значение.

Цель исследования – изучение клинко-морфологических и генетических характеристик ГИСО для оценки общей выживаемости (ОВ) пациентов с различным профилем генетических нарушений.

Материалы и методы. Проанализированы клинко-морфологические особенности и мутационный статус *KIT*, *PDGFRA* и *BRAF* у 244 пациентов с ГИСО, получавших комбинированное лечение. Дефицит SDH в ГИСО определяли по экспрессии SDHB с помощью иммуногистохимического анализа.

Результаты. Стромальные опухоли встречались в желудке (50 %), тонкой кишке (37,7 %), толстой кишке (8,6 %), пищеводе (0,4 %) и экстраоргано (ЭГИСО; 5,7 %). Выживаемость выше при локализации опухоли в желудке ($p = 0,005$), коррелирует с размером опухоли ($p = 0,0001$) и количеством митозов ($p = 0,007$). Мутации в 9, 11, 13 и 17-м экзонах *KIT* выявлены в 168 (68,9 %) ГИСО, мутации в 12 и 18-м экзонах *PDGFRA* – в 31 (12,1 %) ГИСО, обнаружены 14 новых мутаций. В 140 (57,4 %) ГИСО выявлены мутации в 11-м экзоне *KIT*, 10-летняя ОВ пациентов составила 51 %, медиана 124 мес. Общая выживаемость пациентов с делециями ниже ($p = 0,023$), чем с заменами и дупликациями в 11-м экзоне *KIT*. Самая низкая ОВ отмечена у пациентов с первичными мутациями в 13-м или 17-м экзонах *KIT* (медиана 28 мес) и дупликациями в 9-м экзоне *KIT* (медиана 71 мес). Низкие показатели ОВ выявлены у молодых пациентов с гомозиготными мутациями *KIT*, мутациями, начинающимися в интроне, и двумя одновременными мутациями *KIT*. Опухоли с мутациями *PDGFRA* располагались в желудке, не метастазировали, 10-летняя ОВ составила 63 %, медиана 175 мес. Мутации *KIT*/*PDGFRA* не обнаружены у 45 пациентов (ГИСО дикого типа); 10-летняя ОВ составила 59 %, медиана 250 мес. Выявлены ГИСО дикого типа с мутациями *BRAF*, *NF1*, дефицитом SDH. Лучшие показатели ОВ отмечены у пациентов с мутацией BRAFV600E (10-летняя ОВ – 84 %; медиана 97 мес) и с дефицитом SDH (10- и 15-летняя ОВ – 82 %).

Заключение. Генетический анализ необходим для уточнения прогноза ГИСО и предсказания эффективности таргетной терапии. Подтверждено клинко-морфологическое и генетическое многообразие ГИСО, впервые в российской популяции выявлены ГИСО дикого типа с мутациями *BRAF* и дефицитом SDHB, впервые оценена 10- и 15-летняя ОВ пациентов с комбинированным лечением.

Ключевые слова: гастроинтестинальные стромальные опухоли, мутации *KIT*, *PDGFRA*, *BRAF*, дефицит SDH, общая выживаемость, прогноз

Для цитирования: Мазуренко Н.Н., Югай В.В., Цыганова И.В. и др. Молекулярная гетерогенность и анализ отдаленной выживаемости пациентов с гастроинтестинальными стромальными опухолями. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2):43–57. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-43-57.

Molecular heterogeneity and analysis of the long-term survival of patients with gastrointestinal stromal tumors

N.N. Mazurenko, V.V. Yugay, I.V. Tsyganova, M.P. Nikulin, P.P. Arkhiri, O.A. Anurova, N.A. Kozlov, I.S. Stilidi

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

Contacts: Natalia Nikolaevna Mazurenko nnmazurenko@mail.ru

Introduction. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are the most common mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract the character diagnostic feature of which is CD117 (KIT) expression. GISTs are clinically diverse and have different genetic alterations that may have predictive and prognostic significance.

Aim – the study of clinical, morphological and genetic features of GISTs to assess the overall survival (OS) of patients with various profiles of genetic disorders for elucidation the factors contributing to prognosis.

Materials and methods. A total 244 GIST patients who received combined treatment were enrolled in the study and their clinical characteristics and mutational status of *KIT*, *PDGFRA*, *BRAF* were analyzed. SDH-deficient GISTs were detected using IHC-analysis of SDHB expression.

Results. Stromal tumors developed in stomach (50 %), small intestine (37.7 %), colon or rectum (8.6 %), esophagus (0.4 %) and extraorganically (EGIST, 5.7 %). Overall survival correlated with gastric site ($p = 0.005$), tumor size <10 cm ($p = 0.0001$) and mitotic count $HPF < 10/50$ ($p = 0.007$). *KIT* mutations were found in 168 (68.9 %) and *PDGFRA* – in 31 (12.1 %) of GISTs, 14 novel mutations were detected. Mutations in *KIT* exon 11 were found in 140 (57.4 %) tumors, 10-year OS, 51 %, median 124 months. Patients with deletions had lower OS than patients with substitutions or duplications in *KIT* exon 11 ($p = 0.023$). The lowest OS was in patients with primary mutations in *KIT* exons 13 or 17 (median 28 months) and duplications in *KIT* exon 9 (median 71 months). There was a low OS of young patients with homozygous *KIT* mutations, mutations that begin in intron and two simultaneous *KIT* mutations. GISTs with *PDGFRA* mutations were located in stomach and had no metastases, 10-year OS, 63 %, median 175 months. *KIT*/*PDGFRA* mutations were not observed in 45 (18.4 %) patients (wild-type GIST), 10-year OS, 59 %, median 250 months. Wild-type GISTs with *BRAF*, *NF1* mutations and SDH deficiency were detected. The better OS was demonstrated by patients with BRAFV600E (10-year OS, 84 %, median 97 months) and SDH deficiency (10-year and 15-year OS, 82 %).

Conclusion. Genetic analysis is necessary to clarify GIST prognosis and predict the effectiveness of targeted therapy. The clinical, morphological and genetic diversity of GISTs was confirmed. Wild-type GISTs with *BRAF* mutations and SDH-deficiency were identified in the Russian population for the first time. The long-term 10- and 15-year OS of GIST patients were evaluated.

Key words: gastrointestinal stromal tumors, *KIT*, *PDGFRA*, *BRAF* mutations, SDH-deficiency, overall survival, prognosis

For citation: Mazurenko N.N., Yugay V.V., Tsyganova I.V. et al. Molecular heterogeneity and analysis of the long-term survival of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):43–57. (In Russ.). DOI: 10.1017650/2313-805X-2022-9-2-43-57.

ВВЕДЕНИЕ

Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) – наиболее распространенная группа (80 %) сарком желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), которые составляют до 3 % всех первичных опухолей ЖКТ [1–4] и выявляются ежегодно у 4–22 человек на 1 млн жителей, в среднем у 12 человек в большинстве стран [5]. Гастроинтестинальные стромальные опухоли возникают из незрелых мезенхимальных клеток, способных дифференцироваться в интерстициальные клетки Кахала, регулирующие перистальтику ЖКТ [6]. Большинство ГИСО поражают мышечную стенку желудка (60–70 %) и тонкой кишки (20–30 %). Менее распространены опухоли ободочной и прямой кишок, пищевода, а также экстраорганные ГИСО (ЭГИСО), которые развиваются из клеток малого или большого сальника, брыжейки или располагаются забрюшинно [1–4].

Наиболее характерная черта ГИСО, позволяющая отличить их от других мезенхимальных опухолей ЖКТ, – экспрессия антигена CD117, представляющего собой трансмембранную рецепторную тирозинкиназу KIT, которая является белковым продуктом гена *KIT* [7]. Повышение экспрессии CD117 является результатом активирующих мутаций в генах *KIT* [8] и *PDGFRA* [9], кодирующих рецепторы факторов роста стволовых клеток и тромбоцитов. Первичные мутации *KIT* выявляют в 70–80 % ГИСО, а *PDGFRA* – в 5–12 %. Наиболее распространены мутации в виде точечных

замен, делеций или дупликаций в 9-м и 11-м экзонах *KIT* и 18-м экзоне *PDGFRA*. Мутации в 13-м и 17-м экзонах *KIT* и в 12-м и 14-м экзонах *PDGFRA* встречаются в 1–2 % ГИСО [1–4, 10–13]. Мутации *KIT* или *PDGFRA* вызывают постоянную экспрессию рецепторов в отсутствие лигандов и активацию MAPK-, PI3K- или JAK/STAT-сигнальных путей, что ведет к нарушению клеточного цикла, пролиферации клеток, подавлению апоптоза [2–4, 9]. Большинство ГИСО с мутациями *KIT*/*PDGFRA* являются спорадическими, только 1 % ГИСО выявляют у пациентов с семейным синдромом. Герминальные мутации (чаще точечные замены или делеции одного кодона в 11-м экзоне *KIT*) схожи с мутациями в спорадических стромальных новообразованиях [14].

Гастроинтестинальные стромальные опухоли – гетерогенная группа опухолей, различающихся по степени злокачественности от условно доброкачественных микроГИСО до высокозлокачественных [2–4, 15]. Факторами прогноза являются локализация, размер и митотический индекс опухоли [10, 11, 16, 17]. Наличие мутаций в генах *KIT* и *PDGFRA*, а также тип мутации коррелируют с локализацией опухоли, риском рецидива и метастазирования [10, 16–19], но они не являются фактором прогноза и в настоящее время не включены в классификации групп риска [20, 21]. Наихудшую выживаемость имеют пациенты со стромальными опухолями тонкой кишки и мутацией в 9-м экзоне *KIT*. Опухоли с делециями в 11-м экзоне *KIT*,

в частности с делецией *p.W557_K558del*, имеют более высокий риск прогрессирования, тогда как у пациентов с ГИСО с точечными заменами и дупликациями в 11-м экзоне *KIT* отмечены лучшие показатели выживаемости. Мутации *PDGFRA* ассоциированы с более низким риском рецидива опухоли, чем мутации в гене *KIT* [13, 18–21].

Многочисленные исследования показали, что мутации *KIT* и *PDGFRA* имеют предиктивное значение [10–11, 18–21]. Эра таргетной терапии солидных опухолей началась с применения тирозинкиназного ингибитора (ТКИ) *STI571* (иматиниба) для лечения метастатической стромальной опухоли ЖКТ с мутацией в 11-м экзоне *KIT* [22]. Иматиниб является препаратом 1-й линии терапии ГИСО с мутациями в 11-м экзоне *KIT*. Хуже реагируют на иматиниб или резистентны к нему ГИСО с мутациями в 9-м экзоне *KIT*, заменой *p.L576P* в 11-м экзоне *KIT*, мутациями *PDGFRA*, затрагивающими кодон *p.D842*, а также ГИСО дикого типа [11, 18–23]. Сравнение результатов адъювантной терапии, проводившейся в течение 1 года и 3 лет, показало, что наиболее эффективна адъювантная терапия иматинибом в течение 3 лет для взрослых пациентов с высоким риском прогрессирования и делециями в 11-м экзоне *KIT* [20, 23]. Однако через 6–31 мес у 60 % пациентов появляется устойчивость к ТКИ, вызванная появлением вторичных мутаций, чаще в 13-м и 17-м экзонах *KIT* [18–23].

За 20 лет в практику таргетной терапии ГИСО вошел ряд мультикиназных и селективных ТКИ, которые применяют для лечения пациентов как с первичными мутациями в 9, 11, 13, 17-м экзонах *KIT*, так и вторичными мутациями в 13-м и 17-м экзонах. К препаратам 2-й линии относят сунитиниб, сорафениб, 3-й линии — регорафениб, 4-й — рипретиниб [24–26]. Для лечения пациентов с мутациями в 9-м экзоне *KIT* применяют двукратную дозу иматиниба (800 мг) или другие ТКИ (сунитиниб, регорафениб) [2–4, 21–25], а для лечения ГИСО с заменами и делециями кодона *p.D842 PDGFRA* используют креноланиб, авапритиниб, рипретиниб [24–26].

Мутации *KIT/PDGFRA* отсутствуют в 10–15 % ГИСО взрослых и 90 % ГИСО детей, так называемые ГИСО дикого типа, хотя антиген CD117 (*KIT*) экспрессируется в опухолях [2–4, 27, 28]. Поскольку 20–40 % ГИСО дикого типа у взрослых и большинство ГИСО у детей имеют дефицит сукцинатдегидрогеназы (*SDH*), из группы ГИСО дикого типа выделяют подгруппу *SDH*-дефицитных опухолей [27–29]. Комплекс *SDH* состоит из 4 субъединиц: *SDHA* участвует в цикле Кребса, *SDHB* — в системе транспорта электронов при окислении убинона, а *SDHC* и *SDHD* закрепляют комплекс на мембране митохондрий. Дефицит вызван мутациями в генах субъединиц *SDH*-комплекса или гиперметилированием промотора гена *SDHC* [28–29].

Дефицит *SDH* ведет к активации сигнальных путей, связанных с гипоксией и ангиогенезом, при этом

активируется транскрипционный фактор *HIF*, повышающий экспрессию фактора роста эндотелия сосудов *VEGF* [29]. Большинство ГИСО этой подгруппы возникают у пациентов с наследственным синдромом Карнея—Стратакиса или триадой Карнея, опухоли поражают желудок преимущественно у детей и молодых женщин [27–30]. Гастроинтестинальные стромальные опухоли дикого типа устойчивы к иматинибу, но некоторый эффект дает применение сунитиниба, ингибирующего *VEGFR* и *IGF1R* (рецептор 1 инсулиноподобного фактора роста), которые активируются в *SDH*-дефицитных ГИСО, или регорафениба [20, 24–26].

Остальные ГИСО дикого типа образуют подгруппу *SDH*-компетентных ГИСО, которые содержат мутации генов, активирующих *MAPK*- (*BRAF*, *RAS*, *NF1*), *P13K*- (*PIK3CA*, *AKT1*, *PTEN*) или *IGF1R* — сигнальные пути [27, 31–37]. Сюда же входят ГИСО дикого типа с мутациями генов клеточного цикла *RBI*, *CDK4*, *CDKN1B*, что стало известно при внедрении методов полногеномного секвенирования нового поколения (NGS) [34–35, 37].

Подгруппа ГИСО дикого типа с активацией *MAPK*-пути включает опухоли с мутацией *BRAF pV600E* (4–14 % ГИСО дикого типа), для их развития требуется инактивация *TP53* [31, 34]. Очень редко встречаются ГИСО с мутациями генов семейства *RAS* (*KRAS/HRAS*) [32–34]. В эту же подгруппу входят ГИСО с синдромом нейрофиброматоза 1-го типа, вызванного утратой функций белка *NF1* из-за инактивации обеих аллелей гена (1 % ГИСО) [21, 26, 36, 37]. Белок *NF1* негативно регулирует ГТФ-азы *RAS*, мутации приводят к утрате ингибиторной роли *NF1* и активации *RAS*. Более распространены соматические мутации *NF1*, выявление которых осложнено размерами гена-супрессора (58 экзонов). Использование NGS позволило выявить мутации *NF1* в 60 % *SDH*-компетентных ГИСО дикого типа [37]. ГИСО с мутациями *BRAF*, *RAS*, *NF1* устойчивы к иматинибу, для их лечения применяют дабрафениб (ингибитор *BRAF*) или ингибиторы *MEK* [24–26].

Отдельную подгруппу составляют ГИСО дикого типа, содержащие слитные гены *ETV6-NTRK3*, *FGFR1-HOOK3*, *FGFR1-TACC1*, *PRKAR1B-BRAF*, *TRIM4-BRAF* и др. [27, 38, 39].

Для ГИСО, не имеющих мутаций *KIT/PDGFRA/BRAF/SDH*, предложен термин «четырежды негативные ГИСО дикого типа» (*quadruple-negative wild type GIST*). В таких ГИСО с высокой злокачественностью (большой размер опухоли и высокий митотический индекс) отмечена высокая частота мутаций *TP53* и *RBI* (более 25 %) [40]. Внедрение методов глубокого секвенирования нового поколения (NGS) позволило выявить в различных подтипах ГИСО соматические мутации генов *TP53*, *MEN1*, *MAX*, *CHD4*, *FGFR1*, *CTDNN2*, *CBL*, *ARID1A*, *BCOR*, *APC* и другие, которые вызывают активацию клеточного цикла, пролиферацию и подавление апоптоза [34, 35, 37, 40–41].

Таким образом, ГИСО представляют собой гетерогенную в молекулярном плане группу сарком ЖКТ. Выявление генетических нарушений и изучение их корреляции с клиническим течением ГИСО чрезвычайно важны для определения тактики лечения пациентов. Мутационный статус не входит в число факторов прогноза ГИСО и не включен ни в одну из классификаций риска прогрессирования, публикуемых в официальных руководствах Национальной комплексной онкологической сети (National Comprehensive Cancer Network, NCCN), Европейского общества медицинской онкологии (European Society for Medical Oncology, ESMO), Европейской коалиции онкологических больных (European Cancer Patient Coalition, EURACAN) и др. Однако, поскольку мутации определяют адъювантную терапию, а также имеют определенную прогностическую значимость, их роль активно изучается и обсуждается [10, 13, 16–21].

В НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина, начиная с 2002 г., проводятся лечение и молекулярно-генетическое изучение стромальных опухолей ЖКТ [12, 13, 17, 42, 43].

Целью настоящего исследования является анализ клиничко-морфологических особенностей, отдаленных (10- и 20-летних) результатов комбинированного лечения ГИСО с учетом молекулярно-генетического профиля пациентов. Особое внимание уделено анализу ГИСО дикого типа, которые являются редкой патологией и включают опухоли с различными молекулярными нарушениями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен ретроспективный клиничко-морфологический анализ 244 пациентов с ГИСО, получивших лечение на базе НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в 2002–2020 гг. Часть пациентов, включенных в настоящую выборку, были исследованы ранее [12, 13, 17, 42]. Диагноз поставлен в отделении патоморфологии на основании морфологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследования опухоли с использованием панели маркеров: CD117, CD34, DOG1, гладкомышечного актина, виментина, десмина, S100, Ki67, нейроспецифической енолазы [12, 13, 17].

Препараты ДНК получали из опухолевых клеток, собранных в результате макродиссекции депарафинизированных 5-мкм срезов операционных биопсий. Определение мутаций проводили в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами к 9, 11, 13 и 17-му экзонам *KIT*, 12, 14 и 18-м экзонам *PDGFRA* и к 15-му экзону *BRAF* с последующим прямым секвенированием по Сэнгеру, как описано ранее [12, 13, 17]. Нуклеотидные последовательности генов сверяли с данными базы COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation>).

Определение SDH-дефицитных ГИСО проведено с помощью ИГХ-анализа экспрессии SDHB в ГИСО дикого типа с использованием кроличьих моноклональных антител SDHB, клон EP288, AC-0256RUOC (Epitomics, США, 1:2000) [44].

Для анализа выживаемости пациентов проведены статистический анализ, расчет и графические построения с помощью программы IBM SPSS Statistics (Version 22.0, 2013, Чикаго, США). Рассчитывали среднее значение показателей, медиану. В рамках отдаленных результатов оценивали общую 5-, 10- и 15-летнюю выживаемость. Анализ общей (ОВ) и безрецидивной (БРВ) выживаемости проводили по методу Каплана–Майера. Достоверность различий между группами определяли с использованием теста log-rank. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиничко-морфологическая характеристика пациентов. В исследование включены 244 пациента с ГИСО в возрасте 10–78 лет (медиана 56 лет), среди которых преобладали женщины (145, 59,4 %). Средний возраст мужчин составил 55,0 лет и женщин – 52,1 года. Клиничко-морфологическая характеристика пациентов представлена в таблице.

Локализация стромальных опухолей представлена на рис. 1. У половины пациентов стромальные опухоли были локализованы в желудке, у 37,7 % пациентов опухоли поражали различные отделы тонкой кишки. Реже ГИСО встречались в толстой кишке и экстраоргано (ЭГИСО). У 1 пациента выявлена опухоль пищевода.

При ИГХ-исследовании экспрессия CD117 выявлена в 96,6 % ГИСО, CD34 – в 75,7 %, среди других маркеров отмечена высокая экспрессия виментина – в 79,7 % опухолей. Размеры ГИСО варьировали от 1,5 до 40 см (медиана 11 см), у 51,3 % пациентов опухоль

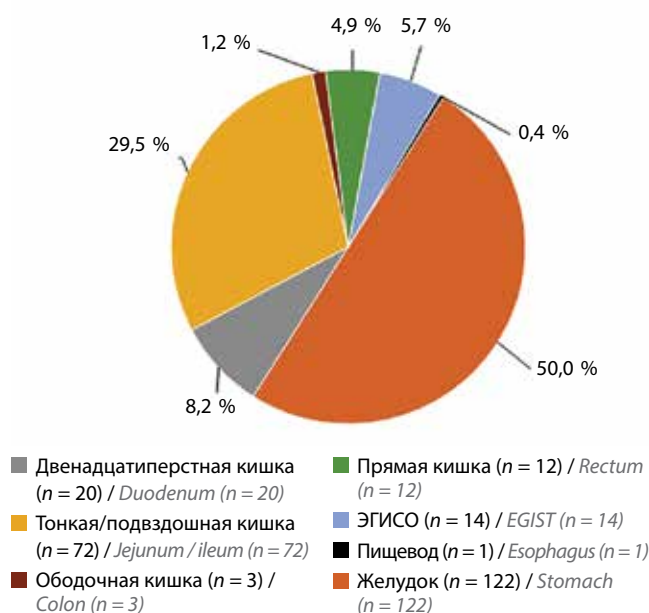


Рис. 1. Локализация гастроинтестинальных стромальных опухолей (n = 244). ЭГИСО – экстраорганные гастроинтестинальные стромальные опухоли

Fig. 1. Location of gastrointestinal stromal tumors (n = 244). EGIST – extraorganic gastrointestinal stromal tumors

Клинико-морфологическая характеристика и мутационный статус гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО)
Clinico-morphological characteristics and mutational status of gastrointestinal stromal tumors (GISTs)

Показатель Parameter	Число образцов ГИСО (n = 244), abs. (%) Number of GISTs cases, abs. (%) (n = 244), abs. (%)	Мутации KIT (n = 168; 68,9 %) Mutations KIT (n = 168; 68,9 %)						Мутации PDGFRA (n = 31; 12,7 %) Mutations PDGFRA (n = 31; 12,7 %)				ГИСО WT (n = 45; 18,4 %) WT GISTs (n = 45; 18,4 %)			
		9-й экзон (n = 22; 9,0 %) Exon 9 (n = 22; 9,0 %)	11-й экзон Exon 11 (n = 140; 57,4 %)		13-й экзон (n = 3; 1,2 %) Exon 13 (n = 3; 1,2 %)	17-й экзон (n = 3; 1,2 %) Exon 17 (n = 3; 1,2 %)	Замена в 12-м экзоне (n = 4 + 6*; 4,1 %) Substitutions exon 12 (n = 4 + 6*; 4,1 %)	18-й экзон Exon 18		Мутации BRAF (n = 6; 2,4 %) Mutations BRAF (n = 6; 2,4 %)	NFI-синдром (n = 2; 0,8 %) NFI-syndrom (n = 2; 0,8 %)	Дефицит SDH (n = 13; 5,3 %) SDH-deficient (n = 13; 5,3 %)	Прочие** (n = 24; 9,8 %) The rest*** (n = 24; 9,8 %)		
			Делеции (n = 93; 38,1 %) Deletions (n = 93; 38,1 %)	Замены (n = 38; 15,6 %) Substitutions (n = 38; 15,6 %)				Дубликации (n = 9; 3,7 %) Duplications (n = 9; 3,7 %)	Делеции (n = 6; 2,5 %) Deletions (n = 6; 2,5 %)					Замены (n = 15; 6,1 %) Substitutions (n = 15; 6,1 %)	
Возраст, медиана, лет Age, median, years	56	54,5	54	59,5	64	64	58	59,5	55	61	54,5	54,5	32	46	
Пол, абс. (%): Sex, abs. (%):															
мужской male	99 (40,6)	11	39	11	3	1	2	7	2	7	1	1	2	12	
женский female	145 (59,4)	11	54	27	6	2	1	3	4	8	5	1	11	12	
Локализация опухоли, абс. (%): Tumor location, abs. (%):															
пищевод esophagus	1 (0,4)	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
желудок stomach	122 (50,0)	2	40	18	6	2	1	4 + 2	4	15	4	—	13	11	
двенадцатиперстная кишка duodenum	20 (8,2)	4	10	1	1	—	—	—	—	—	—	2	—	2	
тощая/подвздошная кишка jejunum/ileum	72 (29,5)	13	32	11	1	—	1	2	1	—	2	—	—	9	
ободочная кишка colon	3 (1,2)	—	1	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	
прямая кишка rectum	12 (4,9)	1	6	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	
ЭГИСО EGIST	14 (5,7)	2	4	3	—	1	1	1	1	—	—	—	—	1	
Метастазы (n = 49; 20,1 %), абс. (%): Metastases (n = 49; 20,1 %), abs. (%):															
брюшина peritoneum	21 (8,8)	2	9	3	—	1	1	—	—	—	—	2	2	1	
печень liver	13 (5,4)	1	9	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	1	
брюшина/печень peritoneum/liver	8 (3,3)	—	3	—	—	1	—	—	—	—	—	—	3	1	
лимфатические узлы lymph nodes	7 (2,9)	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	5	—	

* Курсивом обозначены сайлент-мутации в 12-м экзоне PDGFRA. ** Прочие ГИСО дикого типа.

Примечание. SDH — суццинатдегидрогеназа; ЭГИСО — экстраорганные гастроинтестинальные стромальные опухоли.

* Silent mutations in the 12th exon of PDGFRA are indicated in italics. ** The rest WT GISTs.

Note. SDH — succinate dehydrogenase; EGIST — extraorganic gastrointestinal stromal tumors.

превышала 10 см. Преобладали опухоли с веретено-клеточным (65,3 %) и смешанным вариантами строения (20,7 %), эпителиоидноклеточный вариант выявлен только в 14,0 % ГИСО, чаще — в опухолях желудка. Высокая митотическая активность ($>10/50$ HPF) отмечена в 40,8 % опухолей, средняя (6–10/50 HPF) — в 29,6 %, низкая ($<5/50$ HPF) — также в 29,6 %. Некроз опухоли наблюдался в 64,1 % случаев. Первичные метастатические ГИСО отмечены у 49 (20,1 %) пациентов, из них у 42 (17,1 %) больных были метастазы на брюшине и/или в печени и только у 7 (2,9 %) — в регионарных лимфоузлах (см. таблицу).

Только хирургическое лечение получили 149 из 244 пациентов, из них у 54 (22,1 %) отсутствовали рецидивы, а у 95 (38,9 %) больных возникли рецидивы, и они впоследствии получали таргетную терапию (иматиниб, сунитиниб, регорафениб). Адъювантная таргетная терапия была проведена после хирургического лечения с учетом риска прогрессирования 62 (25,4 %) пациентам. Комбинированное лечение с проведением неоадъювантной и адъювантной терапии иматинибом получили 15 (6,1 %) пациентов с местно-распространенным процессом. Только таргетная терапия была проведена 16 (6,6 %) пациентам с учетом распространенности процесса и сопутствующей патологии.

Молекулярно-генетическая характеристика гастроинтестинальных стромальных опухолей. При анализе 244 пациентов мутации *KIT*/*PDGFRA* выявлены в 199 ГИСО: мутации *KIT* выявлены в 168 (68,9 %) и *PDGFRA* — в 31 (12,7 %) случаях, в 45 (18,4 %) случаях мутации *KIT*/*PDGFRA* не обнаружены (ГИСО дикого типа) (рис. 2). Среди пациентов с мутациями *KIT*/*PDGFRA* преобладали женщины (116 из 199; 58,3 %), медиана возраста составила 57 лет. Мутации *KIT* наблюдались в опухолях различной локализации, тогда как мутации *PDGFRA* отсутствовали в ГИСО пищевода, двенадцатиперстной и прямой кишки (рис. 3).

Наиболее распространены стромальные опухоли ($n = 140$; 57,4 %) с мутациями в 11-м экзоне *KIT*, кодирующем подмембранный домен рецептора (41 а. к., p.K550-F591). В 93 (38,1 %) ГИСО определены делеции, в 38 (15,6 %) — точечные замены (миссенс-мутации) и в 9 (3,7 %) — дупликации в 11-м экзоне *KIT*. Мутации не нарушают рамку считывания и группируются в двух районах: на 5'-конце и в центре 11-го экзона *KIT*.

В 77 ГИСО разной локализации выявлены делеции на 5'-конце 11-го экзона (кодоны 550–567), кодирующем алифатическую α -спираль, которая блокирует активацию рецептора КИТ в отсутствие лиганда (аутофосфорилирование по тирозинам Y568 и Y570). Во многих ГИСО делеции захватывают кодоны 557/558/559 ($n = 46$; 18,8 %), из них в 19 ГИСО выявлена

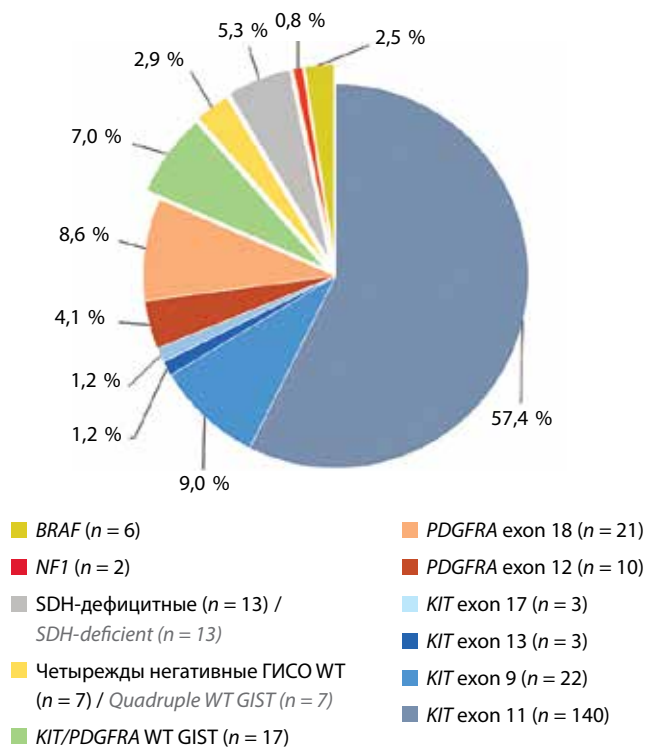


Рис. 2. Спектр мутаций в гастроинтестинальных стромальных опухолях (ГИСО) ($n = 244$)

Fig. 2. The spectrum of mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs) ($n = 244$)

делеция p.W557_K558del, которая ассоциирована с метастазированием [2–4, 13, 18, 21, 23]. В 2 ГИСО делеции начинаются в 10-м интроне *KIT*: p.K550_P551del и p.K550_K558del [45]. Делеции различаются по размеру (1–12 кодонов), делеции одного кодона чаще включают кодоны 557–560: p.W557del ($n = 2$), p.K558del ($n = 2$), p.V559del ($n = 4$), p.V560del ($n = 2$). Некоторые делеции отсутствуют в базе COSMIC: p.M552del*, p.W557_I563del*; встречаются сложные делеции с инсерциями и инверсиями: p.K558P* (c.1672_1673delinsCC), p.W557_K558delinsCE*, p.V555_V559 delinsAT*.

В 14 ГИСО, преимущественно в опухолях тонкой кишки, выявлены крупные делеции в центре 11-го экзона (до 19 кодонов), включающие тирозины Y568 и Y570: p.V555_P573delinsN ($n = 2$), p.V555_I571del, p.Q556_D572del, p.V569_Q575del и др. Ряд делеций также включает кодон 576: p.Y570_L576del ($n = 4$), p.N564_L576del, p.Y570_Y578delinsV. В 2 ГИСО выявлены короткие делеции: p.T574del*, p.D579del.

Миссенс-мутации *KIT* обнаружены в 38 (15,6 %) ГИСО и поражают те же кодоны, что и делеции на 5'-конце 11-го экзона: p.W557R ($n = 5$; 2,0 %), p.V559D/A/G ($n = 16$; 6,6 %) и p.V560D/G ($n = 13$; 5,3 %). Замены p.L576P/F выявлены в 3 ГИСО, хотя эти мутации достаточно распространены [18, 19]. Кроме того, редкие

*Мутации, отсутствующие в базе COSMIC.

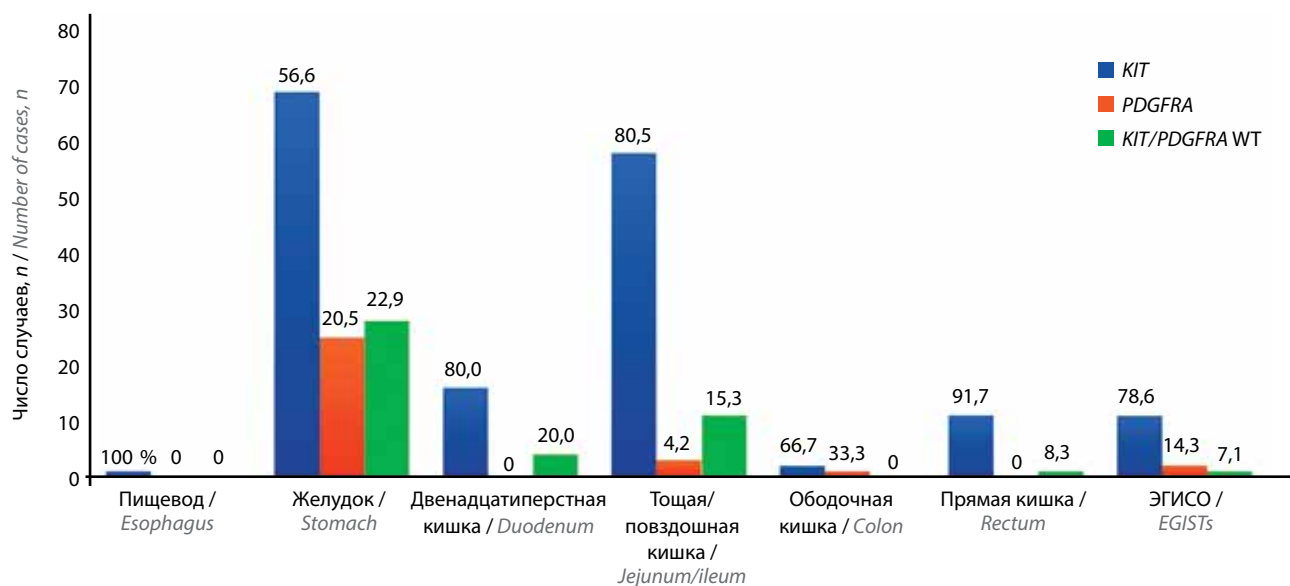


Рис. 3. Частота мутаций *KIT* и *PDGFRA* (%) в желудочно-кишечных стромальных опухолях. ЭГИСО — экстраорганные желудочно-кишечные стромальные опухоли

Fig. 3. Frequency of *KIT* and *PDGFRA* (%) mutations in gastrointestinal stromal tumors. EGISTs — extraorganic gastrointestinal stromal tumors

замены p.K550N, p.Y553D*, p.Y568C и p.D572G обнаружены одновременно с другими мутациями *KIT*.

В дистальной части 11-го экзона *KIT* в 9 (3,7 %) ГИСО выявлены дупликации 2–13 кодонов, включающие кодоны 576 и 577: p.L576_P577dup, p.Y570_Y578dup, p.I571_H580dup, p.P573_L576dup, p.T574_P585dup, p.Q575_D579dup, p.S590_F591ins13 и p.Y578_D579dup*, p.D579_F584dup*. Дупликации в 11-м экзоне чаще присутствовали в ГИСО желудка ($n = 6$), у женщин ($n = 6$), медиана возраста пациентов составила 64 года.

Мутации в 9-м экзоне *KIT* (p.A502_Y503dup) выявлены в 22 (9,0 %) ГИСО (рис. 2). Дупликации в 9-м экзоне характерны для опухолей тонкой кишки ($n = 17$), но также выявлены в опухолях желудка ($n = 2$), прямой кишки ($n = 1$) и в ЭГИСО ($n = 2$). Кроме того, в опухоли тонкой кишки была выявлена нонсенс-мутация в 9-м экзоне p.Q485term (с.1542C>T) одновременно с делецией в 11-м экзоне *KIT*.

Мутации в 13-м и 17-м экзонах *KIT*, кодирующих тирозинкиназные домены рецептора, присутствовали в 6 ГИСО (по 1,2 % ГИСО) (см. рис. 2). Мутации в 13-м экзоне обнаружены в 2 опухолях желудка (p.K642Q и p.T632A* с.1894A>G) и в ЭГИСО (p.Y646C* с.1937A>G). Мутации в 17-м экзоне *KIT* выявлены в опухолях желудка (p.D816V), тонкой кишки (p.N822K) и в ЭГИСО (p.D820V).

При анализе мутаций в рецидивах или метастазах после лечения иматинибом опухолей с мутациями в 11-м экзоне *KIT* вторичные мутации выявлены в 7 из 16 опухолей в 17-м экзоне: p.D820H ($n = 3$), p.D816H, p.S821C, p.N822K, p.I798I (silent). В 13-м экзоне вторичные мутации обнаружены не были.

Ген *PDGFRA*. Мутации *PDGFRA* выявлены в 31 (12,7 %) ГИСО: в 18-м экзоне в 21 (8,6 %) и в 12-м экзоне —

в 10 (4,1 %) ГИСО. В 14-м экзоне *PDGFRA* мутации не обнаружены (см. рис. 2, 3).

В 15 из 21 ГИСО присутствовали замены в 18-м экзоне *PDGFRA*: в 13 (5,3 %) ГИСО выявлена мутация p.D842V, устойчивая к иматинибу и другим ТКИ [19–21, 23–26], в 2 образцах обнаружена замена p.Y849N* (с.2545T>A). Все замены в 18-м экзоне обнаружены в эпителиоидноклеточных опухолях желудка. В 6 ГИСО выявлены делеции в 18-м экзоне: p.D842_H845del ($n = 2$), p.M844_S847delinsP, p.D842_D846delinsE, p.R841_D842delinsS*, p.H845_S847del*. Делеции в 18-м экзоне *PDGFRA* выявлены в опухолях желудка ($n = 4$), тонкой кишки и в ЭГИСО (см. таблицу).

В 4 (1,7 %) ГИСО желудка обнаружены миссенс-мутации в 12-м экзоне *PDGFRA*: p.R558C ($n = 3$) и p.S566N* (с.1697G>A). Кроме того, в 6 ГИСО разной локализации присутствовала сайлент-мутация p.P567P (с.1701A>G) в 12-м экзоне, однако, поскольку анализ нормальной ДНК не проводился, нельзя исключить SNP (однонуклеотидный полиморфизм).

Проведенный молекулярно-генетический анализ выявил 14 мутаций (10 *KIT* и 4 *PDGFRA*), отсутствующих в базе данных COSMIC.

Результаты исследования общей выживаемости. Анализ отдаленной выживаемости пациентов с ГИСО показал, что 20-летняя ОВ пациентов женского пола достоверно выше, чем у мужчин ($p = 0,01$); медиана ОВ женщин составила 149 мес, мужчин — 102 мес (рис. 4, а). Важным фактором прогноза является локализация опухоли: показатели ОВ достоверно ниже ($p = 0,005$) у пациентов с ЭГИСО (медиана 42 мес), чем у пациентов с ГИСО желудка (медиана 173 мес), толстой (медиана 156 мес) или тонкой (медиана 116 мес) кишки. Наилучшие показатели ОВ наблюдались у пациентов с ГИСО толстой кишки и желудка (рис. 4, б). Факторами

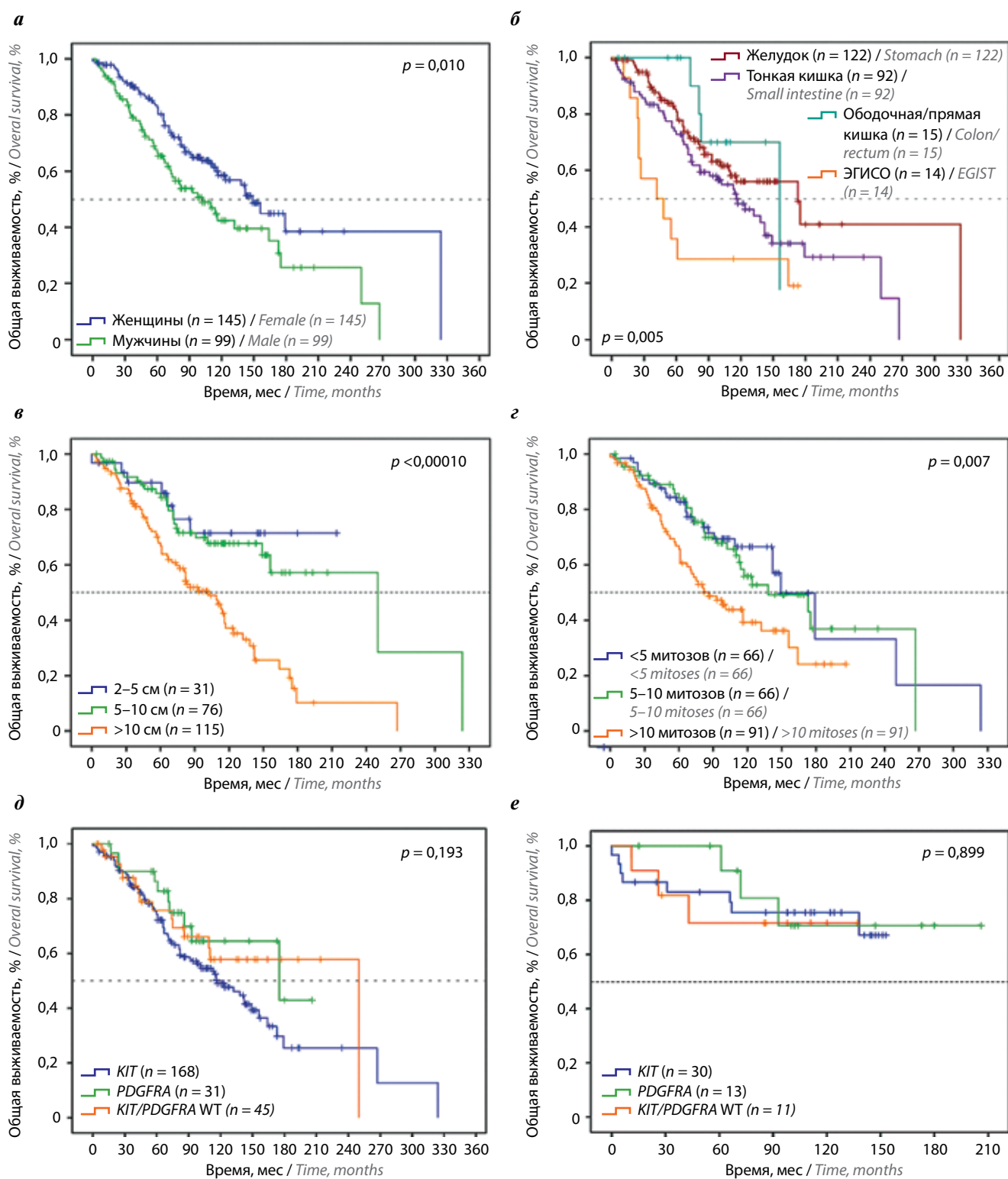


Рис. 4. Результаты анализа общей выживаемости пациентов с гастроинтестинальными стромальными опухолями (ГИСО) в зависимости от пола (а), локализации (б), размера опухоли (в), митотического индекса (г), мутантного статуса KIT, PDGFRA (д); 54 пациентов с ГИСО, не имевших рецидивов после операции (е). ЭГИСО – экстраорганные гастроинтестинальные стромальные опухоли

Fig. 4. Results of the analysis of overall survival of gastrointestinal stromal tumors (GIST) patients in accordance with sex of patients (a), tumor location (б), tumor size (в), mitotic counts (г), mutational status of KIT, PDGFRA (д); of 54 GIST patients without recurrences after operation (e). WT – wild type; EGIST – extraorganic gastrointestinal stromal tumors

прогноза являются размер опухоли и митотический индекс, что было подтверждено при анализе ОВ пациентов с ГИСО. Показатели ОВ достоверно ни-

же ($p < 0,0001$) у пациентов с ГИСО размером >10 см (рис. 4, в) и митотическим индексом >10 митозов в 50 полях зрения ($p = 0,007$) (рис. 4, г).

Полученные результаты подтверждают, что ОВ пациентов ассоциирована с генетическими нарушениями в ГИСО, хотя различия в выживаемости пациентов с мутациями *KIT* и *PDGFRA* не являются статистически значимыми ($p = 0,193$). Показатели 5-летней ОВ пациентов с мутацией *KIT* составили 76 %, 10-летней ОВ — 49 %, 15–20-летней — 23 %, медиана ОВ 117 мес. У пациентов с мутацией *PDGFRA* 5-летняя ОВ составила 87 %, 10-летняя — 63 %, 15-летняя — 43 %, медиана ОВ 175 мес. У 45 пациентов с ГИСО дикого типа 5-летняя ОВ составила 76 %, 10–20-летняя ОВ — 59 %, медиана ОВ 250 мес (рис. 4, д).

Необходимо отметить, что у 54 пациентов после хирургического лечения не возникли рецидивы и иматиниб не назначался, поскольку ГИСО имели низкий риск прогрессирования. У всех пациентов наблюдалась хорошая выживаемость, статистически значимых различий выявлено не было, хотя они имели разные мутации. Для данной группы пациентов с ГИСО с мутациями генов *KIT* и *PDGFRA* 10-летняя ОВ составила 76 и 71 % соответственно, медиана достигнута не была (рис. 4, е).

Различия в выживаемости пациентов с ГИСО с мутациями *KIT* представлены на рис. 5, а. Низкие показатели ОВ наблюдались у пациентов с мутацией в 9-м экзоне (медиана 71 мес, 5- и 10-летняя ОВ — 58 и 42 %). Опухоли преимущественно локализованы в тонкой кишке, они менее чувствительны к ТКИ. Несколько лучшие показатели ОВ отмечены у пациентов с мутацией в 11-м экзоне *KIT*: медиана ОВ составила 124 мес, 5- и 10-летняя ОВ — 80 и 51 % соответственно. Следует отметить, что отдаленные метастазы были у 3 из 22 (13,6 %) пациентов с мутациями в 9-м экзоне и у 26 из 140 (18,6 %) — с мутациями в 11-м экзоне *KIT*.

Первичные мутации в 13-м и 17-м экзонах *KIT* достаточно редки и характерны для ГИСО тонкой кишки, но в нашей работе была только 1 опухоль тонкой кишки с мутацией в 17-м экзоне. Остальные мутации в 13-м и 17-м экзонах выявлены в опухолях желудка и ЭГИСО (см. таблицу). Размер 4 опухолей превышал 10 см, 5 опухолей имели $\text{NPF} > 10/50$, у 4 из 6 пациентов были первичные метастазы в печень и брюшину, хотя медиана возраста пациентов с мутациями в 13-м и 17-м экзонах *KIT* (64 и 58 лет) выше медианы возраста всех пациентов с ГИСО (56 лет). При этом 5-летняя ОВ составила 23 %, медиана 27 мес, т.е. этот показатель оказался значительно ниже, чем у пациентов с мутациями в 9-м и 11-м экзонах *KIT* (рис. 5, а). Полученные данные согласуются с тем, что ГИСО желудка с мутациями в 13-м или 17-м экзонах более агрессивны, чем опухоли тонкой кишки, нечувствительны к иматинибу, и для их лечения применяют сорафениб, регорафениб, рипретиниб [24–26].

Среди 140 пациентов с мутациями в 11-м экзоне *KIT* доминируют больные ($n = 93$) с делециями, и их ОВ хуже (медиана 113 мес), чем пациентов с заменами и дупликациями в 11-м экзоне *KIT* (медиана ОВ не достигнута) (рис. 5, б).

Большинство пациентов с дупликациями в 11-м экзоне *KIT* были женского пола, медиана возраста составила 64 года, что на 5–10 лет выше среднего возраста пациентов с ГИСО с другими нарушениями (52–54 года) (см. таблицу). Среди пациентов с ГИСО с дупликациями в 11-м экзоне не было ни одного случая появления отдаленных метастазов. Как видно, 10-летняя ОВ пациентов с заменами (66 %) и дупликациями в 11-м экзоне *KIT* (67 %) достоверно выше ($p = 0,023$), чем пациентов с делециями (43 %) ($p = 0,023$; рис. 5, б). При наличии 2 мутаций *KIT* (делеция и замена) показатель выживаемости определялся по худшему варианту (делеция).

Анализ безрецидивной выживаемости (БРВ) пациентов, получавших только хирургическое лечение (рис. 5в), показал, что имеется тенденция к более высокому риску прогрессирования ГИСО ($n = 8$) с делецией p.W557_K558del по сравнению с ГИСО с делециями в центре 11-го экзона ($n = 12$), поражающими тирозины Y568 и Y570: медиана БРВ составила 0 и 15 мес соответственно ($p = 0,072$), что согласуется с литературными данными [23]. Однако при применении иматиниба на фоне опухолевой прогрессии наблюдается увеличение ОВ пациентов с ГИСО с делецией p.W557_K558del (медиана ОВ 124 мес, 10-летняя ОВ — 50 %). Таким образом, выравнивается статистическая разница в выживаемости пациентов с ГИСО с делециями в центре 11-го экзона *KIT* (медиана ОВ — 98 мес, 10-летняя ОВ — 30 %) и с делецией p.W557_K558del, что может быть связано с чувствительностью к ТКИ (рис. 5, г). В пользу этого свидетельствует то, что пациенты с p.W557_K558del имеют низкие показатели БРВ при проведении адъювантной терапии в течение 1 года, но не при 3-летней адъювантной терапии иматинибом [23].

Особое внимание привлекают редкие случаи с одновременным наличием 2 мутаций в первичных ГИСО, обычно это молодые пациенты. В 6 ГИСО присутствовали одновременно 2 мутации *KIT* в одних и тех же препаратах ДНК. В 4 ГИСО выявлены мутации в 11-м экзоне: 1) Y568C и p.Y570_Y578del; 2) p.K550N и p.K558P; 3) p.M552_K558del и p.L576F homo; 4) p.Y553D и p.G565_567del*. Так, у 39-летнего пациента с ГИСО желудка выявлены мутации 3 остатков тирозина (p.Y568C и p.Y570_Y578del) в 11-м экзоне, которые необходимы для аутофосфорилирования рецептора КИТ, мутации ранее одновременно описаны не были. Пациент не ответил на иматиниб и прожил всего 35 мес после операции.

Еще в 2 ГИСО выявлены одновременно мутации в 11-м экзоне и в 9-м или 13-м экзонах *KIT*. У 38-летней пациентки развилась опухоль тонкой кишки с делецией в 11-м экзоне p.Q556_D572del и нонсенс-мутацией в 9-м экзоне p.Q485term (с.1542 C>T). Пациентка прожила 58 мес, рецидив появился через 43 мес после лечения. У 44-летней пациентки в первичной ЭГИСО обнаружены мутации в 11-м (p.D572G homo) и 13-м

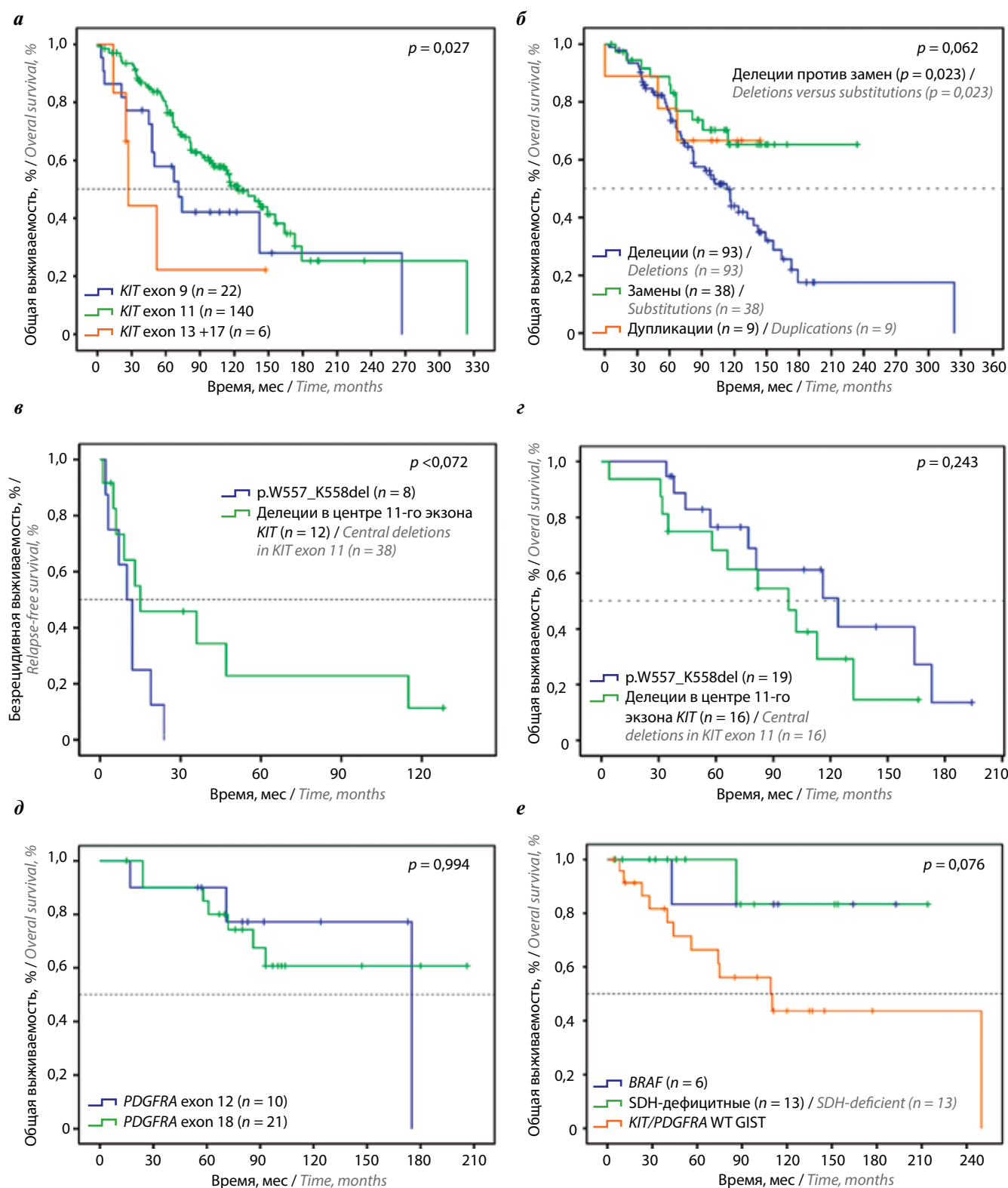


Рис. 5. Результаты анализа выживаемости пациентов с гастроинтестинальными стромальными опухолями (ГИСО): а — общей выживаемости больных с мутациями в различных экзонах KIT; б — общей выживаемости больных с делециями, заменами и дупликациями в 11-м экзоне KIT; в — безрецидивной выживаемости больных с делецией p.W557_K558del и делециями в центре 11-го экзона KIT после операции; г — общей выживаемости больных с делецией p.W557_K558del и в центре 11-го экзона KIT, получавших комбинированное лечение; д — общей выживаемости больных с мутациями в 12-м и 18-м экзонах PDGFRA; е — общей выживаемости больных с ГИСО дикого типа

Fig. 5. Results of survival analysis of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST): а — overall survival of patients with mutations in different exons of KIT; б — overall survival of patients with deletions, substitutions and duplications in KIT exon 11; в — relapse-free survival of patients with deletion p.W557_K558del and deletions in the center of KIT exon 11 after operation; г — overall survival of patients with deletion p.W557_K558del and deletions in the center of KIT exon 11 that received combined therapy; д — overall survival of patients with mutations in PDGFRA exons 12 and 18; е — overall survival of patients with WT GIST

(p.Y646C) экзонах *KIT*, а также сайлент-мутации в 11-м экзоне *KIT* (p.L576L) и 18-м экзоне *PDGFRA* (p.I831I), что свидетельствует о высокой генетической нестабильности. После применения иматиниба была определена вторичная мутация в 17-м экзоне *KIT* (p.D820N), больная прожила всего 25 мес после начала наблюдения.

Пациенты с мутациями *PDGFRA* характеризуются более высокой выживаемостью, при этом нет существенных различий в локализации мутации, хотя выживаемость у пациентов с мутацией в 12-м экзоне *PDGFRA* выше, что подтверждает данные литературы. При сравнении пациентов с ГИСО с мутациями в 18-м и 12-м экзонах *PDGFRA* медиана ОБ не достигнута; 5- и 10-летняя ОБ при мутации в 18-м экзоне — 85 и 60 %, а для пациентов с мутациями в 12-м экзоне 5- и 10-летняя ОБ составила 90 и 77 % (рис. 5, д).

Характеристика и выживаемость пациентов с гастроинтестинальными стромальными опухолями дикого типа (*KIT/PDGFRA* WT). Мутации *KIT/PDGFRA* не обнаружены у 45 (18,4 %) пациентов (так называемые ГИСО дикого типа), среди них преобладали женщины ($n=30$), медиана возраста составила 49,5 года. Из 45 пациентов у 6 детей в возрасте до 19 лет диагностировали ГИСО желудка. Экспрессия CD117 отмечена в 81,8 % (36/44), CD34 — в 63 % (24/38) ГИСО дикого типа. Восемь пациентов имели наследственные синдромы: у 6 пациенток выявлена неполная триада Карнея и у 2 больных с ГИСО двенадцатиперстной кишки был диагностирован нейрофиброматоз 1-го типа.

Нельзя не отметить тенденцию к более высоким показателям ОБ у 45 пациентов с ГИСО дикого типа: 10- и 20-летняя ОБ составила 59 %, медиана ОБ 250 мес (рис. 4, д). Однако группа пациентов с ГИСО дикого типа неоднородна.

Для выявления SDH-дефицитных ГИСО был использован ИГХ-тест на экспрессию SDHB, поскольку его отсутствие является маркером SDH-дефицита у пациентов с синдромом Карнея—Стратакиса или триадой Карнея и проявляется при мутации любого из генов *SDH* ввиду нарушения компоновки SDH-комплекса [44]. Материал для исследования был доступен только у 20 пациентов с ГИСО дикого типа и дефицит SDH был выявлен у 13 из 20 тестированных пациентов. Остальные 7 образцов ГИСО дикого типа, были SDH-компетентны и четырежды негативны (quaduple-negative). Таким образом, как минимум, 28,9 % (13 из 45) ГИСО дикого типа были SDH-дефицитными и имели неплохую выживаемость. SDH-дефицитные ГИСО локализовались в желудке, 11 из 13 пациентов — женщины, у 4 из них был наследственный синдром, медиана возраста составила 32 года. У 11 из 13 (84,6 %) пациентов с SDH-дефицитным ГИСО возникли метастазы (см. таблицу). Тем не менее 10- и 15-летняя ОБ составила 82 % (рис. 5, е).

Группа SDH-компетентных ГИСО дикого типа включала 6 из 45 (13,3 %) пациентов с мутацией

BRAFV600E. Большинство пациенток — женщины, опухоли чаще возникали в желудке, метастазы отсутствовали, что коррелирует с данными литературы [31]. Десятилетняя ОБ составила 84 %, медиана ОБ 97 мес (рис. 5, е).

К пациентам с ГИСО дикого типа с активацией MAPK-пути относятся 2 пациента с нейрофиброматозом 1-го типа и опухолью 12-перстной кишки с метастазами на брюшине (ОБ данных пациентов составила 36 и 48 мес).

Среди остальных 24 пациентов с ГИСО дикого типа 7 человек имели четырежды негативную (*KIT/PDGFRA/BRAF/SDH* WT) ГИСО, и 17 человек имели опухоли *KIT/PDGFRA* WT, дальнейшее исследование мутационного статуса которых было невозможно ввиду отсутствия материала. Их ОБ оказалась хуже (рис. 5, е).

ОБСУЖДЕНИЕ

Гастроинтестинальные стромальные опухоли — чрезвычайно гетерогенная группа сарком ЖКТ. Можно выделить несколько подтипов ГИСО, в которых молекулярная характеристика достаточно четко связана с локализацией, степенью злокачественности и риском прогрессии опухоли.

В настоящей работе проведен анализ отдаленной (10–15-летней) ОБ 244 пациентов с ГИСО с различными молекулярными характеристиками. Наиболее распространены ГИСО с делециями 11-го экзона *KIT*, которые встречаются в различных отделах ЖКТ, чаще в тонкой кишке, тогда как замены и дупликации в 11-м экзоне чаще встречаются в опухолях желудка. Всего мутации в 11-м экзоне выявлены в 140 ГИСО (57,4 %), причем делеции в 11-м экзоне — в 38,1 % опухолей. Делеции в 11-м экзоне *KIT* обнаружены у 22 из 49 (44,9 %) пациентов с ГИСО с первичными метастазами и у 71 из 195 (36,4 %) пациентов с ГИСО без метастазов. Следует отметить, что в нашем исследовании первичные метастазы имели 20,1 % пациентов.

Дупликации в 9-м экзоне *KIT* преобладают в ГИСО тонкой кишки, но могут встречаться в опухолях разной локализации [2–4, 13, 17–20]. Медиана возраста пациентов с ГИСО с мутациями в 9-м экзоне (54,5 года) и делециями 11-го экзона *KIT* (54 года) на 5–10 лет меньше, чем у пациентов с заменами (59,5 года) и дупликациями *KIT* (64 года). Любопытно, что низкие показатели ОБ пациентов с ГИСО с мутацией в 9-м экзоне связывают не с типом мутации и не с локализацией в тонкой кишке, а с внежелудочной локализацией ГИСО, поскольку ОБ выше в опухолях желудка [10, 16–19]. В нашей выборке из 22 опухолей с мутацией в 9-м экзоне было 17 ГИСО тонкой кишки и только 2 ГИСО желудка. В то же время опухоли желудка с мутациями в 13-м и 17-м экзонах *KIT* чрезвычайно агрессивны и отличаются низкой ОБ (см. рис. 5, а), тогда как ГИСО тонкой кишки с мутациями в 13-м и 17-м экзонах *KIT* имеют достаточно хорошие показатели БРВ [18].

Согласно классификации Миттенена, которая является основой более поздних классификаций ГИСО, риск прогрессии определяется локализацией, размером и митотическим индексом опухоли [2, 10, 16, 18]. В нашем исследовании высокий митотический индекс ($\text{HPF} > 5/50$) наблюдался в 76 % ГИСО с мутациями в 9-м экзоне, в 85 % — с делециями, в 60 % — с заменами в 11-м экзоне и только в 33 % ГИСО с дупликациями в 11-м экзоне *KIT*. Образцы ГИСО с дупликациями в 11-м экзоне *KIT* имели веретенноклеточный фенотип, в 77 % случаев локализовались в желудке и пищеводе, в 66 % случаев возникли у женщин и не метастазировали (см. таблицу). Медиана возраста пациентов этой группы (64 года) значительно превышала медиану возраста пациентов с ГИСО (56 лет). Совокупность приведенных данных объясняет более высокие показатели ОБ у пациентов с дупликациями в 11-м экзоне *KIT* (см. рис. 5, б).

У пациентов с ГИСО с мутациями *PDGFRA* показатели 15-летней общей выживаемости составили 43 %, медиана ОБ 175 мес, тогда как у пациентов с мутацией *KIT* 15-летняя выживаемость составила 23 %, медиана ОБ 117 мес, что свидетельствует о более благоприятном исходе заболевания. Все ГИСО с миссенс-мутациями в 18-м и 12-м экзонах *PDGFRA* располагались в желудке (в отличие от ГИСО с делециями в 18-м экзоне и сайлент-мутациями в 12-м экзоне) и не давали метастазов. Большинство ГИСО с мутациями *PDGFRA*, в отличие от ГИСО с мутациями *KIT*, имели эпителиоидный или смешанный фенотип (74 %, 23/31). Среди ГИСО с мутациями *PDGFRA* отмечен такой же процент опухолей размером > 10 см (55 %), что и с мутациями *KIT* (52 %), но меньше опухолей с высоким митотическим индексом $\text{HRF} > 5/50$ (45 %, 13/29), чем среди ГИСО с мутациями в 11-м экзоне *KIT* (73 %, 94/129). Полученные данные подтверждают, что решающими факторами прогноза являются локализация и митотический индекс.

Среди 244 пациентов выявлено 6 ГИСО с двумя одновременными значимыми мутациями *KIT*, одна из которых была в 11-м экзоне. Еще в 2 ГИСО выявлены мутации в 11-м экзоне и 9-м или 13-м экзонах *KIT*. Одновременное наличие нескольких мутаций *KIT* в первичной опухоли чаще наблюдалось у молодых пациентов и является неблагоприятным признаком. Такие пациенты не отвечали на иматиниб и погибали вскоре после начала лечения.

Плохим прогностическим признаком является наличие мутации *KIT*, начинающейся в интроне [45, 46]. В опухолях прямой кишки и желудка выявлены делеции (p.K550_P551del и p.K550_K558del), которые начинаются в 10-м интроне. Пациенты прожили всего 73 и 36 мес, несмотря на терапию иматинибом, так как у них возникли рецидивы, при том что у пациентов с ГИСО прямой кишки и желудка достаточно высокие показатели ОБ, медиана 156 и 173 мес соответственно (см. рис. 4, б).

Еще одним неблагоприятным фактором прогноза ГИСО являются гомозиготные мутации *KIT* [46]. В 9 (3,7 %) ГИСО разной локализации выявлены гомозиготные замены (p.V560D ($n = 2$), p.D572G, p.L576P, p.N822K) или делеции (p.E554_V559del, p.K558_G565delinsR, p.V555_P573delinsA, p.V560_L576del), чаще у молодых пациентов (средний возраст — 47,7 года). Несмотря на таргетную терапию, пациенты прожили всего 20–80 мес, развились метастазы, тогда как медиана ОБ пациентов с мутациями *KIT* составляет 124 мес, а с миссенс-мутациями *KIT* — не достигнута. Таким образом, высокая генетическая нестабильность у молодых пациентов является неблагоприятным прогностическим признаком, что коррелирует с данными других авторов [18].

Гастроинтестинальные стромальные опухоли различаются по ответу на терапию ТКИ, при этом определяющим является молекулярная характеристика опухоли. В нашей когорте были пациенты, получавшие различные варианты комбинированного лечения. Показатели общей выживаемости 54 пациентов, не имевших рецидивов после хирургического лечения, значительно выше, чем пациентов, получавших различные виды таргетной терапии, поскольку они имели ГИСО 1-й степени злокачественности (опухоль < 5 см и $\text{HRF} < 5/50$), несмотря на различные генетические нарушения (см. рис. 4, е), что подтверждает более ранние наблюдения [17]. При сравнении ОБ 1000 пациентов, получивших хирургическое лечение в пре- и постиматинибную эру, установлено, что в эпоху иматиниба из факторов прогноза (локализация, размер опухоли и митотический индекс) критичен только размер опухоли > 10 см [47].

Более благоприятный прогноз имеют пациенты с отсутствием мутаций *KIT/PDGFRA* (с ГИСО дикого типа), хотя среди них в 2 раза выше процент метастатических опухолей (35,5 %; 16/45), чем у пациентов с мутациями *KIT/PDGFRA* (17,0 %; 33/195). Однако группа ГИСО дикого типа неоднородна, метастазы имеют 0/6 пациентов с мутациями *BRAF*, 2/2 — с нейрофиброматозом 1-го типа, 11/13 — с SDH-дефицитным ГИСО и 3/24 — с *KIT/PDGFRA* WT (см. таблицу, рис. 4, е).

Наилучшие показатели ОБ у пациентов с мутациями *BRAF*: большинство пациенток — женщины, опухоли чаще поражали желудок, метастазы отсутствовали, что коррелирует с данными литературы [31]. Подтверждены низкие показатели ОБ у пациентов с ГИСО с синдромом нейрофиброматоза 1-го типа, ГИСО с мутациями *NF1* не отвечают на ТКИ [36, 37]. Значительно лучше ОБ у пациентов с SDH-дефицитной стромальной опухолью желудка, это преимущественно молодые женщины, 4 из 13 имели наследственные синдромы, у 84,6 % (11/13) развились метастазы. Тем не менее общая 10- и 15-летняя выживаемость у пациентов с SDH-дефицитной ГИСО составила 82 %, медиана не достигнута.

Таким образом, драйверные мутации выявлены в 21 из 45 ГИСО дикого типа, а для 24 опухолей генетические нарушения неизвестны. Следует напомнить, что из них 7 опухолей представляли собой четырежды негативные ГИСО дикого типа (*KIT/PDGFR/BRF/SDH* WT). Показатели общей 10- и 15-летней выживаемости 24 пациентов с ГИСО дикого типа хуже (43 %), чем пациентов с *SDH*-дефицитной ГИСО (82 %), причем кривая ОБ 24 пациентов указывает на гетерогенность группы. Анализ клинической картины показал, что 6 из 24 пациентов — молодые женщины (16–38 лет), картина заболевания которых указывает на возможный *SDH*-дефицит. Однако мы не можем это проверить ввиду отсутствия материала для ИГХ-анализа (блоков операционных биопсий).

С другой стороны, среди 24 пациентов были и пожилые люди (59–74 года), которые ответили на терапию иматинибом и жили более 10–15 лет. В связи с этим следует отметить сообщение итальянских авторов, которые при использовании NGS обнаружили среди ГИСО дикого типа 20 % случаев с мутациями

KIT, которые не были выявлены при использовании прямого секвенирования по Сэнгеру из-за низкой (12–16 %) частоты мутантного аллеля [48]. Нельзя исключить, что некоторые наши пациенты также имели низкую частоту аллельных мутаций *KIT* или *PDGFRA*, которые были чувствительны к иматинибу и другим ТКИ, но мы их не выявили прямым секвенированием. Высокая чувствительность этой группы пациентов к ТКИ указывает на целесообразность применения таргетной терапии иматинибом для пациентов с ГИСО дикого типа. Несомненно, что для полного выявления драйверных мутаций в группе ГИСО дикого типа необходимо применение NGS.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярно-генетическое многообразие ГИСО отражается на выживаемости пациентов, чувствительности опухоли к различным препаратам таргетной терапии и позволяет предвидеть прогноз заболевания. Молекулярно-генетический анализ должен быть стандартом обследования первичных и метастатических стромальных опухолей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Miettinen M., Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors—definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 2001;438(1): 1–12. DOI: 10.1007/s004280000338.
- Corless C.L., Barnett C.M., Heinrich M.C. Gastrointestinal stromal tumors: origin and molecular oncology. *Nat Rev Cancer* 2011;11(12):865–78. DOI: 10.1038/nrc3143.
- Joensuu H., Hohenberger P., Corless C.L. Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet* 2013;382:973–83. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62398-3.
- Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В. Генетические особенности и маркеры гастроинтестинальных стромальных опухолей. В кн.: Молекулярный канцерогенез. М.: АБВ-пресс, 2016. С. 300–322. [Mazurenko N.N., Tsyganova I.V. Genetic peculiarities and markers of gastrointestinal stromal tumors. In: *Molecular carcinogenesis*. Moscow: "ABV-press", 2016. P. 300–322. (In Russ.)].
- Søreide K., Sandvik O.M., Søreide J.A. et al. Global epidemiology of gastrointestinal stromal tumours (GIST): A systematic review of population-based cohort studies. *Cancer Epidemiol* 2016;40:39–46. DOI: 10.1016/j.canep.2015.10.031.
- Kindblom L.G., Remotti H.E., Aldenborg F., Meis-Kindblom J.M. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 1998;152(5):1259–69.
- Sarlomo-Rikala M., Kovatich A.J., Barusevicius A., Miettinen M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol* 1998;11(8):728–34.
- Hirota S., Isozaki K., Moriyama Y. et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279(5350):577–80. DOI: 10.1126/science.279.5350.577.
- Heinrich M.C., Corless C.L., Duensing A. et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003;299(5607):708–10. DOI: 10.1126/science.1079666.
- Miettinen M., Sobin L.H., Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005; 29(1):52–68. DOI: 10.1097/01.pas.0000146010.92933.de.
- Corless C.L., Schroeder A., Griffith D. et al. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol* 2005;23(23):5357–64. DOI: 10.1200/JCO.2005.14.068.
- Беляков И.С., Анурова О.А., Снигур П.В. и др. Мутации генов *c-KIT* и *PDGFRA* и клиничко-морфологические особенности стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта. Вопросы онкологии 2007;53(6):677–81. [Belyakov I.S., Anurova O.A., Snigur P.V. et al. *c-KIT* and *PDGFRA* mutations and clinico-morphological features of gastrointestinal stromal tumors. *Voprosy onkologii = Problems in oncology* 2007; 53(6):677–81. (In Russ.)].
- Цыганова И.В., Беляков И.С., Анурова О.А., Мазуренко Н.Н. Прогностическое значение мутаций генов *KIT* и *PDGFRA* в гастроинтестинальных стромальных опухолях. Молекулярная медицина 2015;2:61–4. [Tsyganova I.V., Belyakov I.S., Anurova O.A., Mazurenko N.N. Prognostic significance of *KIT* and *PDGFRA* mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Molecular medicine* 2015;2:61–4. (In Russ.)].
- Postow M.A., Robson M.E. Inherited gastrointestinal stromal tumor syndromes: mutations, clinical features, and therapeutic implications. *Clin Sarcoma Res* 2012;2(1):16. DOI: 10.1186/2045-3329-2-16.
- Agaimy A., Wünsch P.H., Hofstaedter F. et al. Minute gastric sclerosing stromal tumors (GIST tumorlets) are common in adults and frequently show c-KIT mutations. *Am J Surg Pathol* 2007;31(1):113–20. DOI: 10.1097/01.pas.0000213307.05811.f0.
- Miettinen M., Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol* 2006;23(2):70–83. DOI: 10.1053/j.semdp.2006.09.001.

17. Цыганова И.В., Анурова О.А., Мазуренко Н.Н. Морфологические особенности и критерии прогноза стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта. Архив патологии 2011;73(6):37–42. [Tsyganova I.V., Anurova O.A., Mazurenko N.N. Morphological characteristics and prognostic criteria for gastrointestinal stromal tumors. Arkh Patol 2011;73(6):37–42. (In Russ.)].
18. Joensuu H., Rutkowski P., Nishida T. et al. KIT and PDGFRA mutations and the risk of GI stromal tumor recurrence. J Clin Oncol 2015;33(6):634–42. DOI: 10.1200/JCO.2014.57.4970.
19. Wozniak A., Rutkowski P., Schöffski P. et al. Tumor genotype is an independent prognostic factor in primary gastrointestinal stromal tumors of gastric origin: a european multicenter analysis based on Contica GIST. Clin Cancer Res 2014;20:6105–16. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1677.
20. Corless C.L., Ballman K.V., Antonescu C.R. et al. Pathologic and molecular features correlate with long-term outcome after adjuvant therapy of resected primary GI stromal tumor: the ACOSOG Z9001 trial. J Clin Oncol 2014;32(15):1563–70. DOI: 10.1200/JCO.2013.51.2046.
21. Zhang H., Liu Q. Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumors: a review. Transl Oncol 2020;13(10):100812. DOI: 10.1016/j.tranon.2020.100812.
22. Joensuu H., Roberts P.J., Sarlomo-Rikala M. et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. N Engl J Med 2001;344(14):1052–6. DOI: 10.1056/NEJM200104053441404.
23. Joensuu H., Wardelmann E., Sihto H. et al. Effect of KIT and PDGFRA mutations on survival in patients with gastrointestinal stromal tumors treated with adjuvant imatinib: an exploratory analysis of a randomized clinical trial. JAMA Oncol 2017;3(5):602–9. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.5751.
24. Liu P., Tan F., Liu H. et al. The use of molecular subtypes for precision therapy of recurrent and metastatic gastrointestinal stromal tumor. Onco Targets Ther 2020;13:2433–47. DOI: 10.2147/OTT.S241331.
25. Nishida T., Yoshinaga S., Takahashi T., Naito Y. Recent progress and challenges in the diagnosis and treatment of gastrointestinal stromal tumors. Cancers (Basel) 2021;13(13):3158. DOI: 10.3390/cancers13133158.
26. Patel S.R., Reichardt P. An updated review of the treatment landscape for advanced gastrointestinal stromal tumors. Cancer 2021;127(13):2187–95. DOI: 10.1002/cncr.33630.
27. Wada R., Arai H., Kure S. et al. “Wild type” GIST: clinico-pathological features and clinical practice. Pathol Int 2016;66(8):431–7. DOI: 10.1111/pin.12431.
28. Janeway K.A., Kim S.Y., Lodish M. et al. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. Proc Natl Acad Sci USA 2011;108(1):314–8. DOI: 10.1073/pnas.1009199108.
29. Boikos S.A., Pappo A.S., Killian J.K. et al. Molecular subtypes of KIT/PDGFR wild-type gastrointestinal stromal tumors: a report from the national institutes of health gastrointestinal stromal tumor clinic. JAMA Oncol 2016;2(7):922–8. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.0256.
30. Gopie P., Mei L., Faber A.C. et al. Classification of gastrointestinal stromal tumor syndromes. Endocr Relat Cancer 2018;25(2):R49–58. DOI: 10.1530/ERC-17-0329.
31. Huss S., Pasternack H., Ihle M.A. et al. Clinicopathological and molecular features of a large cohort of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) and review of the literature: BRAF mutations in KIT/PDGFR wild-type GISTs are rare events. Hum Pathol 2017;62:206–14. DOI: 10.1016/j.humpath.2017.01.005.
32. Miranda C., Nucifora M., Molinari F. et al. KRAS and BRAF mutations predict primary resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumors. Clin Cancer Res 2012;18(6):1769–76. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2230.
33. Lasota J., Xi L., Coates T. et al. No KRAS mutations found in gastrointestinal stromal tumors (GISTs): molecular genetic study of 514 cases. Mod Pathol. 2013;26(11):1488–91. DOI: 10.1038/modpathol.2013.89.
34. Mavroudis L., Metaxa-Mariatou V., Papoudou-Bai A. et al. Comprehensive molecular screening by next generation sequencing reveals a distinctive mutational profile of KIT/PDGFR genes and novel genomic alterations: results from a 20-year cohort of patients with GIST from north-western Greece. ESMO Open 2018;3(3):e000335. DOI: 10.1136/esmoopen-2018-000335.
35. Ohshima K., Fujiya K., Nagashima T. et al. Driver gene alterations and activated signaling pathways toward malignant progression of gastrointestinal stromal tumors. Cancer Sci 2019;110(12):3821–33. DOI: 10.1111/cas.14202.
36. Miettinen M., Fetsch J.F., Sobin L.H., Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases. Am J Surg Pathol 2006;30(1):90–6. DOI: 10.1097/01.pas.0000176433.81079.bd.
37. Gasparotto D., Rossi S., Polano M. et al. Quadruple-negative gist is a sentinel for unrecognized neurofibromatosis type 1 syndrome. Clin Cancer Res 2017;23(1):273–82. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0152.
38. Brenca M., Rossi S., Polano M. et al. Transcriptome sequencing identifies ETV6-NTRK3 as a gene fusion involved in GIST. J Pathol 2016;238(4):543–9. DOI: 10.1002/path.4677.
39. Shi E., Chmielecki J., Tang C.-M. et al. FGFR1 and NTRK3 actionable alterations in “Wild-Type” gastrointestinal stromal tumors J Transl Med 2016;14(1):339. DOI: 10.1186/s12967-016-1075-6.
40. Wang S., Sun R.Z., Han Q. et al. Genomic study of chinese quadruple-negative GISTs using next-generation sequencing technology. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2021;29(1):34–41. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000842.
41. Pantaleo M.A., Urbini M., Indio V. et al. Genome-wide analysis identifies MEN1 and MAX mutations and a neuro-endocrine-like molecular heterogeneity in quadruple WT GIST. Mol Cancer Res 2017;15(5):553–62. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0376.
42. Beliakov I., Mazurenko N., Anurova O. et al. Analysis of C-KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors. Eur J Cancer Suppl 2005;3(2):216. DOI: 10.1016/S1359-6349(05)81052-3.
43. Стилиди И.С., Архири П.П., Никулин М.П. Хирургическое лечение больных с рецидивными и метастатическими стромальными опухолями желудочно-кишечного тракта. Вопросы онкологии 2011;57(4):508–12. [Stilidi I.S., Arkhiri P.P., Nikulin M.P. Surgical treatment of relapsing metastatic stromal tumor of the gastrointestinal tract. Voprosy onkologii = Problems in oncology 2011;57(4):508–12. (In Russ.)].
44. Gaal J., Stratakis C.A., Carney J.A. et al. SDHB immunohistochemistry: a useful tool in the diagnosis of Carney-Stratakis and Carney triad gastrointestinal stromal tumors. Mod Pathol 2011;24(1):147–51. DOI: 10.1038/modpathol.2010.185.
45. Corless C.L., McGreevey L., Town A. et al. KIT gene deletions at the intron 10-exon 11 boundary in GI stromal tumors. J Mol Diagn 2004;6(4):366–70. DOI: 10.1016/S1525-1578(10)60533-8.
46. Shen Y.Y., Ma X.L., Wang M. et al. Exon 11 homozygous mutations and intron 10/exon 11 junction deletions in the KIT gene are associated with poor prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumors. Cancer Med 2020;9(18):6485–96. DOI: 10.1002/cam4.3212.
47. Cavnar M.J., Seier K., Curtin C. et al. Outcome of 1000 patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST) treated by surgery in the pre- and post-imatinib eras. Ann Surg 2021;273(1):128–38. DOI: 10.1097/SLA.0000000000003277.
48. Astolfi A., Indio V., Nannini M. et al. Targeted deep sequencing uncovers cryptic KIT mutations in KIT/PDGFR/SDH/RAS-P Wild-Type GIST. Front Oncol 2020;10:504. DOI: 10.3389/fonc.2020.00504.

Благодарность. Авторы выражают благодарность к.м.н. И.С. Беякову за анализ мутаций и к.м.н. Д.А. Филоненко за проведение лекарственного лечения пациентов с ГИСО.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to I.S. Belyakov, M.D., Ph.D., for the analysis of mutations and D.A. Filonenko, M.D., Ph.D. for the drug treatment of patients with GISTs.

Вклад авторов

Н.Н. Мазуренко: разработка концепции и дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста статьи, редактирование статьи;

В.В. Югай: разработка дизайна исследования, сбор и систематизация клинического материала, анализ полученных данных, создание графического материала, редактирование статьи;

И.В. Цыганова: проведение генетического исследования, анализ полученных данных;

М.П. Никулин, П.П. Архири: сбор и характеристика клинического материала, редактирование статьи;

О.А. Анурова: патоморфологическая характеристика опухолевого материала;

Н.А. Козлов: определение SDH-дефицитных ГИСО;

И.С. Стилиди: руководство проектом, организация исследования.

Authors' contribution

N.N. Mazurenko: development of the concept and design of the study, review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained, article writing, article editing;

V.V. Yugai: development of research design, collection and systematization of clinical material, analysis of the data obtained, creation of graphic material, article editing;

I.V. Tsyganova: conducting a genetic study, analyzing the data obtained;

M.P. Nikulin, P.P. Arkhiri: collection and characterization of clinical material, article editing;

O.A. Anurova: pathomorphological characteristics of tumor material;

N.A. Kozlov: definition of SDH-deficient GISTs;

I.S. Stilidi: project management, organization of research.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.Н. Мазуренко / N.N. Mazurenko: <https://orcid.org/0000-0003-4767-6983>

В.В. Югай / V.V. Yugai: <https://orcid.org/0000-0001-6169-2723>

И.В. Цыганова / I.V. Tsyganova: <https://orcid.org/0000-0002-3388-7547>

М.П. Никулин / M.P. Nikulin: <https://orcid.org/0000-0002-9608-4696>

П.П. Архири / P.P. Arkhiri: <https://orcid.org/0000-0002-6791-2923>

О.А. Анурова / O.A. Anurova: <https://orcid.org/0000-0003-2547-4846>

Н.А. Козлов / N.A. Kozlov: <https://orcid.org/0000-0003-3852-3969>

И.С. Стилиди / I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-5229-8203>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

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

Все пациенты, а также родители пациентов моложе 18 лет подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

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

All patients, as well as parents of patients under the age of 18, signed an informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 19.04.2022. **Принята к публикации:** 26.05.2022.

Article submitted: 19.04.2022. **Accepted for publication:** 26.05.2022.

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-58-65



Гипоксические белки VEGF A и CA IX и резистентность клеток сарком мягких тканей к химиопрепаратам: пилотный опыт *ex vivo* анализа

А.М. Щербаков¹, Т.И. Фетисов¹, Д.В. Сорокин¹, В.Ю. Зиновьева¹, Н.И. Моисеева¹, Л.А. Лалетина¹, Е.М. Кирилин², А.Е. Маникайло¹, Л.Я. Фомина¹, Л.В. Мехеда¹, А.Ю. Бокхан¹, Е.А. Лесовая¹, Л.С. Труханова¹, Т.Г. Горькова¹, Е.Е. Антошина¹, О.В. Морозова¹, К.И. Кирсанов^{1,3}, М.Г. Якубовская¹

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

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

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

Контакты: Александр Михайлович Щербаков Alex.Scherbakov@gmail.com

Введение. Поиск предиктивных факторов является краеугольной задачей современной онкологии. Разработка большого числа новых таргетных препаратов определяет необходимость четкого предсказания хемочувствительности конкретного пациента к назначаемой терапии. В связи с этим активно ведется поиск биомаркеров прогноза ответа на терапию.

Цель исследования – изучение взаимосвязи между резистентностью опухолевых клеток и уровнем экспрессии CA IX (карбоангидразы IX) и VEGF A (фактора роста эндотелия сосудов A) в *ex vivo* культурах сарком мягких тканей.

Материалы и методы. В исследование были включены *ex vivo* культуры сарком мягких тканей, использованы резазуриновый тест, иммуноблоттинг.

Результаты. Получено 46 *ex vivo* образцов культур сарком мягких тканей, для которых с помощью резазуринового теста на цитотоксичность определена хемочувствительность к доксорубину, ифосфамиду, доцетакселу, гемцитабину и их комбинациям. Проведен анализ связи экспрессии гипоксических белков VEGF A и CA IX с резистентностью к химиопрепаратам. Обнаружена корреляция уровня экспрессии CA IX в гипоксии с резистентностью клеток к ифосфамиду и его комбинации с доксорубином. Образцы сарком мягких тканей, обладающие высоким индексом VEGF A, были резистентны к доксорубину, доцетакселу и его комбинации с гемцитабином ($p < 0,05$).

Заключение. Полученные на *ex vivo* культурах данные свидетельствуют о взаимосвязи гипоксического сигналинга и резистентности сарком мягких тканей к химиотерапии.

Ключевые слова: саркома мягких тканей, сигнальные пути, таргетная химиотерапия, прогноз индивидуальной чувствительности и развития лекарственной резистентности, VEGF A, CA IX

Для цитирования: Щербаков А.М., Фетисов Т.И., Сорокин Д.В. и др. Гипоксические белки VEGF A и CA IX и резистентность клеток сарком мягких тканей к химиопрепаратам: пилотный опыт *ex vivo* анализа. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2):58–65. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-58-65.

Hypoxia-related proteins VEGF A and CA IX and resistance of soft tissue sarcoma cells to chemotherapy: *ex vivo* pilot study

A.M. Scherbakov¹, T.I. Fetisov¹, D.V. Sorokin¹, V.Yu. Zinovieva¹, N.I. Moiseeva¹, L.A. Laletina¹, E.M. Kirilin², A.E. Manikaylo¹, L.Ya. Fomina¹, L.V. Mekheda¹, B.Yu. Bokhyan¹, E.A. Lesovaya¹, L.S. Trukhanova¹, T.G. Gor'kova¹, E.E. Antoshina¹, O.V. Morozova¹, K.I. Kirsanov^{1,3}, M.G. Yakubovskaya¹

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

²M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie gory, Moscow 119991, Russia;

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

Contacts: Aleksandr Mihaylovich Scherbakov Alex.Scherbakov@gmail.com

Introduction. The identification of predictive factors is a cornerstone task of modern oncology. The development of new targeted drugs determines the need for prediction of chemosensitivity of each patient to the prescribed therapy, in this regard, the search for biomarkers of predictive response to therapy is actively conducted.

The study objective to investigate the relationship between tumor cell resistance and the expression levels of CA IX (carbonic anhydrase IX) and VEGF A (vascular endothelial growth factor A) in patient-derived cultures of soft tissue sarcomas.

Materials and methods: *ex vivo* soft tissue sarcoma cell culture, resazurin test, immunoblotting.

Results. We obtained 46 *ex vivo* samples of soft tissue sarcoma cultures for which chemosensitivity to doxorubicin, ifosfamide, docetaxel, gemcitabine, and their combinations was assessed by the resazurin cytotoxicity test. We analyzed the relationship between the expression of hypoxic proteins VEGF A and CA IX and the resistance to drugs. A correlation between the CA IX expression in hypoxia and cell resistance to ifosfamide and its combination with doxorubicin was found. Soft tissue sarcomas with high VEGF A index were resistant to doxorubicin, docetaxel, and its combination with gemcitabine ($p < 0.05$).

Conclusion. The data obtained on patient-derived cultures indicate the relationship between hypoxic signaling and resistance of soft tissue sarcomas to chemotherapeutics.

Key words: soft tissue sarcoma, signaling pathways, targeted chemotherapy, prediction of individual sensitivity and development of drug resistance, VEGF A, CA IX

For citation: Scherbakov A.M., Fetisov T.I., Sorokin D.V. et al. Hypoxia-related proteins VEGF A and CA IX and resistance of soft tissue sarcoma cells to chemotherapy: *ex vivo* pilot study. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):58–65. (In Russ.). DOI: 10.10.17650/2313-805X-2022-9-2-58-65.

ВВЕДЕНИЕ

Наряду с хирургическим вмешательством и радиотерапией в лечении сарком мягких тканей (СМТ) активно применяется химиотерапия [1]. При этом противоопухолевые препараты оказываются эффективными лишь у 20–50 % пациентов. Это в первую очередь связано с молекулярными особенностями опухолевых клеток конкретных пациентов, обуславливающими резистентность опухоли к определенным схемам терапии, и развитием различных форм лекарственной устойчивости [2–4]. Как и все солидные новообразования, СМТ при прогрессии переходят в состояние кислородного голодания — гипоксии. Гипоксия связана с тем, что в быстрорастущий опухолевый узел не доставляется достаточное количество кислорода, это происходит как из-за низкой плотности капилляров, так и из-за их функциональной незрелости.

Одним из основных факторов, определяющих степень злокачественности новообразования, является способность опухолевых клеток продуцировать белки, отвечающие за адаптацию к гипоксическим условиям. К таким белкам относятся ростовые факторы, рецепторы, внутриклеточные киназы, поддерживающие выживаемость клеток в условиях кислородного голодания. Продукция гипоксических белков в опухоли стимулирует различные процессы как в опухоли, так и в окружающих тканях. Самым известным из таких процессов является опухолевый неоангиогенез — процесс формирования новых капилляров в опухоли [5]. Гипоксия индуцирует продукцию VEGF A (фактора роста эндотелия сосудов A) в опухолевых клетках, который, в свою очередь, запускает пролиферацию клеток эндотелия сосудов и рост новых капилляров. Активный гликолитический метаболизм — важный фактор, поддерживающий рост опухоли. При недостатке кислорода основные энергетические потребности опухолевых клеток обеспечиваются через гликолитические пути [6].

В результате жизнедеятельности злокачественных клеток генерируется избыток побочных продуктов метаболизма, таких как лактат, CO_2 и H^+ . Во избежание внутриклеточного ацидоза, несовместимого с биосинтетическими реакциями и передачей сигналов, в опухолевых клетках запускаются механизмы pH-регуляции [6]. Устранение внутриклеточного ацидоза (закисления) осуществляется посредством выброса лактата и H^+ , диффузии и гидратации CO_2 [7]. Кроме этого, активация механизмов pH-регуляции дает определенное преимущество опухолевым клеткам в приобретении агрессивного фенотипа [8]. В устранении клеточного ацидоза участвуют различные транспортеры и ферменты, такие как MCTs (monocarboxylate transporters, транспортеры монокарбоксилатов) и карбоангидразы. Карбоангидраза IX (CA IX) представляет собой связанный с опухолью мембранный гликопротеин (металлоэнзим), который индуцируется гипоксией. CA IX регулирует обратимую гидратацию углекислого газа до ионов гидрокарбоната и протонов, принимает участие в регуляции кислотно-щелочного баланса в клетке и межклеточной среде [9].

Оба упомянутых белка, VEGF A и CA IX, активно исследуются в СМТ. В частности, ряд исследователей указывают на роль этих белков в прогнозе заболевания [10–12].

Цель исследования — изучение взаимосвязи между резистентностью опухолевых клеток и уровнем экспрессии CA IX и VEGF A в переживающих (*ex vivo*) культурах СМТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика СМТ. Из 46 образцов СМТ получены переживающие культуры опухолевых клеток. Наибольшую группу составили недифференцированные плеоморфные саркомы, было получено 16 образцов таких опухолей. Синовиальные саркомы и липосаркомы включены в исследование в количестве 10 и 9 образцов

соответственно. Клинико-морфологические параметры больных СМТ приведены в табл. 1.

Таблица 1. Клинико-морфологические характеристики больных саркомами мягких тканей

Table 1. Clinical and morphological parameters of soft tissue sarcoma patients

Характеристика Characteristic	n (%)
Гистологический тип опухоли: Histological type of tumor:	
недифференцированные плеоморфные саркомы undifferentiated pleomorphic sarcoma	16 (35)
синовиальные саркомы synovial sarcoma	10 (22)
липосаркомы liposarcoma	9 (19)
другие саркомы other sarcomas	11 (24)
Возраст, лет: Age, years:	
<40	16 (35)
>40	30 (65)
Пол: Gender:	
мужской male	28 (61)
женский female	18 (39)
Степень злокачественности: Grade:	
G ₁ –G ₂	8 (17)
G ₃	38 (83)
Стадия: Stage:	
I–II	11 (24)
III–IV	35 (76)

Чувствительность клеток к доксорубину, ифосфамиду, доцетакселу, гемцитабину и их комбинациям определяли с помощью резазуринового теста на цитотоксичность, как описано С.Ж. Qi и соавт. и J. Rodríguez-Corrales и соавт. [13, 14]. В исследовании использовали концентрации от 6,25 до 200 % плазматического пика препарата, описанные в работе С.Ж. Qi и соавт. [14] (табл. 2). Хемочувствительность образцов рассчитывали по формуле:

$$600 - \sum (\text{ингибирование клеточного роста концентрацией препарата } 6,25\text{--}200 \%).$$

Образец считали резистентным, если индекс чувствительности >250 [15].

Инкубация в гипоксии и иммуноблоттинг. Клетки СМТ культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, США) с высоким уровнем глюкозы, пируватом натрия и глутамином, содержащей 10 % сыворотки (HyClone, США) и антибиотик (пенициллин-стрептомицин, «ПанЭко», Рос-

сия). Для эксперимента клетки рассеивали на две 100-мм чашки Петри из расчета 4 млн клеток на чашку. Через 24 ч проводили смену культуральной среды в чашках, затем одну чашку возвращали в инкубатор с нормоксией (21 % кислорода, NuAir), вторую — переносили в двухгазовый инкубатор с гипоксией (1 % кислорода, Binder). Инкубировали клетки 24 ч и затем готовили пробы для белкового электрофореза, как описано ранее в работе А.М. Scherbakov и соавт. [16]. Иммуноблоттинг проводили с антителами к СА IX человека (CellSignaling, #5649). Нормирование результатов выполняли с помощью иммуноблоттинга с антителами к α -тубулину (CellSignaling, #2144).

Таблица 2. Используемые в тесте ex vivo препараты и их комбинации, применяемые в 100 % концентрации

Table 2. Drugs and their combinations used in in vitro assay at 100 % concentration

Препарат, комбинация препаратов Drug, drug combination	100 % концентрация препарата, мг/мл 100 % drug concentration, mg/ml
Доксорубин Doxorubicin	1,0
4-гидроксиифосфамид (ифосфамид) 4-hydroxyifosfamide (ifosfamide)	3,0
Доксорубин + ифосфамид Doxorubicin + ifosfamide	1,0 + 3,0
Доцетаксел Docetaxel	11,3
Гемцитабин Gemcitabine	25,0
Доцетаксел + гемцитабин Docetaxel + gemcitabine	11,3 + 25,0

Определение VEGF A в культуральной среде СМТ.

Сбор образцов культуральных сред проводили сразу после окончания инкубации в нормоксии и гипоксии. В пробирки переносили 500 мкл среды и немедленно замораживали при температуре -70°C , не допускали повторную заморозку проб. Уровень VEGF A в образцах определяли с помощью набора реактивов для иммуноферментного анализа VEGF A Human ELISA Kit (Invitrogen, BMS277, Thermo Fisher Scientific, США). Измерение оптической плотности в плато при 450 нм выполняли на спектрофотометре Thermo Fisher Scientific (США); длину волны 620 нм использовали как референсную. Калибровочную кривую строили в программе OriginLab 9 и рассчитывали концентрацию VEGF A в образце с учетом рекомендаций производителя реактивов. Статистический анализ проводили с помощью расчета коэффициента корреляции Спирмена в программе GraphPad Prism 8.4.3.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Были определены хемочувствительность переживающих культур к доксорубину, ифосфамиду, доцетакселу, гемцитабину и их комбинациям, а также индекс чувствительности и чувствительность для каждого из препаратов (табл. 3).

Таблица 3. Хемочувствительность переживающих культур саркомы мягких тканей

Table 3. Chemosensitivity of patient-derived soft tissue sarcoma cultures

Препарат Drug	Чувствительные, n (%) Sensitive, n (%)	Резистентные, n (%) Resistant, n (%)
Доксорубин Doxorubicin	29 (63)	17 (37)
Ифосфамид Ifosfamide	27 (59)	19 (41)
Доксорубин + ифосфамид Doxorubicin + ifosfamide	16 (35)	30 (65)
Доцетаксел Docetaxel	38 (83)	8 (17)
Гемцитабин Gemcitabine	32 (70)	14 (30)
Доцетаксел + гемцитабин Docetaxel + gemcitabine	24 (52)	22 (48)

Описанный подход позволил выявить резистентность опухоли к определенным препаратам и провести выбор наиболее эффективной комбинации для каждой переживающей культуры СМТ.

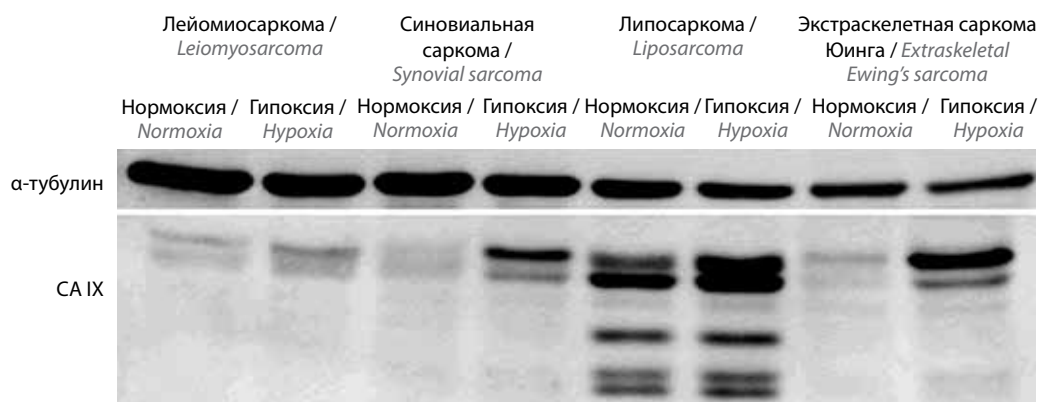
Все переживающие культуры СМТ инкубировали в течение 24 ч в нормоксии и гипоксии для определения экспрессии СА IX и VEGF A. В нормоксии в большинстве образцов не выявлена высокая экспрессия СА IX. На рисунке представлены типичные результаты

иммуноблоттинга образцов СМТ с антителами к СА IX. В нормоксии в СМТ определялись следовые количества СА IX, перевод клеток в гипоксию приводил к значительной стимуляции экспрессии СА IX в большинстве исследованных образцов.

Был проведен анализ корреляций уровня СА IX в клетках СМТ с их чувствительностью к доксорубину, ифосфамиду, доцетакселу, гемцитабину и их комбинациям. В табл. 4 представлены данные по взаимосвязи между уровнем СА IX и индексом чувствительности СМТ. В клетках СМТ с высокой экспрессией СА IX обнаружена резистентность к доксорубину, однако разница между группами не достигла уровня статистической значимости. Уровень СА IX достоверно коррелировал с резистентностью к ифосфамиду ($p < 0,05$; коэффициент корреляции Спирмена $R = 0,3$). Анализ комбинации 2 препаратов также выявил достоверную положительную корреляцию ($p < 0,05$; $R = 0,3$).

Во всех полученных культурах СМТ продемонстрировано, что гипоксия индуцирует продукцию VEGF A. В общей выборке СМТ не выявлена взаимосвязь между экспрессией VEGF A и чувствительностью к химиопрепаратам. Однако в группе липосарком мы наблюдали, что клетки с высоким уровнем экспрессии VEGF A в нормоксии имели высокую чувствительность к гемцитабину и его комбинации с доцетакселом, как это отражено в табл. 5. Кроме этого, клетки липосарком с высокой экспрессией VEGF A в гипоксии также были более чувствительны к комбинации гемцитабина с доцетакселом. Однако в анализе экспрессии VEGF A при изменении условий культивирования от нормоксии к гипоксии было показано, что образцы, обладающие высоким индексом VEGF A, резистентны к доксорубину, доцетакселу и его комбинации с гемцитабином ($p < 0,05$).

Анализу роста СМТ в гипоксических условиях посвящено достаточно много экспериментальных работ. Первые сообщения о снижении чувствительности к химиотерапии СМТ в гипоксии появились в конце



Экспрессия СА IX в образцах саркомы мягких тканей. Клетки саркомы мягких тканей 24 ч инкубировали в нормоксии или гипоксии и затем уровень экспрессии СА IX определяли с помощью иммуноблоттинга. Для контроля загрузки геля и нормирования использовали антитела к α-тубулину
CA IX expression in soft tissue sarcoma. Soft tissue sarcoma cells were incubated in normoxia or hypoxia for 24 hours and then CA IX expression was determined by immunoblotting. Antibodies to α-tubulin were used to control gel loading and normalization

Таблица 4. Анализ взаимосвязи между уровнем СА IX и хемочувствительностью саркомы мягких тканей

Table 4. Analysis of the relationship between CA IX expression and chemosensitivity of soft tissue sarcoma

Препарат Drug	Саркомы мягких тканей (общая группа) Soft tissue sarcoma (common group)		Плеоморфные саркомы Pleomorphic sarcoma		Липосаркомы Liposarcoma		Синовиальные саркомы Synovial sarcoma	
	СА IX в нормоксии CA IX in normoxia	СА IX в гипоксии CA IX in hypoxia	СА IX в нормоксии CA IX in normoxia	СА IX в гипоксии CA IX in hypoxia	СА IX в нормоксии CA IX in normoxia	СА IX в гипоксии CA IX in hypoxia	СА IX в нормоксии CA IX in normoxia	СА IX в гипоксии CA IX in hypoxia
Доксорубицин Doxorubicin	R = 0,1 p = 0,5	R = 0,2 p = 0,09	R = 0,1 p = 0,7	R = 0,1 p = 0,6	R = 0,1 p = 0,8	R = 0,02 p = 0,9	R = 0,2 p = 0,7	R = 0,4 p = 0,3
Ифосфамид Ifosfamide	R = 0,05 p = 0,7	R = 0,3 p < 0,05	R = 0,1 p = 0,7	R = 0,4 p = 0,2	R = 0,2 p = 0,7	R = 0,1 p = 0,8	R = -0,3 p = 0,5	R = 0,4 p = 0,2
Доксорубицин + ифосфамид Doxorubicin + ifosfamide	R = 0,1 p = 0,61	R = 0,3 p < 0,05	R = 0,3 p = 0,4	R = 0,4 p = 0,2	R = 0,2 p = 0,7	R = 0,2 p = 0,6	R = -0,3 p = 0,7	R = 0,5 p = 0,2
Доцетаксел Docetaxel	R = -0,2 p = 0,3	R = -0,02 p = 0,9	R = -0,1 p = 0,7	R = -0,04 p = 0,9	R = -0,3 p = 0,4	R = 0,2 p = 0,6	R = -0,5 p = 0,3	R = -0,4 p = 0,3
Гемцитабин Gemcitabine	R = -0,1 p = 0,5	R = 0,2 p = 0,3	R = 0,1 p = 0,9	R = 0,3 p = 0,3	R = -0,3 p = 0,4	R = -0,04 p = 0,90	R = -0,4 p = 0,4	R = -0,1 p = 0,8
Доцетаксел + гемцитабин Docetaxel + gemcitabine	R = -0,1 p = 0,4	R = 0,1 p = 0,7	R = 0,2 p = 0,6	R = 0,1 p = 0,6	R = -0,2 p = 0,7	R = 0,1 p = 0,8	R = -0,5 p = 0,2	R = -0,2 p = 0,6

Примечание. Здесь и в табл. 5 жирным шрифтом выделены наблюдения с $p < 0,05$.

Note. Here and in table 5 observations with $p < 0.05$ are highlighted in bold.

70-х — начале 80-х годов XX века. Так, в пионерской работе W.M. Martin и N.J. McNally показано, что саркома мышцы линии WHF1B приобретает резистентность к доксорубину в гипоксических условиях [17]. Позднее были описаны разные *in vitro* и *in vivo* модели СМТ, в которых при гипоксических воздействиях формировалась радиорезистентность и резистентность к различным химиопрепаратам [18–21].

Адаптация СМТ к гипоксии происходит по общим закономерностям, характерным для всех солидных образований [22]. Снижение уровня кислорода приводит к стабилизации и активации транскрипционных факторов HIF, регулирующих экспрессию значительного ряда гипоксических генов. Среди белковых продуктов таких HIF-зависимых генов — VEGF A и СА IX — их экспрессия стремительно возрастает с первых часов кислородного голодания.

Высокая экспрессия этих факторов может способствовать более быстрой прогрессии новообразования. В частности, СА IX рассматривается в ряде работ как фактор плохого прогноза СМТ. К. Måseide и соавт. проанализировали 47 образцов СМТ, полученных из парафиновых блоков; уровень экспрессии СА IX, определенный в образцах иммуногистохимически, значительно варьировал, в 31 (66 %) из 47 образцов экспрессия СА IX выявлена в мембранной части

клеток. В группе пациентов с СА IX-положительными СМТ определена более низкая общая выживаемость, чем в группе пациентов с СА IX-отрицательными опухолями [23]. Дальнейшее наблюдение за пациентами, включенными в наше исследование, позволит оценить возможную связь экспрессии СА IX в гипоксии с общей и безрецидивной выживаемостью в соответствующих группах.

VEGF A также активно исследуется как возможный фактор прогноза, влияющий на выживаемость больных СМТ. Так, показано, что VEGF A не является независимым фактором прогноза общей и безрецидивной выживаемости, при этом у 78 % умерших на момент исследования пациентов был выявлен высокий уровень VEGF A в опухоли [10]. Степень злокачественности опухоли значительно коррелировала с экспрессией VEGF A. Для опухолей низкой степени злокачественности характерен низкий уровень VEGF A, тогда как в опухолях высокой степени злокачественности выявлен высокий уровень этого показателя ($p < 0,05$). Т.К. Kilvaeg и соавт. изучили 249 образцов СМТ и показали, что VEGF A — фактор прогноза безрецидивной выживаемости ($p < 0,05$) в однофакторном анализе. При переходе к многофакторному анализу не было доказано, что VEGF A является независимым фактором прогноза; в качестве такого фактора для

Таблица 5. Анализ взаимосвязи между уровнем VEGF A и хемочувствительностью саркомы мягких тканей

Table 5. Analysis of the relationship between VEGF A expression and chemosensitivity of soft tissue sarcoma

Препарат Drug	Саркомы мягких тканей (общая группа) Soft tissue sarcoma (common group)			Плеоморфные саркомы Pleomorphic sarcoma			Липосаркомы Liposarcoma			Синовиальные саркомы Synovial sarcoma		
	CA IX в нормоксии CA IX in normoxia	CA IX в гипоксии CA IX in hypoxia	Индекс* Index*	CA IX в нормоксии CA IX in normoxia	CA IX в гипоксии CA IX in hypoxia	Индекс* Index*	CA IX в нормоксии CA IX in normoxia	CA IX в гипоксии CA IX in hypoxia	Индекс* Index*	CA IX в нормоксии CA IX in normoxia	CA IX в гипоксии CA IX in hypoxia	Индекс* Index*
Доксорубин Doxorubicin	R = 0,05 p = 0,8	R = 0,02 p = 0,9	R = -0,05 p = 0,8	R = 0,05 p = 0,9	R = 0,09 p = 0,8	R = 0,08 p = 0,8	R = -0,2 p = 0,7	R = -0,1 p = 0,9	R = 0,8 p = 0,04	R = -0,5 p = 0,4	R = -0,5 p = 0,4	R = 0,03 p > 0,9
Ифосфамид Ifosfamide	R = 0,3 p = 0,1	R = 0,2 p = 0,2	R = -0,3 p = 0,1	R = 0,2 p = 0,5	R = 0,2 p = 0,5	R = -0,4 p = 0,2	R = 0,01 p > 0,9	R = 0,1 p = 0,9	R = 0,3 p = 0,5	R = 0,2 p = 0,7	R = 0,2 p = 0,7	R = -0,8 p = 0,1
Доксорубин + ифосфамид Doxorubicin + ifosfamide	R = 0,2 p = 0,2	R = 0,2 p = 0,4	R = -0,2 p = 0,2	R = 0,2 p = 0,5	R = 0,2 p = 0,6	R = -0,4 p = 0,2	R = -0,1 p = 0,8	R = -0,1 p = 0,9	R = 0,4 p = 0,3	R = -0,2 p = 0,7	R = -0,2 p = 0,7	R = -0,3 p = 0,6
Доцетаксел Docetaxel	R = -0,1 p = 0,8	R = -0,05 p = 0,8	R = 0,01 p = 0,9	R = 0,4 p = 0,1	R = 0,3 p = 0,3	R = -0,6 p = 0,06	R = -0,7 p = 0,05	R = -0,6 p = 0,1	R = 0,9 p = 0,001	R = -0,4 p = 0,4	R = -0,4 p = 0,4	R = 0,2 p = 0,7
Гемцитабин Gemcitabine	R = 0,04 p = 0,8	R = 0,01 p = 0,9	R = 0,1 p = 0,5	R = 0,4 p = 0,2	R = 0,3 p = 0,3	R = -0,2 p = 0,5	R = -0,8 p = 0,03	R = -0,7 p = 0,1	R = 0,6 p = 0,1	R = -0,2 p = 0,7	R = -0,2 p = 0,7	R = 0,4 p = 0,4
Доцетаксел + гемцитабин Docetaxel + gemcitabine	R = -0,03 p = 0,8	R = -0,03 p = 0,9	R = 0,02 p = 0,3	R = 0,1 p = 0,6	R = -0,01 p = 0,9	R = -0,2 p = 0,5	R = -0,8 p = 0,02	R = -0,7 p = 0,04	R = 0,8 p = 0,04	R = -0,5 p = 0,4	R = -0,5 p = 0,4	R = 0,1 p = 0,8

*Индекс VEGF A рассчитывали как отношение уровней экспрессии показателя в гипоксии и нормоксии.

*The VEGF A index was calculated as the ratio of the expression of in hypoxia and normoxia.

СМТ авторы предлагают VEGFR-3, один из рецепторов семейства VEGFR [11].

Основное ограничение всех указанных работ — достаточно высокая вариабельность условий при заборе и хранении образцов СМТ. Поскольку при хирургическом вмешательстве происходит разная степень оксигенации опухолевой ткани, можно предположить, что до момента процессинга образец подвергается достаточно длительному воздействию кислорода из атмосферы. Воздействие атмосферы может значительно изменить уровень некоторых гипоксических факторов, особенно это значимо для факторов HIF, которые в ответ на реоксигенацию быстро деградируют. Эти обстоятельства заметно осложняют изучение гипоксических белков в клиническом материале. Предложенная нами *ex vivo* система не имеет таких недостатков и позволяет стандартизировать анализ СМТ в гипоксии: все образцы подвергаются одинаковой обработке

в течение 24 ч, исключена вариабельность условий эксперимента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе данной работы получен ряд образцов переживающих культур СМТ, для которых определена чувствительность к основным химиопрепаратам (доксорубину, ифосфамиду, доцетакселу, гемцитабину) и их комбинациям. Впервые на *ex vivo* модели СМТ проанализирована связь хемочувствительности с экспрессией гипоксических белков CA IX и VEGF A. Экспрессия CA IX коррелировала с резистентностью клеток СМТ к ифосфамиду и его комбинации с доксорубином. Культуры липосарком с высоким уровнем экспрессии VEGF A имели высокую чувствительность к гемцитабину и его комбинации с доцетакселом, в то время как способность СМТ изменять активность экспрессии VEGF A в ответ на гипоксию была

связана с резистентностью к доксорубину, доцетакселу и его комбинации с гемцитабином. Полученные на переживающих культурах данные свидетельствуют о взаимосвязи гипоксического сигналинга и резистентности СМТ к химиотерапии. Дальнейшее

развитие направления позволит оценить рациональность включения новых *ex vivo* тестов в рутинную практику, в частности, предстоит проследить взаимосвязь экспериментальных данных и отдаленных клинических наблюдений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hoang N.T., Acevedo L.A., Mann M.J. et al. A review of soft-tissue sarcomas: translation of biological advances into treatment measures. *Cancer Manag Res* 2018;10:1089–114. DOI: 10.2147/CMAR.S159641.
2. Jimenez R.E., Zalupski M.M., Frank J.J. et al. Multidrug resistance phenotype in high grade soft tissue sarcoma: correlation of P-glycoprotein immunohistochemistry with pathologic response to chemotherapy. *Cancer* 1999;86(6):976–81. DOI: 10.1002/(sici)1097-0142(19990915)86:6<976::aid-cncr12>3.0.co;2-3.
3. Hsu J.Y., Seligson N.D., Hays J.L. et al. Clinical utility of CDK4/6 Inhibitors in sarcoma: successes and future challenges. *JCO Precis Oncol* 2022;6:e2100211. DOI: 10.1200/po.21.00211.
4. Yuan J., Li X., Yu S. Molecular targeted therapy for advanced or metastatic soft tissue sarcoma. *Cancer Control* 2021;28:10732748211038424. DOI: 10.1177/10732748211038424.
5. Majidpoor J., Mortezaee K. Angiogenesis as a hallmark of solid tumors – clinical perspectives. *Cell Oncol (Dordr)* 2021;44(4):715–37. DOI: 10.1007/s13402-021-00602-3.
6. Ibrahim-Hashim A., Estrella V. Acidosis and cancer: from mechanism to neutralization. *Cancer Metastasis Rev* 2019;38(1–2):149–55. DOI: 10.1007/s10555-019-09787-4.
7. Swietach P. What is pH regulation, and why do cancer cells need it? *Cancer Metastasis Rev* 2019;38(1–2):5–15. DOI: 10.1007/s10555-018-09778-x.
8. Gatenby R.A., Gillies R.J. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;8(1):56–61. DOI: 10.1038/nrc2255.
9. Becker H.M. Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer. *Br J Cancer* 2020;122(2):157–67. DOI: 10.1038/s41416-019-0642-z.
10. Chao C., Al-Saleem T., Brooks J.J. et al. Vascular endothelial growth factor and soft tissue sarcomas: tumor expression correlates with grade. *Ann Surg Oncol* 2001;8(3):260–7. DOI: 10.1007/s10434-001-0260-9.
11. Kilvaer T.K., Valkov A., Sorbye S. et al. Profiling of VEGFs and VEGFRs as prognostic factors in soft tissue sarcoma: VEGFR-3 is an independent predictor of poor prognosis. *PLoS One* 2010;5(12):e15368. DOI: 10.1371/journal.pone.0015368.
12. Forker L., Gaunt P., Sioletic S. et al. The hypoxia marker CAIX is prognostic in the UK phase III VortX-Biobank cohort: an important resource for translational research in soft tissue sarcoma. *Br J Cancer* 2018;118(5):698–704. DOI: 10.1038/bjc.2017.430.
13. Rodríguez-Corrales J., Josán J.S. Resazurin live cell assay: setup and fine-tuning for reliable cytotoxicity results. *Methods Mol Biol* 2017;1647:207–19. DOI: 10.1007/978-1-4939-7201-2_14.
14. Qi C.J., Ning Y.L., Zhu Y.L. et al. *In vitro* chemosensitivity in breast cancer using ATP-tumor chemosensitivity assay. *Arch Pharm Res* 2009;32(12):1737–42. DOI: 10.1007/s12272-009-2211-0.
15. Neubauer H., Stefanova M., Solomayer E. et al. Predicting resistance to platinum-containing chemotherapy with the ATP tumor chemosensitivity assay in primary ovarian cancer. *Anticancer Res* 2008;28(2a):949–55.
16. Scherbakov A.M., Zhabinskii V.N., Khripach V.A. et al. Biological evaluation of a new brassinosteroid: antiproliferative effects and targeting estrogen receptor α pathways. *Chem Biodivers* 2019;16(9):e1900332. DOI: 10.1002/cbdv.201900332.
17. Martin W.M., McNally N.J. Cytotoxicity of adriamycin to tumour cells *in vivo* and *in vitro*. *Br J Cancer* 1980;42(6):881–9. DOI: 10.1038/bjc.1980.336.
18. Yamauchi T., Raffin T.A., Yang P. et al. Differential protective effects of varying degrees of hypoxia on the cytotoxicities of etoposide and bleomycin. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987;19(4):282–6. DOI: 10.1007/bf00261473.
19. Young S.D., Hill R.P. Effects of reoxygenation on cells from hypoxic regions of solid tumors: anticancer drug sensitivity and metastatic potential. *J Nat Cancer Inst* 1990;82(5):371–80. DOI: 10.1093/jnci/82.5.371.
20. Woods M.L., Koch C.J., Lord E.M. Detection of individual hypoxic cells in multicellular spheroids by flow cytometry using the 2-nitroimidazole, EF5, and monoclonal antibodies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;34(1):93–101. DOI: 10.1016/0360-3016(95)02006-3.
21. Harrison L., Blackwell K. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *Oncologist* 2004;9(Suppl. 5):31–40. DOI: 10.1634/theoncologist.9-90005-31.
22. Nordsmark M., Alsner J., Keller J. et al. Hypoxia in human soft tissue sarcomas: adverse impact on survival and no association with p53 mutations. *Br J Cancer* 2001;84(8):1070–5. DOI: 10.1054/bjoc.2001.1728.
23. Måseide K., Kandel R.A., Bell R.S. et al. Carbonic anhydrase IX as a marker for poor prognosis in soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(13):4464–71. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-03-0541.

Вклад авторов:

А.М. Щербаков: проведение экспериментов, анализ данных, написание статьи, управление проектом, разработка дизайна исследования;
Т.И. Фетисов, Д.В. Сорокин: проведение экспериментов, анализ данных, написание статьи;
В.Ю. Зиновьева, Н.И. Моисеева, Л.А. Лалетина, А.Е. Маникайло, Л.Я. Фомина, Л.В. Мехеда, А.Ю. Бохян, Е.А. Лесовая, Л.С. Труханова, Т.Г. Горькова, Е.Е. Антошина, О.В. Морозова: получение и характеристика клинических образцов;
Е.М. Кирилин: анализ данных;
К.И. Кирсанов*: управление проектом, редактирование статьи;
М.Г. Якубовская*: управление проектом, разработка дизайна исследования.

*Равнозначный вклад авторов.

Authors' contributions

A.M. Scherbakov: conducting experiments, data analysis, writing the manuscript, project management, study design;
T.I. Fetisov, D.V. Sorokin: conducting experiments, data analysis, writing the manuscript;
V.Yu. Zinovieva, N.I. Moiseeva, L.A. Laletina, A.E. Manikaylo, L.Ya. Fomina, L.V. Mekheda, B.Yu. Bokhyan, E.A. Lesovaya, L.S. Trukhanova, T.G. Gor'kova, E.E. Antoshina, O.V. Morozova: obtaining and characterization of clinical samples;
E.M. Kirilin: data analysis;
K.I. Kirsanov*: project management, manuscript editing;
M.G. Yakubovskaya*: project management, study design.
*Equivalent contribution of the authors.

ORCID авторов / ORCID of authors

A.M. Щербakov / A.M. Scherbakov: <https://orcid.org/0000-0002-2974-9555>
Т.И. Фетисов / T.I. Fetisov: <https://orcid.org/0000-0002-5082-9883>
Д.В. Сорокин / D.V. Sorokin: <https://orcid.org/0000-0002-1264-7405>
В.Ю. Зиновьева / V.Yu. Zinovieva: <https://orcid.org/0000-0003-2809-8487>
Н.И. Моисеева / N.I. Moiseeva: <https://orcid.org/0000-0001-6697-7154>
Л.А. Лалетина / L.A. Laletina: <https://orcid.org/0000-0002-8839-5881>
Е.М. Кирилин / E.M. Kirilin: <https://orcid.org/0000-0003-4960-8925>
А.Е. Маникайло / A.E. Manikaylo: <https://orcid.org/0000-0002-1574-0082>
Л.Я. Фомина / L.Ya. Fomina: <https://orcid.org/0000-0002-9306-5465>
Л.В. Мехеда / L.V. Mekheda: <https://orcid.org/0000-0002-6445-9983>
А.Ю. Бохян / B.Yu. Bokhyan: <https://orcid.org/0000-0002-1396-3434>
Е.А. Лесовая / E.A. Lesovaya: <https://orcid.org/0000-0002-1967-9637>
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>

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 № 18-29-09095).

Financing. The study was performed with the support of the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 18-29-09095).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. с изменениями 2013 г. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (проект № 18-29-09095, протокол № 18-29-09095 от 28.09.2018).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki of 1964, as amended in 2013. The study protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of the N.N. Blokhin National Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia (project 18-29-09095, protocol No. 18-29-09095 dated September 28, 2018).

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

Статья поступила: 29.03.2022. **Принята к публикации:** 26.05.2022.

Article submitted: 29.03.2022. **Accepted for publication:** 26.05.2022.

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-66-78



Резистентность клеток рака молочной железы к полностью трансретиноевой кислоте ассоциирована со снижением базального уровня экспрессии ядерного рецептора *RARα* и индукции экспрессии цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1*

А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, Н.В. Елкина, М.Е. Аксельрод, С.А. Кузьмичев, Е.М. Чевкина

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

Контакты: Андрей Викторович Комельков komelkov@gmail.com

Введение. Ретиноевая кислота (РК) является одним из ключевых регуляторов дифференцировки клеток и важнейшим участником таких системных процессов в организме, как эмбриональное развитие, созревание и функционирование клеток иммунной системы, ремоделирование тканей и ряд других. Это соединение обладает противоопухолевой активностью благодаря своей способности стимулировать дифференцировку, индуцировать апоптоз и подавлять пролиферацию клеток злокачественных новообразований. Быстрое приобретение резистентности к РК и ее аналогам клетками солидных опухолей является одной из основных проблем, ограничивающих широкое применение естественных и синтетических ретиноидов в терапии злокачественных новообразований. Механизмы развития данной резистентности остаются до сих пор малопонятными.

Цель исследования – оценка связи уровня базальной экспрессии ядерного рецептора *RARα* и РК-индуцированной экспрессии цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1* с резистентностью клеток рака молочной железы к действию полностью трансретиноевой кислоты.

Материалы и методы. Проведены культивирование клеточных линий, анализ чувствительности клеток рака молочной железы к действию полностью трансретиноевой кислоты, выделение РНК, обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени.

Результаты. В данной работе с использованием экспериментальной модели, включающей 9 линий клеток рака молочной железы, различающихся по уровню чувствительности к РК, мы показали, что экспрессия матричной РНК гена ядерного рецептора РК, *RARα*, а также уровень индукции матричной РНК генов цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1* в ответ на обработку РК коррелируют с РК-чувствительностью клеток.

Заключение. Таким образом, снижение экспрессии *RARα* и способности катаболизировать РК являются факторами, ассоциированными с РК-резистентностью клеток рака молочной железы.

Ключевые слова: полностью трансретиноевая кислота, рак молочной железы, *RARα*, *CYP26A1*, *CYP26B1*, резистентность к ретиноевой кислоте

Для цитирования: Еникеев А.Д., Комельков А.В., Елкина Н.В. и др. Резистентность клеток рака молочной железы к полностью трансретиноевой кислоте ассоциирована со снижением базального уровня экспрессии ядерного рецептора *RARα* и индукцией экспрессии цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1*. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2): 66–78. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-66-78.

Resistance of breast cancer cells to all-trans retinoic acid is associated with a decrease in the basal level of nuclear receptor *RARα* expression and induction of cytochrome *CYP26A1* and *CYP26B1* expression

A. D. Enikeev, A. V. Komelkov, N. V. Elkina, M. E. Akselrod, S. A. Kuzmichev, E. M. Tchevkina

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

Contacts: Andrey Viktorovich Komelkov komelkov@gmail.com

Introduction. Retinoic acid (RA) is a key regulator of cell differentiation and a critical player in such systemic processes in the body as embryonic development, immune system cell maturation and functioning, tissue remodeling and several others. This compound displays an antitumor activity due to its ability to stimulate differentiation, induce apoptosis and inhibit proliferation of malignant cells. The rapid acquisition of resistance to RA and its analogues by solid tumor cells is one of the main problems limiting the widespread use of retinoids in the therapy of malignant neoplasms. The mechanisms of RA-resistance are still poorly understood.

The study objective – assessment of the relationship between the basal expression level of the nuclear *RARα* receptor and the RA-induced expression of the cytochromes *CYP26A1* and *CYP26B1* with the resistance of breast cancer cells to the action of all-trans-retinoic acid.

Materials and methods. Cell lines were cultured, the sensitivity of breast cancer cells to the action of fully trans-retinoic acid, RNA isolation, reverse transcription reaction and real-time polymerase chain reaction were analyzed).

Results. In present study, using an experimental model represented by 9 breast cancer cell lines with different level of sensitivity to RA, we showed that the expression of the RA nuclear receptor *RARα*, as well as the level of mRNA induction of *CYP26A1* and *CYP26B1* cytochromes in response to RA treatment correlate with RA-sensitivity.

Conclusion. Thus, a decrease of *RARα* expression as well as the reduced ability to catabolize RA are factors associated with RA-resistance of breast cancer cells.

Key words: all-trans retinoic acid, breast cancer, *RARα*, *CYP26A1*, *CYP26B1*, resistance to retinoic acid

For citation: Enikeev A.D., Komelkov A.V., Elkina N.V. et al. Resistance of breast cancer cells to all-trans retinoic acid is associated with a decrease in the basal level of nuclear receptor *RARα* expression and induction of cytochrome *CYP26A1* and *CYP26B1* expression. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):66–78. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-66-78.

ВВЕДЕНИЕ

Внутриклеточная активность ретиноевой кислоты (ПК) реализуется преимущественно за счет активации транскрипции ретиноид-респонсивных генов, к которым относятся регуляторы транспорта и метаболизма ретиноидов, в том числе самой ПК (гены, кодирующие белки катаболизма ретинола (CRBP1/2), белки, связывающие ПК в цитоплазме и транспортирующие ее в ядро (CRABP1/2), белки катаболизма ПК (цитохромы CYP26) и др.), гормоны (например, гормон роста) и ферменты, вовлеченные в синтез стероидных гормонов (например, EDH17B2), мембранные рецепторы, различные молекулы, регулирующие состав внеклеточного матрикса (тканевой активатор плазминогена, ламинин B1, β3-интегрин и др.) [1, 2]. Также ПК напрямую или опосредованно изменяет активность ключевых сигнальных путей и белков, задействованных в регуляции канцерогенеза и опухолевой прогрессии, таких как NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell), ИНФγ (интерферон γ), TGFβ (transforming growth factor β), VEGF (vascular endothelial growth factor) [3–5], AP-2 [6], Btg² [7], гены каспаз 7 и 9, а также активирующих их сериновых протеаз [5, 8] и других генов, вовлеченных в индукцию апоптоза. К таким генам относятся *BIRC5* (сурвивин), *Bcl-2* [9, 10], *TRAIL* (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, или Apo-2L), а также *C/EBP* (epsilon) (CCAAT/enhancer binding protein), *UBE1L* (ubiquitin-activating enzyme E1-like protein) и др. Есть данные об ПК-зависимом усилении экспрессии фактора транскрипции SOX9 и опухолевого супрессора PDCD4 [11, 12].

Ретиноевая кислота синтезируется в клетке из предшественников ретинола (витамина А) и его эфиров и существует в виде различных изомеров:

13-цис-ПК, 9-цис-ПК и полностью трансретиноевой кислоты (all-trans retinoic acid, ATRA). Последний является максимально представленной в клетке формой ПК и обладает наибольшей транскрипционной активностью [13, 14]. Удаление избытков ПК в клетке осуществляется путем ее катаболизма ферментами семейства P450 системы цитохромов, что приводит к образованию так называемых полярных метаболитов, которые являются физиологически менее активными соединениями. Наибольшей аффинностью к ПК обладают цитохромы CYP26A1 и CYP26B1, которые связывают ATRA и другие изоформы ПК в цитоплазме и катаболизируют ее до 4-ОН-РА, 4-охо-РА и других соединений, защищая клетку от избытка ПК в цитоплазме и препятствуя ее попаданию в ядро [15, 16].

Транспорт ПК в цитоплазме осуществляют белки семейства iLBP (intracellular lipid binding proteins), прежде всего CRABP1/2 (cellular retinoic acid-binding protein), а также FABP5 (fatty acid-binding protein), которые доставляют ее в ядро, где она взаимодействует с рецепторами, относящимися к семейству рецепторов стероидных и тиреоидных гормонов [17]. Ядерные рецепторы ПК представляют собой лиганд-активируемые транскрипционные факторы. Взаимодействие с лигандом приводит к их активации, а также к стимуляции транскрипции генов, в промоторе которых имеются определенные последовательности — ретиноид-респонсивные элементы (retinoic acid response element, RARE). Основными типами рецепторов, связывающих ПК, являются белки RAR (retinoic acid receptor), RXR (retinoid X receptor), а также PPAR (peroxisomal proliferator-activated receptor). Максимально эффективным считается *RARα*, обладающий наибольшей аффинностью к ПК. С рецепторами RAR связываются ATRA и 9-цис-ПК. Лигандом RXR является 9-цис-ПК.

Экспрессия рецепторов РК регулируется ими самими, что создает петли обратной связи, или другими рецепторами того же семейства, например ER α (estrogen receptor α) [13, 18–20].

Опухоль-супрессорная активность РК показана для многих типов опухолей. Эта кислота не только стимулирует дифференцировку [21–24], но и снижает пролиферативную активность опухолевых клеток [25, 26], активирует процесс апоптоза [27–29], а также подавляет ангиогенез [30, 31]. В клинической практике АТРА наиболее успешно используется в качестве основного препарата при терапии острого промиелоцитарного лейкоза [13, 32–36]. Прошли успешные клинические испытания применения ретиноидов в лечении некоторых форм Т-клеточной лимфомы [37]. Предпринимаются активные попытки использования АТРА и других природных и синтетических ретиноидов в терапии онкологических заболеваний, таких как саркома Капоши [38], плоскоклеточный рак головы и шеи [39], нейробластома [40] и др. [3, 13, 18, 41]. Однако эффективность ретиноидов в терапии большинства солидных опухолей ограничена прежде всего в связи с быстро развивающейся устойчивостью к ним [3, 42, 43].

Механизмы возникновения РК-резистентности до сих пор не до конца понятны. Существует множество гипотез, которые можно условно разделить на несколько основных групп. Согласно первой группе гипотез развитие РК-резистентности связано с ограничением биодоступности ретиноидов, которое происходит из-за снижения метаболизма ретинола, нарушения внутриклеточного транспорта ретинола и ретиноидов (в том числе самой РК), усиления их деградации или удаления из клетки [44]. Устойчивость к РК также может быть вызвана изменением РК-зависимой транскрипции ретиноид-респонсивных генов, которая может реализовываться за счет «эпигенетического молчания» или подавления активности рецепторов РК, RAR α , (возможно, и других) и/или кофакторов, активирующих или подавляющих РК-зависимую транскрипцию, таких как XAB2 [45], ZNF423 [46] или HDAC (вторая группа гипотез) [47]. Согласно гипотезам третьей группы развитие РК-резистентности обусловлено неканонической (негеномной) активностью РК, которая заключается в не зависящей от транскрипции активации белков, играющих ключевую роль в процессах малигнизации клеток. Так, считается, что РК способна регулировать активность MAP-киназ ERK1/2 и p38, а также антиапоптотической киназы АКТ [48, 49], что приводит к усилению злокачественного потенциала клеток и вызывает развитие устойчивости к РК [50–53].

Несмотря на множество гипотез о механизмах формирования РК-резистентности, исследований, в которых бы сравнивались различные факторы, потенциально определяющие устойчивость клеток к РК, в рамках единой экспериментальной модели ранее

не проводилось. Недавно мы показали, что клетки рака молочной железы (РМЖ), в отличие от многих других типов эпителиальных опухолей, характеризуются широким диапазоном РК-чувствительности: от полной резистентности до высокой чувствительности [54]. Это обуславливает перспективность данной экспериментальной модели с точки зрения исследования механизмов РК-резистентности.

В данной работе мы впервые сравнили экспрессию основного ядерного рецептора РК RAR α , а также ферментов катаболизма этой кислоты, CYP26A1 и CYP26B1, в клетках РМЖ с использованием панели из 9 клеточных линий, различающихся по уровню чувствительности к РК. Анализ показал наличие достоверных корреляций уровня РК-чувствительности с экспрессией матричной РНК (мРНК) гена RAR α , а также с уровнем индукции мРНК генов CYP26A1 и CYP26B1 в ответ на инкубацию клеток с АТРА. Таким образом, для клеток РМЖ оба параметра — базальный уровень экспрессии ядерного рецептора РК RAR α и степень активации ферментов катаболизма — являются факторами, ассоциированными с РК-резистентностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. В работе были использованы 9 клеточных линий клеток РМЖ. Для культивирования клеток MCF7, MDA-MB-453, MDA-MB-468, MDA-MB-231 и HBL100 использовали среду DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) («ПанЭко», Россия), клеток T47D, SKBR3, HCC1954, HCC1937 — среду RPMI («ПанЭко», Россия). Культивирование проводили в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂) в присутствии глутамина (0,292 мг/мл), смеси пенициллина и стрептомицина (100 ед/мл и 100 мкг/мл соответственно) («ПанЭко», Россия), а также 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Biological Industries, США).

Анализ чувствительности клеток к ретиноевой кислоте. Полностью трансретиноевую кислоту (Merck, США) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) для приготовления стокового раствора в концентрации 10 мМ. Клетки высаживали в количестве 50–300 тыс. в зависимости от клеточной линии и культивировали в течение 5 сут в присутствии АТРА в диапазоне концентраций 0,1–100 мкМ.

В связи с тем, что АТРА не является цитотоксическим агентом [55], мы оценивали ее влияние на динамику пролиферации клеток, для чего строили кривые роста и сравнивали количество клеток в «нулевой» точке и после инкубации. Клетки снимали 0,25 % раствором трипсин-этилендиаминтетрауксусной кислоты (трипсин-ЭДТА), смешивали с красителем трипановый синий 1 : 1 и подсчитывали с помощью камеры Горяева. В качестве контроля для каждой линии использовали клетки, культивируемые параллельно в течение того же времени в среде без АТРА, содержащей ДМСО в соответствующей концентрации. Количество живых клеток в контроле для каждой линии принимали

за 100 %. Чувствительность к РК оценивали в 3 повторениях для каждого из измерений, соответствующих каждой концентрации ATRA.

Для анализа уровня экспрессии генов в присутствии РК была выбрана концентрация ATRA, равная 1 мкМ, поскольку она была минимально эффективной в отношении влияния РК на пролиферацию клеток (средняя концентрация начала снижения пролиферации различных линий РК-чувствительных клеток). Клетки инкубировали с ATRA в течение 3 сут.

Выделение РНК. После 72 ч культивирования в стандартных условиях и в присутствии ATRA выделяли тотальную РНК из клеток методом тризольно-хлороформной экстракции с использованием TRI Reagent (Merck, США). Клетки снимали с чашки раствором Версена, осаждали центрифугированием (6 мин, 3600 об./мин), отбирали супернатант, к осадку добавляли 1 мл TRI Reagent и 200 мкл хлороформа и инкубировали 15 мин. После этого центрифугировали 15 мин при 13 200 об./мин, отбирали верхнюю фазу и растворяли ее в 200 мкл изопропанола, перемешивали на вортексе и инкубировали 15 мин. Затем центрифугировали 15 мин при 13 200 об./мин, отбирали супернатант, к осадку добавляли 750 мкл этилового спирта. После этого смесь центрифугировали 15 мин при 13 200 об./мин, отбирали супернатант, к осадку добавляли 50 мкл ddH₂O. Очистку РНК от примесей ДНК проводили с помощью фермента DNase I, Amplification Grade (Invitrogen, США). К 2000 нг РНК добавляли 1 ед ДНКазы и инкубировали 15 мин при 25 °С, фермент инактивировали добавлением 1 мкл 25 мМ EDTA при 65 °С в течение 10 мин.

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени. Для получения комплементарной ДНК (кДНК) использовали 2000 нг тотальной РНК и проводили реакцию обратной транскрипции с использованием MMLV-ревертазы (в конечной концентрации 5 ед/мкл), случайного декануклеотидного праймера (20 мкМ) («Евроген», Россия). Реакцию проводили при 37 °С в течение 50 мин.

К 100 нг кДНК добавляли по 500 нМ смеси праймеров (см. таблицу), реакционную смесь для полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) в присутствии SYBR-green («Евроген», Россия) и проводили амплификацию в режиме: 95 °С, 15 с; 57 °С, 15 с; 72 °С, 30 с — 42 цикла. Относительный уровень экспрессии мРНК *RARα* оценивали с помощью расчета dCt для каждой линии. Нормализацию проводили по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Изменение экспрессии мРНК *CYP26A1*, *CYP26B1* при обработке ATRA вычисляли методом ddCt.

Статистическая обработка данных. Все данные были получены в ходе 3 независимых экспериментов. Данные представлены в виде среднего со стандартным отклонением (SD). Для статистической оценки данных использовали двухвыборочный t-критерий Стьюдента для зависимых и независимых выборок, крите-

рий Манна–Уитни, анализ дисперсии (ANOVA) для сравнения нескольких групп (с посттестом Даннетта). Для оценки трендов (значимости изменений переменной в ряду) применяли вариант ANOVA с проведением линейного анализа трендов. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для проведения расчетов и построения графиков использовали программы GraphPad 8.3 (GraphPad Software, США) и SPSS 26.0 (IBM, США).

Последовательности использованных праймеров для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени

Sequences of primers used in real-time polymerase chain reaction

Ген Gene	Последовательность Sequence
<i>RPL27</i>	Прямой: ACCGCTACCCCCGCAAAGTG Forward: ACCGCTACCCCCGCAAAGTG Обратный: CCCGTCGGGCCTTGCGTTTA Reverse: CCCGTCGGGCCTTGCGTTTA
<i>RAR</i>	Прямой: GGACATTGACCTCTGGGACA Forward: GGACATTGACCTCTGGGACA Обратный: AAGG TCATGGTGTCTGCTC Reverse: AAGG TCATGGTGTCTGCTC
<i>CYP26A1</i>	Прямой: CCAGAAAGTGCGAGAAGAGC Forward: CCAGAAAGTGCGAGAAGAGC Обратный: GTCTTCAGAGCAACCCGAAA Reverse: GTCTTCAGAGCAACCCGAAA
<i>CYP26B1</i>	Прямой: GCTGCATGATGAGTGAGGTG Forward: GCTGCATGATGAGTGAGGTG Обратный: CAGGGCAAGGACTACTTGGA Reverse: CAGGGCAAGGACTACTTGGA

РЕЗУЛЬТАТЫ

Корреляция экспрессии ядерного рецептора *RARα* с чувствительностью клеток рака молочной железы к ретиноевой кислоте. Ранее мы показали, что линии клеток РМЖ в значительной степени различаются по уровню чувствительности/резистентности к РК, что позволяет использовать эти клетки в качестве удобной экспериментальной модели для выявления молекулярных характеристик и факторов, связанных с РК-резистентностью. Так, анализ 9 клеточных линий РМЖ показал, что РК оказывает выраженный антипролиферативный эффект на клетки линий MCF7, T47D, SKBR3 и HCC1954. Снижение пролиферации в 2 и более раз наблюдалось при инкубации с ATRA уже в концентрации 0,1–1 мкМ. В то же время пролиферация РК-резистентных клеток (линии MDA-MB-453, MDA-MB-468, MDA-MB-231, HBL100, HCC1937) не снижалась даже при инкубации с ATRA в концентрации 10–20 мкМ. Таким образом, выраженные различия между линиями наблюдались в диапазоне 1–10 мкМ.

На основании полученных данных мы разделили исследуемые линии клеток на 2 группы, достоверно различающиеся по уровню пролиферации в присутствии

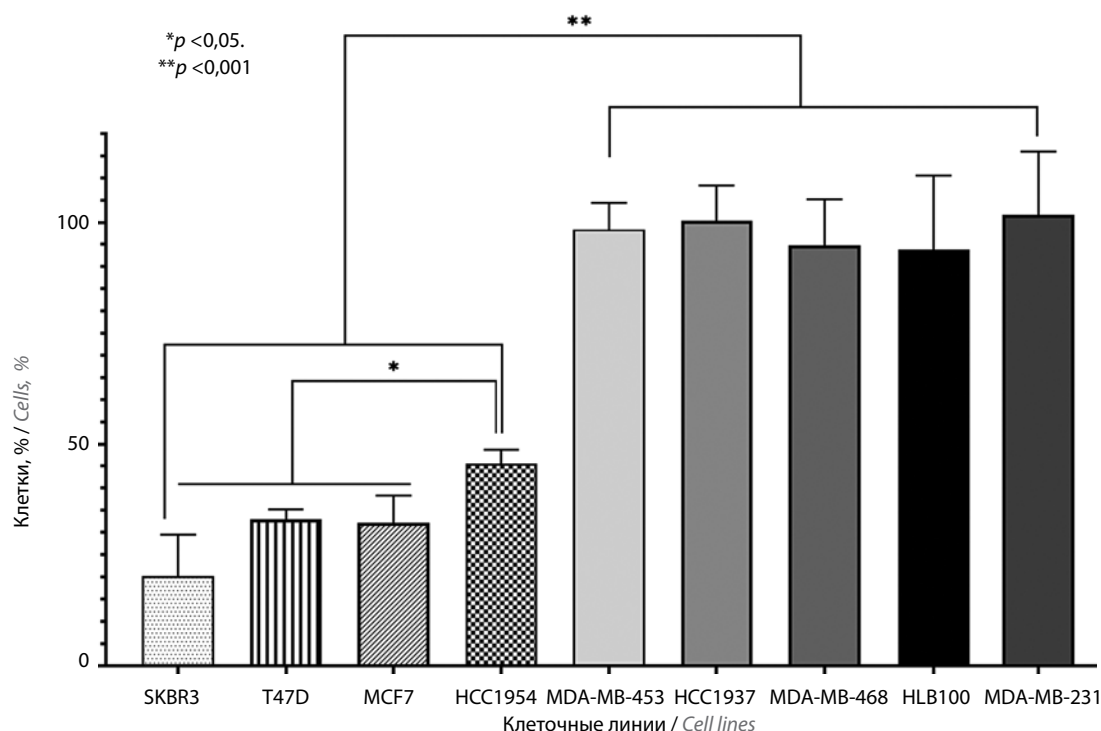


Рис. 1. Сравнение динамики пролиферации клеток рака молочной железы при инкубации с полностью трансретиноевой кислотой (ATRA). Указано количество живых клеток (%) после 5 сут культивирования в присутствии 10 мкМ ATRA по сравнению с контролем. Контроль: за 100 % взято количество живых клеток каждой линии после культивирования в течение того же времени в стандартной среде DMEM с добавлением диметилсульфоксида в концентрациях, соответствующих таковым при разведении ATRA. Диаграммы построены на основании средних значений для 3 независимых повторов эксперимента ($p < 0,001$, дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием посттеста Даннетта)

Fig. 1. Comparing the dynamics of breast cancer cell proliferation during their incubation with all-trans retinoic acid (ATRA). Proportion of viable cells (%) after 5-day cultivation with 10 μ M ATRA compared to control. Control: the number of living cells of each line after their cultivation in a standard DMEM medium during the same time with dimethyl sulfoxide added instead of ATRA (same concentration) was considered as 100 %. The diagrams are based on the mean values for 3 independent repeats of the experiment ($p < 0.001$, analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test)

ATRA ($p < 0,001$). В качестве порогового значения была выбрана концентрация 10 мкМ. Сравнение динамики пролиферации клеток РМЖ при инкубации с ATRA представлены на рис. 1. Также важно, что пороговая концентрация ATRA для разделения линий на РК-чувствительные и РК-резистентные выбрана нами произвольно. В действительности клетки можно расположить в некий ряд по чувствительности к РК, на одном конце которого будут максимально чувствительные, а на другом — максимально резистентные линии. Так, в группе РК-резистентных клеток выделяют линии, динамика пролиферации которых не менялась по сравнению с контролем даже при инкубации с 50 мкМ ATRA (HBL100, MDA-MB-231). Среди РК-чувствительных линий HCC1954 характеризовалась наименьшей чувствительностью к РК и даже демонстрировала значимые различия при сравнении с другими линиями данной группы ($p < 0,01$). Тем не менее при использовании концентрации ATRA 10 мкМ клеточные линии хорошо подразделялись на РК-чувствительные и РК-резистентные (см. рис. 1).

Сравнительный анализ экспрессии *RAR α* , проведенный методом обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени, выявил выраженные и достоверные различия между группой РК-чувствительных и РК-ре-

зистентных клеток ($p < 0,001$) (рис. 2, а). Клетки, чувствительные к РК, характеризовались более высоким уровнем мРНК *RAR α* по сравнению с клетками, резистентными к РК. При расчете разницы в экспрессии *RAR α* между группами РК-чувствительных и РК-резистентных линий методом ddCt (delta delta Cycle threshold) выявлено снижение экспрессии в группе резистентных клеточных линий в 5,1 раза (рис. 2, б). Показатель ddCt вычисляли путем вычитания из полученных значений dCt для резистентных клеточных линий значений dCt для чувствительных линий. Относительное изменение экспрессии (разы) рассчитывали как 2^{-ddCt} . Самый высокий уровень мРНК *RAR α* был детектирован в наиболее чувствительных к РК линиях T47D и SKBR3, а линия HCC1954, в которой отмечено наименьшее снижение среди РК-чувствительных клеток пролиферации при обработке ATRA, характеризовалась значимо меньшим уровнем экспрессии *RAR α* по сравнению с другими РК-чувствительными линиями ($p < 0,05$).

Была также подтверждена гипотеза о наличии значимого тренда (линейной зависимости уменьшения экспрессии *RAR α* от снижения РК-чувствительности ($p < 0,05$) в группе чувствительных к РК клеточных линий. Таким образом, в данных клеточных линиях

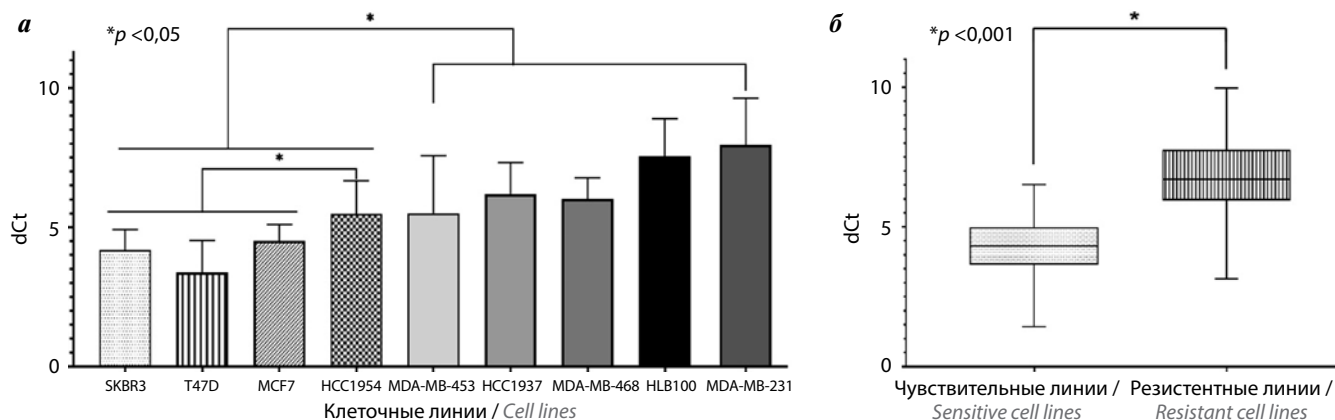


Рис. 2. Анализ экспрессии гена *RARα* в клетках рака молочной железы с различной чувствительностью к ретиноевой кислоте (РК): а — относительная экспрессия *RARα* в линиях РК-чувствительных и РК-резистентных клеток. dCt — разница между Ct *RARα* и Ct референсного гена *RPL27* (внутренний контроль). При увеличении значения dCt экспрессия уменьшается ($p < 0,05$; дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием пост-теста Даннетта); б — сравнение относительной экспрессии гена *RARα* в группах РК-чувствительных и РК-резистентных клеточных линий. Средние значения dCt в данных группах значительно различались ($p < 0,001$; критерий Манна–Уитни)

Рис. 2. Analysis of *RARα* expression in breast cancer cells with different sensitivity to retinoic acid (RA): а — relative *RARα* expression in RA-sensitive and RA-resistant cell lines. dCt — difference between *RARα* Ct and *RPL27* (reference gene) Ct (internal control). Expression decreases as dCt increases ($p < 0.05$; analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test); б — comparison of relative *RARα* expression between RA-sensitive and RA-resistant cell lines. There was a significant difference in mean dCt between these groups ($p < 0,001$; Mann–Whitney U test)

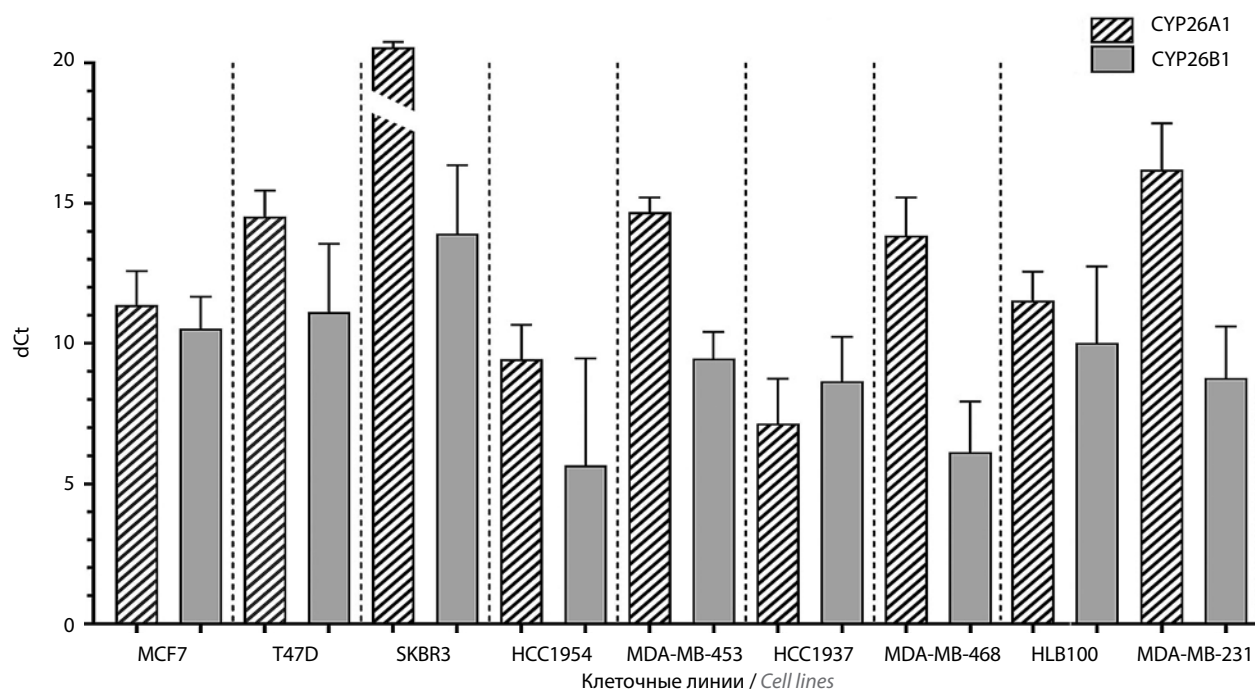


Рис. 3. Соотношение относительной экспрессии *CYP26A1* и *CYP26B1* при отсутствии полностью трансретиноевой кислоты в клетках чувствительных и резистентных к ретиноевой кислоте линий. Результаты представлены в виде значений dCt для каждого гена. Разрыв в данных для линии SKBR3 обозначает, что экспрессия *CYP26A1* достоверно не детектировалась

Fig. 3. *CYP26A1/CYP26B1* relative expression ratio in the absence of all-trans retinoic acid in retinoic acid-sensitive and resistant cell lines. Results are shown as dCt values for each gene. A gap in the data for the SKBR3 line indicates that the expression of *CYP26A1* was not reliably detected

экспрессия *RARα* изменялась сонаправленно с уровнем РК-чувствительности.

Обнаруженная нами корреляция уровня мРНК *RARα* с РК-чувствительностью и сонаправленное изменение этих характеристик в ряду исследуемых линий указывает на то, что снижение экспрессии *RARα* происходит параллельно со снижением РК-чувстви-

тельности и может быть одним из механизмов формирования РК-резистентности клеток РМЖ.

Высокий уровень активации экспрессии цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1*, чувствительных к РК клеток, при инкубации с ретиноевой кислотой. Для проверки гипотезы о связи возникновения РК-резистентности с экспрессией основных ферментов, ответственных за деградацию

РК, был проведен анализ уровней мРНК *CYP26A1* и *CYP26B1* в клетках рассматриваемой панели линий РМЖ. Результаты анализа базального уровня экспрессии не выявили достоверных различий между группами РК-чувствительных и РК-резистентных линий как для *CYP26A1*, так и для *CYP26B1*. В целом при отсутствии РК экспрессия *CYP26A1* была достаточно низкой, особенно в некоторых РК-чувствительных линиях. А в наиболее чувствительной линии SKBR3 она практически отсутствовала: детекция сигнала происходила уже за пределами диапазона достоверности значений ПЦР-реакции (>40 циклов). Экспрессия *CYP26B1* была выше, чем *CYP26A1*, практически во всех линиях, и это соотношение не было связано с РК-чувствительностью/резистентностью (рис. 3).

Поскольку экспрессия цитохромов индуцируется в ответ на добавление субстрата, далее мы исследовали уровень активации экспрессии генов *CYP26A1* и *CYP26B1* в ответ на добавление ATRA. Для этого сравнивались уровни мРНК *CYP26A1* и *CYP26B1* в стандартных условиях культивации и после инкубации с 1 мкМ ATRA. Данная концентрация ATRA соответствовала началу снижения пролиферации всех РК-чувствительных клеток, но вместе с тем еще не приводила к выраженному подавлению роста максимально РК-чувствительных линий (SKBR3). Таким образом, мы оценивали ранние молекулярные изменения, возникающие под действием ATRA. Результаты рассчитывались по методике ddCt, что соответствует разнице между уровнями мРНК исследуемых генов до и после обработки ATRA. Изменения уровней активации экспрессии *CYP26A1* и *CYP26B1* в ответ на действие ATRA в клетках всех исследуемых линий, выраженные в относительных единицах (разы), по сравнению с экспрессией в отсутствие ATRA, приведены на рис. 4, а и 4, б соответственно.

Согласно данным, представленным на рис. 4, РК-чувствительные линии характеризовались значительно большей индукцией *CYP26A1* по сравнению с группой РК-резистентных линий ($p < 0,001$). Это означает, что клетки, чувствительные к РК, способны эффективнее катаболизировать эту кислоту при увеличении ее внутриклеточной концентрации. В случае *CYP26B1* разница в индукции экспрессии между РК-чувствительными и РК-резистентными линиями была не настолько ярко выражена, как в случае *CYP26A1*, однако тоже была статистически значимой ($p < 0,02$).

Согласно полученным данным РК-резистентные клетки характеризуются, с одной стороны, значимо более низким уровнем экспрессии рецептора *RARα*, что может ограничивать реализацию транскрипционной активности РК, а с другой стороны — меньшим уровнем активации экспрессии цитохромов в ответ на обработку ATRA. Полученные результаты указывают на то, что резистентные клетки защищаются от антипролиферативной опухолесупрессорной активности РК за счет снижения проведения РК-зависимой

внутриклеточной сигнализации (уменьшения экспрессии *RARα*). В то же время они утрачивают способность быстро индуцировать катаболизм РК, что может быть, скорее, результатом, чем причиной РК-резистентности. Иными словами, опухолевые клетки в меньшей степени «опасаются» возрастания концентрации РК и, соответственно, увеличения ее опухолесупрессорной активности, если являются РК-резистентными.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ретиноевая кислота является наиболее активным внутриклеточным ретиноидом (производным ретинола, витамина А), роль которого в стимуляции дифференцировки и апоптоза, а также в снижении пролиферативной активности показана для многих типов клеток и тканей. Несмотря на очевидный успех применения РК в лечении гематопротопролиферативных заболеваний, терапия солидных опухолей на основе ретиноидов в качестве агентов для монотерапии или комбинированной терапии не показала высокой эффективности или обладала кратковременным эффектом. Подробно результаты этих исследований представлены в обзоре R.M. Connolly и др. [3].

Ограничение клинического применения РК в основном связано с быстрым развитием РК-резистентности клеток опухолей. Несмотря на многочисленные исследования, направленные на поиск причин и путей преодоления устойчивости к РК, механизмы ее возникновения до сих пор малопонятны. Это объясняется сложностью многоуровневых взаимодействий в системе внутриклеточного ретиноевого сигналинга. В процессах поддержания баланса РК внутри клеток задействовано множество белков, осуществляющих внутриклеточный транспорт и метаболизм ретинола и ретиноидов. Процессы, предшествующие образованию РК (ретинол—ретиноаль—РК), обратимы и находятся в динамическом равновесии. Также обратимы и реакции перехода различных стереоизомеров самой РК: 9-цис-РК и 13-цис-РК могут изомеризоваться в ATRA и наоборот, хотя первый процесс встречается чаще, поскольку ATRA, как уже говорилось, является наиболее транскрипционно активным изомером РК [14, 56, 57].

Следующим уровнем регуляции ретиноевого сигналинга является доставка РК к ядерным рецепторам, которая осуществляется белками CRABP1/2 и FABP4/5. Предполагается, что основным транспортером РК, способствующим проведению ее транскрипционной активности, выступает белок CRABP2. Функции CRABP1 на сегодняшний день не до конца понятны, но, возможно, он удерживает РК в цитоплазме, ограничивая ее попадание в ядро и тем самым препятствуя проведению РК-зависимого сигналинга. Данные некоторых исследований указывают на то, что этот белок способствует активации цитохромов CYP26 и катаболизму РК [58–62]. Вместе с тем есть свидетельства

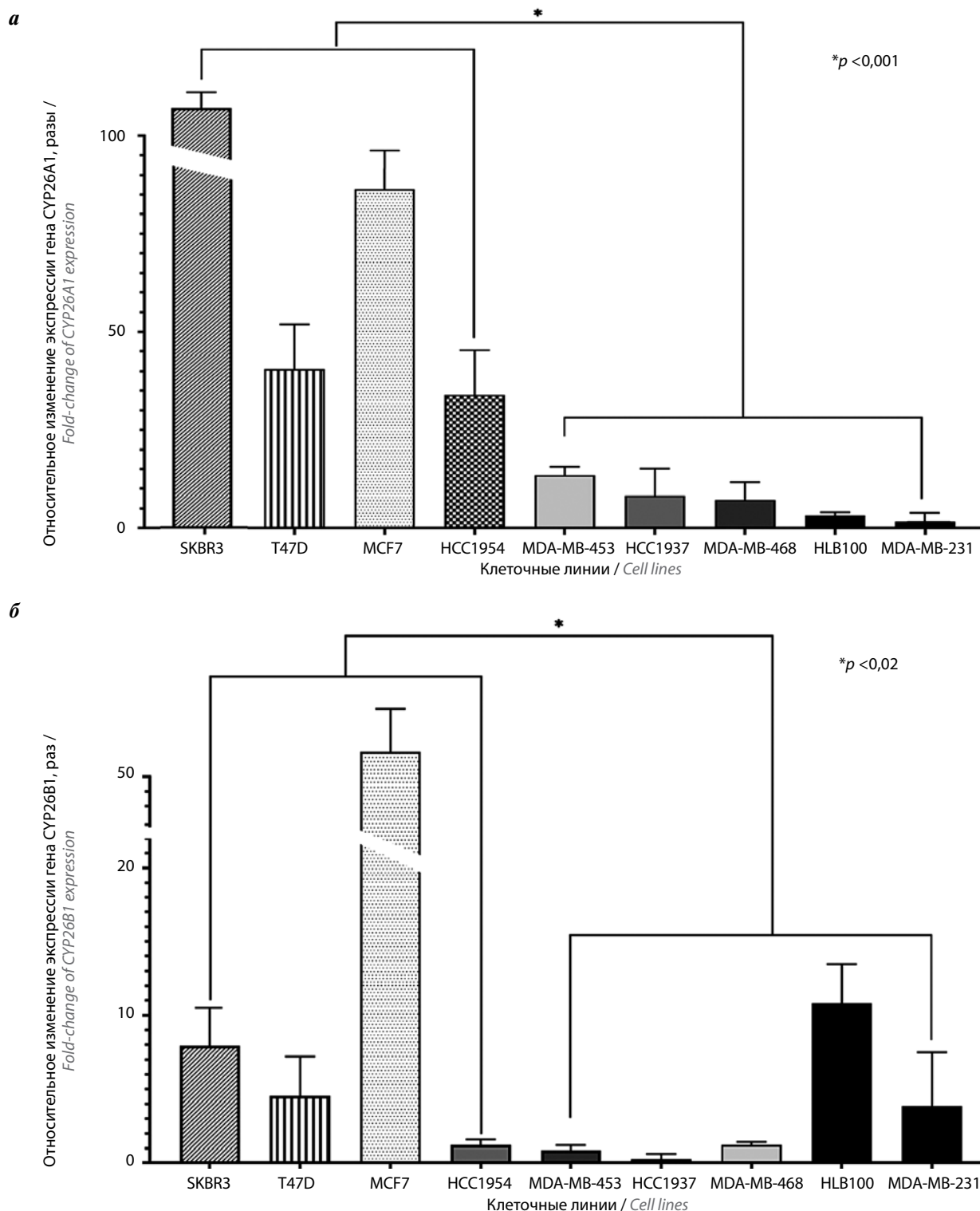


Рис. 4. Относительная экспрессия генов CYP26A1 и CYP26B1 после инкубации с полностью трансретиноевой кислотой (ATRA) в РК-чувствительных и РК-резистентных клеточных линиях: а — относительная экспрессия CYP26A1. Разрыв в данных для линии SKBR3 характеризует ситуацию, когда экспрессия CYP26A1 сильно (более чем в 100 раз) увеличивается после обработки ATRA при отсутствии достоверной детекции экспрессии в стандартных условиях культивации ($p < 0,001$; дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием пострестата Даннетта); б — относительная экспрессия CYP26B1. Разрыв данных для линии MCF7 характеризует ситуацию, когда экспрессия CYP26B1 после обработки ATRA увеличивается сильнее (более чем в 50 раз), чем в остальных линиях ($p < 0,02$; дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием пострестата Даннетта)

Fig. 4. Relative expression of CYP26A1 and CYP26B1 genes in RA-sensitive and RA-resistant cell lines after their incubation with all-trans retinoic acid (ATRA): а — relative CYP26A1 expression. A gap in the data for the SKBR3 line indicates that CYP26A1 expression has dramatically increased (more than 100-fold change) after ATRA treatment, while baseline expression in standard conditions could not be reliably detected ($p < 0.001$; analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test); б — relative expression of CYP26B1. A gap in the data for the MCF7 line indicates that CYP26B1 expression after ATRA treatment has increased more significantly (more than 50-fold change) than in other lines ($p < 0.02$; analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test)

повышения уровня CYP26A1 в ответ на высокие дозы РК при подавлении CRABP1 [63]. В нескольких работах показана возможная связь белка CRABP1 с РК-резистентностью [63, 64], однако эти данные получены на кератиноцитах или клетках плоскоклеточного эпителия. Выявлена роль белка CRABP2 в регуляции РК-чувствительности для клеток РМЖ линии MCF7. Так, гиперэкспрессия CRABP2 усиливала, а подавление экспрессии снижало чувствительность данных клеток к РК [65]. Однако проведенный нами ранее анализ экспрессии белков CRABP1 и CRABP2 на описанной модели из 9 линий клеток РМЖ не выявил достоверной корреляции с чувствительностью к РК [54].

Белки, связывающие РК, транспортируют ее в ядро, где передают RAR, RXR и PPAR, с помощью которых реализуется транскрипционная активность ретиноевой кислоты [18]. Важно отметить, что РК-связывающие белки обладают избирательностью в отношении доставки РК к определенным рецепторам. Так, предполагается, что CRABP2 транспортирует ее для взаимодействия с RAR и RXR, а FABP4/5 — для связывания с PPAR β/δ . Взаимодействие РК с различными рецепторами приводит, по-видимому, к активации транскрипции разных генов и, даже возможно, к противоположному эффекту в отношении роста и выживания клеток [66].

RAR β считается опухолевым супрессором. Его экспрессия в опухолях часто снижена [67, 68] в связи с метилированием промотора и изменениями структуры хроматина [69]. Эпигенетическое «молчание» данного белка может быть одним из механизмов возникновения РК-резистентности [70]. Важно отметить, что экспрессия RAR β регулируется белком RAR α . Опухоль-супрессорная функция RAR β (подавление пролиферации и стимуляция апоптоза) также, по-видимому, осуществляется с помощью активации RAR α . Так, РК-связанный RAR α взаимодействует с последовательностью RARE в промоторе RAR β , что приводит к активации его транскрипции и последующей трансактивации экспрессии множества генов, задействованных в регуляции апоптоза, пролиферации и дифференцировки [3].

Таким образом, ядерные рецепторы RAR могут быть факторами, определяющими РК-чувствительность клеток. Эта гипотеза была проверена в данной работе. Сравнение экспрессии RAR α в РК-чувствительных и РК-резистентных клетках РМЖ показало достоверную корреляцию уровня мРНК данного гена с РК-чувствительностью. Более того, было выявлено, что снижение экспрессии RAR α происходит сопоставленно с уменьшением РК-чувствительности в ряду исследуемых клеточных линий. Полученные нами данные согласуются с результатами работы, выполненной на клетках РМЖ с различным гормон-рецепторным статусом. Авторы показали, что подавление RAR α приводит к снижению РК-чувствительности клеток SKBR3. Также была выявлена коамплифика-

ция RAR α с рецептором ERBB2, что указывает на связь РК-чувствительности с экспрессией как RAR α , так и эстрогеновых рецепторов [71]. Эти же авторы показали, что RAR β играет большую роль в возникновении РК-чувствительности клеток РМЖ HCC1599 и MB-157, которая реализуется, в частности, за счет активации Notch1-зависимого сигнального пути. Было обнаружено, что подавление RAR β приводит к устойчивости данных клеток к действию РК [72].

Есть и другие свидетельства участия рецепторов RAR в развитии РК-чувствительности: так, в РК-резистентных линиях клеток рака пищевода T-1 и T-8 экспрессия генов RAR β подавлена, в то время как РК-чувствительные линии T-2, T-3, T-7, T-12 и T-13 экспрессируют RAR β на высоком уровне [73]. На клетках нейробластомы — одного из наиболее чувствительных к терапии РК типов солидных опухолей — показано, что проапоптотическая функция РК связана с протеосомной деградацией RAR α , а гиперэкспрессия RAR α в клетках нейробластомы приводит к повышению их чувствительности к РК [74].

Еще одним регулятором активности РК и потенциальным фактором, вовлеченным в формирование РК-резистентности, является система ее катаболизма, представленная преимущественно цитохромами семейства P450 и белками CYP26. Дегградация ATRA осуществляется преимущественно CYP26A1 и CYP26B1, хотя предполагается, что и другие представители данного семейства, такие как CYP3A4 и CYP2C8, могут участвовать в катаболизме ATRA и 13-цис-РК [75]. Хотя исследований, посвященных анализу связи экспрессии белков CYP26 с РК-чувствительностью опухолевых клеток, очень мало, есть гипотеза о том, что усиление катаболизма РК способствует РК-резистентности. На этом основании даже предпринимаются попытки повысить эффективность терапевтического эффекта РК с помощью фармацевтического подавления CYP26 параллельно с назначением ATRA.

В этих целях проводились испытания целого ряда соединений, блокирующих метаболизм РК (retinoic acid metabolism-blocking agents (RAMBAs)) [75, 76]. Однако это не привело к преодолению РК-резистентности, что объясняется рядом причин: разнообразием цитохромов, способных катаболизировать в той или иной степени различные изомеры РК (которые, как уже говорилось, могут переходить друг в друга), а также наличием большого количества петель обратной связи, регулирующих экспрессию ретиноид-реактивных генов (к которым относятся и цитохромы CYP26). Примером такой связи является упомянутое выше возрастание уровня CYP26A1 в ответ на высокие дозы РК при подавлении CRABP1 [63].

Проведенный в данной работе анализ экспрессии CYP26A1 и CYP26B1 не выявил корреляции между уровнями мРНК данных генов в стандартных условиях культивации и чувствительностью клеток к РК. При этом экспрессия CYP26B1 была выше, чем экспрессия

CYP26A1, практически во всех линиях. При добавлении АТРА она возрастала, причем уровень этой индукции, особенно *CYP26A1*, был достоверно выше в РК-чувствительных клеточных линиях. То, что *CYP26B1* продемонстрировал активацию экспрессии в меньшей степени, чем *CYP26A1*, связано, по-видимому, с более высоким базальным уровнем мРНК *CYP26B1*. Неожиданным результатом было то, что РК-чувствительные клетки продемонстрировали больший уровень индукции *CYP26*. Ожидалось, что в резистентных клетках катаболизм РК будет, наоборот, выше, что означало бы, что способность деградировать РК является фактором, способствующим развитию РК-резистентности. Полученные же результаты указывают на то, что РК-резистентные клетки, скорее, утрачивают или снижают способность катаболизировать РК. Однако они согласуются с данными довольно давно опубликованной работы B.J.M. Van Der Leede и соавт., которая была выполнена также на клетках РМЖ и показала, что индукция метаболизма РК происходит именно в РК-чувствительных клетках [77].

Согласно нашей гипотезе по мере приобретения РК-резистентного фенотипа утрачивается внутриклеточный баланс РК. Мы предполагаем, что в РК-чувствительных клетках происходит достаточно активный синтез РК из предшественников благодаря активности ферментов метаболизма ретинола и ретиналя. Это более нормальное состояние клеток, при котором факторы синтеза и катаболизма РК сбалансированы — клетки синтезируют ее, проводят РК-зависимую сигнализа-

цию и, в то же время, способны быстро удалить РК в случае ее избытка с помощью активации экспрессии *CYP26*. Резистентные к РК клетки ограничивают проведение ретинового сигналинга с помощью подавления рецепторов RAR и других механизмов, к которым, вероятно, относится и нарушение синтеза РК. Такие клетки «не ожидают» присутствия высокой концентрации РК, и, даже если ее концентрация искусственно повышается, она им «неопасна», т. е. не приводит к снижению пролиферации, как это происходит в случае РК-чувствительных клеток. Поэтому РК-резистентные клетки снижают эффективность системы катаболизма РК, что выражается в уменьшении индукции экспрессии *CYP26* в ответ на искусственное увеличение концентрации РК. Проверка данной гипотезы требует дальнейших исследований, которые будут способствовать пониманию механизмов формирования РК-резистентности и повышению эффективности терапии злокачественных солидных опухолей на основе натуральных и синтетических ретиноидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, экспрессия ядерного рецептора ретиновой кислоты, *RARα*, а также уровень активации экспрессии цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1* в ответ на обработку АТРА коррелируют с чувствительностью к РК клеток РМЖ. Полученные данные способствуют лучшему пониманию внутриклеточных механизмов формирования резистентности клеток РМЖ к терапии на основе ретиноидов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rhinn M., Dolle P. Retinoic acid signalling during development. *Development* 2012;139(5):843–58. DOI: 10.1242/dev.065938.
2. Theodosiou M., Laudet V., Schubert M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol Life Sci* 2010;67(9):1423–45. DOI: 10.1007/s00018-010-0268-z.
3. Connolly R.M., Nguyen N.K., Sukumar S. Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment. *Clin Cancer Res* 2013;19(7):1651–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3175.
4. Zhang H., Rosdahl I. Expression profiles of p53, p21, bax and bcl-2 proteins in all-trans-retinoic acid treated primary and metastatic melanoma cells. *Int J Oncol* 2004;25(2):303–8.
5. Mrass P., Rendl M., Mildner M. et al. Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis: a possible explanation for tumor preventive action of retinoids. *Cancer Res* 2004;64(18):6542–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1129.
6. Lüscher B., Mitchell P.J., Williams T., Tjian R. Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. *Genes Dev* 1989;3(10):1507–17. DOI: 10.1101/gad.3.10.1507.
7. Donato L.J., Suh J.H., Noy N. Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: The cell cycle control gene Btg2 is a direct target for retinoic acid receptor signaling. *Cancer Res* 2007;67(2):609–15. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0989.
8. Donato L.J., Noy N. Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: Proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. *Cancer Res* 2005;65(18):8193–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1177.
9. Pratt M.A.C., Niu M., White D. Differential regulation of protein expression, growth and apoptosis by natural and synthetic retinoids. *J Cell Biochem* 2003;90(4):692–708. DOI: 10.1002/jcb.10682.
10. Raffo P., Emionite L., Colucci L. et al. Retinoid receptors: pathways of proliferation inhibition and apoptosis induction in breast cancer cell lines. *Anticancer Res* 2000;20(3A):1535–43.
11. Afonja O., Raaka B.M., Huang A. et al. RAR agonists stimulate *SOX9* gene expression in breast cancer cell lines: Evidence for a role in retinoid-mediated growth inhibition. *Oncogene* 2002;21(51):7850–60. DOI: 10.1038/sj.onc.1205985.
12. Afonja O., Juste D., Das S. et al. Induction of PDCD4 tumor suppressor gene expression by RAR agonists, antiestrogen and HER-2/neu antagonist in breast cancer cells. Evidence for a role in apoptosis. *Oncogene* 2004;23(49):8135–45. DOI: 10.1038/sj.onc.1207983.
13. Bushue N., Wan Y.-J.Y. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv*

- Rev 2010;62(13):1285–98.
DOI: 10.1016/j.addr.2010.07.003.
14. O'Byrne S.M., Blaner W.S. Retinol and retinyl esters: Biochemistry and physiology. *J Lipid Res* 2013;54(7):1731–43.
DOI: 10.1194/jlr.R037648.
15. Thatcher J.E., Buttrick B., Shaffer S.A. et al. Substrate specificity and ligand interactions of CYP26A1, the human liver retinoic acid hydroxylase. *Mol Pharmacol* 2011;80(2):228–39.
DOI: 10.1124/mol.111.072413.
16. Stevison F., Jing J., Tripathy S., Isoherranen N. Role of retinoic acid-metabolizing cytochrome P450s, CYP26, in inflammation and cancer. *Adv Pharmacol* 2015;74:373–412.
DOI: 10.1016/bs.apha.2015.04.006.
17. Tchekina E.M. Retinoic acid binding proteins and cancer: similarity or polarity? *Cancer Ther Oncol Int J* 2017;8(2). Available at: <https://juniperpublishers.com/ctoij/pdf/CTOIJ.MS.ID.555733.pdf>.
18. Soprano D.R., Qin P., Soprano K.J. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* 2004;24(1):201–21.
DOI: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132407.
19. Ross-Innes C.S., Stark R., Holmes K.A. Cooperative interaction between retinoic acid receptor- α and estrogen receptor in breast cancer. *Genes Devel* 2010;24(2):171–82. DOI: 10.1101/gad.552910.
20. Garattini E., Bolis M., Garattini S.K. et al. Retinoids and breast cancer: from basic studies to the clinic and back again. *Cancer Treat Rev* 2014;40(6):739–49.
DOI: 10.1016/j.ctrv.2014.01.001.
21. Breitman T.R., Selonick S.E., Collins S.J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Nat Acad Sci USA* 1980;77(5):2936–40.
DOI: 10.1073/pnas.77.5.2936.
22. Spinella M.J., Kerley J.S., White K.A., Curtin J.C. Retinoid target gene activation during induced tumor cell differentiation: human embryonal carcinoma as a model. *J Nutr* 2003;133(1):273S–6S.
DOI: 10.1093/jn/133.1.273S.
23. Huang Y., Boskovic G., Niles R.M. Retinoic acid-induced AP-1 transcriptional activity regulates B16 mouse melanoma growth inhibition and differentiation. *J Cell Physiol* 2003;194(2):162–70.
24. Gudas L.J., Wagner J.A. Retinoids regulate stem cell differentiation. *J Cell Physiol* 2011;226(2):322–30.
DOI: 10.1002/jcp.22417.
25. Singh B., Murphy R.F., Ding X.-Z. et al. On the role of transforming growth factor- β in the growth inhibitory effects of retinoic acid in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer* 2007;6:82.
DOI: 10.1186/1476-4598-6-82.
26. Wu S., Donigan A., Platsoucas C.D. et al. All-trans-retinoic acid blocks cell cycle progression of human ovarian adenocarcinoma cells at late G1. *Exp Cell Res* 1997;232(2):277–86.
DOI: 10.1006/excr.1997.3495.
27. Pfahl M., Piedrafita F.J. Retinoid targets for apoptosis induction. *Oncogene* 2003;22(56):9058–62.
28. Sadikoglou E., Magoulas G., Theodoropoulou C. et al. Effect of conjugates of all-trans-retinoic acid and shorter polyene chain analogues with amino acids on prostate cancer cell growth. *Eur J Med Chem* 2009;44(8):3175–87.
DOI: 10.1016/j.ejmech.2009.03.029.
29. Lee J.H., Yoon J.H., Yu S.J. et al. Retinoic acid and its binding protein modulate apoptotic signals in hypoxic hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 2010;295(2):229–35.
30. Kini A.R., Peterson L.A., Tallman M.S., Lingen M.W. Angiogenesis in acute promyelocytic leukemia: induction by vascular endothelial growth factor and inhibition by all-trans retinoic acid. *Blood* 2001;97(12):3919–24.
DOI: 10.1182/blood.v97.12.3919.
31. Kim M.S., Kim Y.K., Eun H.C. et al. All-trans retinoic acid antagonizes UV-induced VEGF production and angiogenesis via the inhibition of ERK activation in human skin keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2006;126(12):2697–706.
DOI: 10.1038/sj.jid.5700463.
32. Degos L. All-trans-retinoic acid treatment and retinoic acid receptor α gene rearrangement in acute promyelocytic leukemia: a model for differentiation therapy. *Int J Cell Cloning* 1992;10(2):63–9.
DOI: 10.1002/stem.5530100202.
33. Dvorak C.C., Sanders R.P., Dahl G.V.H. et al. Reinduction of relapsed acute promyelocytic leukemia with ATRA and low dose antimetabolite-based chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48(5):582–5. DOI: 10.1002/pbc.20592.
34. Ahmad Tali M., Bashir Y., Bhat S. et al. Pseudotumour cerebri in acute promyelocytic leukemia on treatment with all-trans-retinoic acid (ATRA) – an experience from a tertiary care centre. *Malays J Pathol* 2015;37(2):141–4.
35. Degos L., Wang Z.Y. All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 2001;20(49):7140–5.
DOI: 10.1038/sj.onc.1204763.
36. Fenaux P., Wang Z.Z., Degos L. Treatment of acute promyelocytic leukemia by retinoids. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007;313:101–28.
DOI: 10.1007/978-3-540-34594-7_7.
37. Duvic M., Hymes K., Heald P. et al. Bexarotene is effective and safe for treatment of refractory advanced-stage cutaneous t-cell lymphoma: multinational phase II–III trial results. *J Clin Oncol* 2001;19(9):2456–71.
DOI: 10.1200/JCO.2001.19.9.2456.
38. Caselli E., Galvan M., Santoni F. et al. Retinoic acid analogues inhibit human herpesvirus 8 replication. *Antivir Ther* 2008;13:199–209.
39. Khuri F.R., Lippman S.M., Spitz M.R. et al. Molecular epidemiology and retinoid chemoprevention of head and neck cancer. *J Nat Cancer Ins* 1997;89(3):199–211.
DOI: 10.1093/jnci/89.3.199.
40. Zuccari G., Carosio R., Fini A. et al. Modified polyvinylalcohol for encapsulation of all-trans-retinoic acid in polymeric micelles. *J Control Release* 2005;103(2):369–80. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.12.016.
41. Garattini E., Gianni M., Terao M. Retinoids as differentiating agents in oncology: a network of interactions with intracellular pathways as the basis for rational therapeutic combinations. *Curr Pharmacol Design* 2007;13(13):1375–400.
DOI: 10.2174/138161207780618786.
42. Lippman S.M., Meyskens F.L.J. Treatment of advanced squamous cell carcinoma of the skin with isotretinoin. *Ann Int Med* 1987;107(4):499–502.
DOI: 10.7326/0003-4819-107-4-499.
43. Altucci L., Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1(3):81–93.
DOI: 10.1038/35106036.
44. Chlapek P., Slavikova V., Mazanek P. et al. Why differentiation therapy sometimes fails: Molecular mechanisms of resistance to retinoids. *Int J Mol Sci* 2018;19(1):132.
DOI: 10.3390/ijms19010132.
45. Ohnuma-Ishikawa K., Morio T. et al. Knockdown of XAB2 enhances all-trans retinoic acid-induced cellular differentiation in all-trans retinoic acid-sensitive and -resistant cancer cells. *Cancer Res* 2007;67(3):1019–29.
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1638.
46. Huang S., Laoukili J., Epping M.T. et al. ZNF423 Is Critically required for retinoic acid-induced differentiation and is a marker of neuroblastoma outcome. *Cancer Cell* 2009;15(4):328–40.
DOI: 10.1016/j.ccr.2009.02.023.
47. Cheung B.B., Tan O., Koach J. et al. Thymosin- β 4 is a determinant of drug sensitivity for Fenretinide and Vorinostat combination therapy in neuroblastoma. *Mol Oncol* 2015;9(7):1484–500.
DOI: 10.1016/j.molonc.2015.04.005.
48. Masiá S., Barettoni D., de Lera A.R., Alvarez S. Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol* 2007;1(10):2391–402.
DOI: 10.1210/me.2007-0062.
49. Alsayed Y., Uddin S., Mahmud N. et al. Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(6):4012–9.
DOI: 10.1074/jbc.M007431200.

50. García-Regalado A., Vargas M., García-Carrancá A. et al. Mol Cancer 2013;12:44. DOI: 10.1186/1476-4598-12-44.
51. Quintero Barceinas R.S., García-Regalado A., Aréchaga-Ocampo E. et al. All-trans retinoic acid induces proliferation, survival, and migration in A549 lung Cancer cells by activating the ERK signaling pathway through a transcription-independent mechanism. BioMed Res Int 2015;2015:404368. DOI: 10.1155/2015/404368.
52. Еникеев А.Д., Комельков А.В., Зборовская И.Б. и др. Неканоническая активность ретиноевой кислоты в отношении активации протеинкиназ в трансформированных клетках различного происхождения. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):127–30. [Enikeev A.D., Komelkov A.V., Zborovskaya I.B. et al. Non-canonical activity of retinoic acid in relation to the activation of protein kinases in transformed cells of different origin. Advances in Molecular Oncology 2018;5(4):127–130. (In Russ.) DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-127–30. (In Russ.)].
53. Piskunov A., Rochette-Egly C. A retinoic acid receptor RAR α pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein α Q to activate p38MAPK. Oncogene 2012;31:3333–45.
54. Enikeev A.D., Komelkov A.V., Axelrod M.E. et al. CRABP1 and CRABP2 protein levels do not correlate with the sensitivity of breast cancer cells to retinoic acid, but correlate with each other with CRABP2 being an upstream regulator of CRABP1 production. Biochemistry 2021;2(86):259–73. DOI: 10.1134/S0006297921020103.
55. Centritto F., Paroni G., Bolis M. et al. Cellular and molecular determinants of all-trans retinoic acid sensitivity in breast cancer: Luminal phenotype and RAR α expression. EMBO molecular medicine 2015;7(7):950–72. DOI: 10.15252/emmm.201404670.
56. Moise A.R., Noy N., Palczewski K., Blaner W.S. Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. Biochemistry 2007;46(15):4449–58. DOI: 10.1021/bi7003069.
57. Januchowski R., Wójtcowicz K., Zabel M. The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance. Biomed Pharmacother 2013;67(7):669–80. DOI: 10.1016/j.biopha.2013.04.005.
58. Boylan J.F., Gudas L.J. The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. J Biol Chem 1992;267(30):21486–91.
59. Fiorella P.D., Napoli J.L. Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*. Characterization and evidence that holo-CRABP is a substrate in retinoic acid metabolism. J Biol Chem 1991;266(25):16572–9.
60. Noy N. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. Biochem J 2000;348(Pt 3):481–95.
61. Napoli J.L. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. Biochim Biophys Acta 1999;1440(2–3):139–62. DOI: 10.1016/S1388-1981(99)00117-1.
62. Napoli J., Posch K., Fiorella P., Boerman M. Physiological occurrence, biosynthesis and metabolism of retinoic acid: evidence for roles of Cellular Retinoid-Binding Protein (CRBP) and Cellular Retinoic Acid-Binding Protein (CRABP) in the pathway of retinoic acid homeostasis. Biomed Pharmacother 1991;45(4–5):131–43. DOI: 10.1016/0753-3322(91)90101-x.
63. Liu R.Z., Garcia E., Glubrecht D.D. et al. CRABP1 is associated with a poor prognosis in breast cancer: Adding to the complexity of breast cancer cell response to retinoic acid. Mol Cancer 2015;14(1):129. DOI: 10.1186/s12943-015-0380-7.
64. Tang X.-H., Vivero M., Gudas L.J. Overexpression of CRABP1 in suprabasal keratinocytes enhances the proliferation of epidermal basal keratinocytes in mouse skin topically treated with all-trans retinoic acid. Exp Cell Res 2008;314(1):38–51. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.07.016.
65. Budhu A.S., Noy N. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. Mol Cell Biol 2002;22(8):2632–41. DOI: 10.1128/MCB.22.8.2632-2641.2002.
66. Schug T.T., Berry D.C., Shaw N.S. et al. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. Cell 2007;129(4):723–73. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.050.
67. Widschwendter M., Berger J., Daxenbichler G. et al. Loss of retinoic acid receptor β expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. Cancer Res 1997;57(19):4158–61.
68. Mehrotra J., Vali M., McVeigh M. et al. Very high frequency of hypermethylated genes in breast cancer metastasis to the bone, brain, and lung. Clin Cancer Res 2004;10(9):3104–9. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-03-0118.
69. Sirchia S.M., Ferguson A.T., Sironi E. et al. Evidence of epigenetic changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor beta2 promoter in breast cancer cells. Oncogene 2000;19(12):1556–63. DOI: 10.1038/sj.onc.1203456.
70. Sirchia S.M., Ren M., Pili R. et al. Endogenous reactivation of the RARbeta2 tumor suppressor gene epigenetically silenced in breast cancer. Cancer Res 2002;62:2455–61.
71. Paroni G., Fratelli M., Gardini G. et al. Synergistic antitumor activity of lapatinib and retinoids on a novel subtype of breast cancer with coamplification of ERBB2 and RARA. Oncogene 2012;31(29):3431–43. DOI: 10.1038/onc.2011.506.
72. Paroni G., Zanetti A., Barzago M.M. et al. Retinoic acid sensitivity of triple-negative breast cancer cells characterized by constitutive activation of the notch1 pathway: the role of rar β . Cancers 2020;12(10):1–23. DOI: 10.3390/cancers12103027.
73. Xu X.C., Liu X., Tahara E. et al. Expression and up-regulation of retinoic acid receptor- β is associated with retinoid sensitivity and colony formation in esophageal cancer cell lines. Cancer Res 1999;59(10):2477–83.
74. Nagai J.I., Yazawa T., Okudela K. et al. Retinoic acid induces neuroblastoma cell death by inhibiting proteasomal degradation of retinoic acid receptor α . Cancer Res 2004;64(21):7910–7. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1178.
75. Nelson C., Buttrick B., Isoherranen N. Therapeutic potential of the inhibition of the retinoic acid hydroxylases CYP26A1 and CYP26B1 by xenobiotics. Curr Top Med Chem 2013;13(12):1402–8. DOI: 10.2174/1568026611313120004.
76. Diaz P., Huang W., Keyari C.M., Buttrick B. et al. Development and characterization of novel and selective inhibitors of cytochrome P450 CYP26A1, the human liver retinoic acid hydroxylase. J Med Chem 2016;59(6):2579–95. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01780.
77. Van Der Leede B.J.M., Van Den Brink C.E., Pijnappel W.W.M. et al. Autoinduction of retinoic acid metabolism to polar derivatives with decreased biological activity in retinoic acid-sensitive, but not in retinoic acid-resistant human breast cancer cells. J Biol Chem 1997;272(29):17921–8. DOI: 10.1074/jbc.272.29.17921.

Вклад авторов

А.Д. Еникеев: анализ чувствительности опухолевых клеток к ретиноевой кислоте, анализ экспрессии мРНК CYP26A1, CYP26B1, RAR ;
А.В. Комельков: статистический анализ данных;
Н.В. Елкина: подбор специфических праймеров и оптимизация условий полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени;
М.Е. Аксельрод: работа с культурами клеток;
С.А. Кузьмичев: выделение РНК, анализ литературы по теме статьи;
Е.М. Чевкина: разработка дизайна исследования, анализ результатов, написание текста статьи.

Authors' contribution

A.D. Enikeev: analysis of cells' sensitivity to retinoic acid, analysis of mRNA expression of CYP26A1, CYP26B1, RAR ;
A.V. Komelkov: statistical data analysis;
N.V. Elkina: selection of specific primers and optimization of conditions of real time RT-PCR;
M.E. Axelrod: working with cell cultures;
S.A. Kuzmichev: RNA isolation, literature analysis on the topic of the article;
E.M. Tchevkina: study design, analysis of results, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.Д. Еникеев / A.D. Enikeev: <https://orcid.org/0000-0002-7628-8616>
Н.В. Елкина / N.V. Elkina: <https://orcid.org/0000-0002-0503>
А.В. Комельков / A.V. Komelkov: <https://orcid.org/0000-0003-0766-163X>
М.Е. Аксельрод / M.E. Axelrod: <https://orcid.org/0000-0003-2778-7870>
С.А. Кузьмичев / S.A. Kuzmichev: <https://orcid.org/0000-0003-1660-0898>
Е.М. Чевкина / E.M. Tchevkina: <https://orcid.org/0000-0001-8837-7969>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-015-00027А).
Financing. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No. 19-015-00027A).

Статья поступила: 09.12.2021. **Принята к публикации:** 12.02.2022.

Article submitted: 09.12.2021. **Accepted for publication:** 12.02.2022.

Иммунологические маркеры прогноза ответа на иммунотерапию при немелкоклеточном раке легкого

А.А. Мусаелян^{1,2}, С.В. Лапин¹, М.А. Уртеннова¹, С.В. Одинцова¹, И.В. Чистяков¹, А.М. Улитин¹, Н.Т. Исманбаев¹, А.Л. Акопов¹, С.В. Орлов^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»; Россия, 354376 Краснодарский край, Сочи, Адлерский р-н, с. Веселое, ул. Мира, 177

Контакты: Арам Ашотович Мусаелян a.musaelyan8@gmail.com

Введение. Терапия ингибиторами контрольных точек иммунного ответа стала стандартом лечения пациентов с распространенным немелкоклеточным раком легкого. Однако, несмотря на выявление в клинической практике экспрессии лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1, определяющей эффективность терапии, до 80 % пациентов с данной патологией не отвечают на лечение.

Цель исследования – оценить прогностическую роль клинических и иммунологических маркеров при использовании ингибиторов контрольных точек иммунного ответа в монорежиме в ≥ 2 линиях распространенного немелкоклеточного рака легкого.

Материалы и методы. В исследование включены 45 пациентов с распространенным немелкоклеточным раком легкого, получавшие ингибиторы контрольных точек иммунного ответа (1-я группа), а также 30 пациентов с данной патологией, которым проводили в 1-й линии химиотерапию (2-я группа). У всех больных до начала лечения не было аутоиммунных заболеваний. Определение аутоантител, β -2-микроглобулина, неоптерина, интерлейкина 6, интерлейкина 18 и HLA-DRB1 в 1-й группе проводилось через 2 мес после начала терапии, а во 2-й – перед началом очередного цикла химиотерапии.

Результаты. В 1-й группе наличие мутаций *EGFR/ALK* является независимым предиктором низких показателей выживаемости без прогрессирования ($p = 0,018$). В ходе однофакторного анализа было выявлено, что нейтрофильно-лимфоцитарное отношение до начала применения ингибиторов контрольных точек иммунного ответа < 5 ($p = 0,009$) и появление иммуноопосредованных нежелательных явлений ($p = 0,038$) связаны с высокими показателями выживаемости без прогрессирования. В 1-й группе уровень β -2-микроглобулина был ниже при длительности ответа ≥ 6 мес, чем при прогрессировании < 6 мес: 1,7 и 2,9 мг/л соответственно ($p < 0,0001$). У пациентов, получавших ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, с уровнем β -2-микроглобулина $\geq 2,5$ мг/л наблюдаются более низкие показатели выживаемости без прогрессирования, чем у пациентов со значением этого маркера $< 2,5$ мг/л: 168 дней и значение не достигнуто соответственно ($p = 0,017$). При длительности ответа ≥ 6 мес значение неоптерина оказалось ниже, чем при прогрессировании заболевания: 8,6 и 13,4 нмоль/л соответственно ($p < 0,0001$). Показатели выживаемости без прогрессирования были хуже у больных с уровнем неоптерина ≥ 12 нмоль/л, чем у больных с уровнем этого маркера < 12 нмоль/л (медиана 164 дня и значение не достигнуто соответственно; $p = 0,0007$). По результатам многофакторного анализа β -2-микроглобулин $\geq 2,5$ мг/л ($p = 0,006$) и неоптерин ≥ 12 нмоль/л ($p = 0,027$) оказались независимыми предикторами более короткой выживаемости без прогрессирования. Низкие уровни интерлейкина 6 и интерлейкина 18, а также антитела к тиреоидной пероксидазе связаны с ответом ≥ 6 мес. Ген *HLA-DRB1*03* ассоциирован с ответом ≥ 6 мес, а также с более высокими показателями выживаемости без прогрессирования по сравнению с другими аллельными вариантами. Уровни β -2-микроглобулина, неоптерина, интерлейкина 6 и интерлейкина 18 в 1-й группе по сравнению со 2-й группой оказались выше ($p < 0,0001$).

Заключение. Иммунологические маркеры могут служить перспективными прогностическими факторами у пациентов с распространенным немелкоклеточным раком легкого при применении ингибиторов контрольных точек иммунного ответа.

Ключевые слова: предиктивные маркеры, иммуноопосредованные нежелательные явления, немелкоклеточный рак легкого, иммунотерапия

Для цитирования: Мусаелян А.А., Лапин С.В., Уртеннова М.А. и др. Иммунологические маркеры прогноза ответа на иммунотерапию при немелкоклеточном раке легкого. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2):79–88. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-79-88.

Immunological markers for predicting the response to immunotherapy in non-small cell lung cancer

A.A. Musaelyan^{1,2}, S.V. Lapin¹, M.A. Urtenova¹, S.V. Odintsova¹, I.V. Chistyakov¹, A.M. Ulitin¹, N.T. Ismanbaev¹, A.L. Akopov¹, S.V. Orlov^{1,2}

¹I.P. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University; L'va Tolstogo St., 6–8, Saint Petersburg 197022, Russia;

²Research Institute of Medical Primatology; 177 Mira St., Veseloe village, Sochi, Adler District, Krasnodar Territory 354376, Russia

Contacts: Aram Ashotovich Musaelyan a. musaelyan8@gmail.com

Introduction. Immune checkpoint inhibitors have become the standard of care for patients with advanced non-small cell lung cancer. However, despite the determination of programmed death-ligand 1 expression in clinical practice, which determines the effectiveness of therapy, up to 80 % of patients with non-small cell lung cancer do not respond to treatment.

The study objective – investigation of the prognostic role of clinical and immunological markers during immune checkpoint inhibitor monotherapy in ≥ 2 lines in patients with advanced non-small cell lung cancer.

Materials and methods. The study included 45 patients with advanced non-small cell lung cancer receiving programmed cell death 1 / programmed death-ligand 1 inhibitors in monotherapy in 2 and subsequent lines (Group 1), as well as 30 patients with advanced non-small cell lung cancer receiving first-line chemotherapy (Group 2). All patients from 2 groups did not have autoimmune diseases before starting treatment. The determination of autoantibodies, β -2-microglobulin, neopterin, interleukin 6, interleukin 18 and the allelic variant of HLA-DRB1 in patients in the Group 1 was carried out 2 months after the start of therapy, and in the Group 2 – before the start of the next chemotherapy cycle.

Results. In Group 1, the presence of EGFR/ALK mutations is an independent predictor of shorter progression-free survival ($p = 0.018$). Also, in the univariate analysis, neutrophil-lymphocyte ratio < 5 before immune checkpoint inhibitors ($p = 0.009$) and the appearance of immune-related adverse events ($p = 0.038$) are associated with long-term progression-free survival. In Group 1, β -2-microglobulin was lower in patients with a response duration of ≥ 6 months than with a progression < 6 months: 1.7 mg/L and 2.9 mg/L, respectively ($p < 0.0001$). Patients receiving immune checkpoint inhibitors with a β -2-microglobulin level ≥ 2.5 mg/L have a shorter progression-free survival than patients with a marker value < 2.5 mg/L: 168 days and the value is not reached, respectively ($p = 0.017$). In response duration ≥ 6 months neopterin value was lower than in disease progression: 8.6 nmol/L and 13.4 nmol/L, respectively ($p < 0.0001$). Progression-free survival was lower in patients with neopterin ≥ 12 nmol/L than patients with neopterin < 12 nmol/L: median was 164 days and the value was not reached, respectively ($p = 0.0007$). Based on the results of multivariate analysis, β -2-microglobulin ≥ 2.5 mg/L ($p = 0.006$) and neopterin ≥ 12 nmol/L ($p = 0.027$) were independent predictors of shorter progression-free survival. Low levels of interleukin 6 and interleukin 18, as well as antibodies to thyroperoxidase, are associated with a response of ≥ 6 months. HLA-DRB1*03 was associated with a duration of response of ≥ 6 months, as well as a longer progression-free survival compared with other allelic variants. The levels of β -2-microglobulin, neopterin, interleukin 6, interleukin 18 were higher in patients in Group 1 than in patients in Group 2 ($p < 0.0001$).

Conclusion. Immunological markers can serve as promising prognosis markers in patients with advanced non-small cell lung cancer during immunotherapy.

Key words: predictive markers, immune-related adverse events, non-small cell lung cancer, immunotherapy

For citation: Musaelyan A.A., Lapin S.V., Urtenova M.A. et al. Immunological markers for predicting the response to immunotherapy in non-small cell lung cancer. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2022; 9(2):79–88. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-79-88.

ВВЕДЕНИЕ

Иммунотерапия (ИТ) считается стандартом лечения пациентов с распространенным немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Использование анти-PD-1/PD-L1-антител (PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели; PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели) демонстрирует лучшие противоопухолевый ответ и показатели общей выживаемости (ОВ) по сравнению с классическими стратегиями системной терапии [1]. Однако лишь у 20–30 % пациентов с местно-распространенным и метастатическим НМРЛ наблюдается длительный клинический ответ на это лечение [2]. Таким образом, важной проблемой является отбор пациентов, у которых применение анти-PD-1/PD-L1 антител будет наиболее эффективным, что позволит избежать воз-

никновения нежелательных явлений (НЯ), а также лишних экономических затрат [3]. Однако в связи со сложным характером взаимодействия опухоли и иммунной системы при ИТ отсутствуют специфические предиктивные маркеры.

В настоящее время единственным одобренным маркером ответа на ИТ при распространенном НМРЛ является экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках [4]. Согласно результатам исследования KEYNOTE-024, у пациентов с метастатическим НМРЛ и высоким уровнем экспрессии PD-L1 (≥ 50 %) отмечается увеличение показателей выживаемости без прогрессирования (ВБП) и ОВ при использовании анти-PD-1-антител по сравнению со стандартной химиотерапией [5]. Однако применение PD-L1 в качестве предиктивного маркера остается противоречивым в связи с тем,

что больные с низкой и отрицательной его экспрессией также имеют продолжительный ответ на терапию [6]. Это обусловлено техническими особенностями теста (наличием различных детектируемых платформ и отсутствием стандарта при оценке экспрессии PD-L1), пространственной гетерогенностью опухоли и ее изменчивостью при проведении терапии [7]. Таким образом, необходим поиск новых потенциальных маркеров ответа при НМРЛ. Одним из путей решения этой проблемы является исследование суррогатных маркеров иммунного ответа как одного из ключевых биологических звеньев, определяющих эффективность ИТ.

Было показано, что воспалительные маркеры, такие как нейтрофильно-лимфоцитарное (НЛО) и тромбоцитарно-лимфоцитарное отношение (ТЛО), а также цитокины, в частности интерлейкин 6 (ИЛ-6), являются предикторами эффективности терапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа (ИКТИО) [5]. Мы предположили, что маркеры активации Т-клеточного иммунного ответа, например β -2-микроглобулин (β -2-МГ) и интерлейкин 18 (ИЛ-18), и макрофагов (неоптерин) могут быть использованы в качестве мониторинга ответа на применение ИКТИО. Поскольку в ряде исследований показано, что иммуноопосредованные НЯ служат предикторами ответа на терапию ИКТИО, мы определяли наличие аутоантител, которые являются ранним отражением аутоиммунных реакций, а также изучали наиболее известный ген в мозаике аутоиммунитета — *HLA-DRB1*.

Цель исследования — определение прогностического значения клинико-морфологических и иммунологических параметров при ИТ во 2-й и последующих линиях у пациентов с распространенным НМРЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ретроспективное исследование были включены 45 пациентов с местно-распространенным и метастатическим НМРЛ, получавших во 2-й и последующих линиях анти-PD-1 (пембролизумаб, ниволумаб) или анти-PD-L1-антитела (атезолизумаб), а ранее — платиносодержащую химиотерапию ($n = 40$) или таргетную терапию ингибиторами киназы анапластической лимфомы (anaplastic lymphoma kinase, ALK)/рецептора эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) ($n = 5$) (1-я группа). Эти больные были разделены на 2 подгруппы в зависимости от продолжительности ответа на терапию: ответ ≥ 6 мес (случаи с частотой объективных ответов и стабилизацией) ($n = 26$) и прогрессирование заболевания < 6 мес ($n = 19$).

В связи с тем, что до начала ИТ у многих пациентов не определяли большинство иммунологических маркеров, была выделена 2-я группа, в которой оценивали иммунологические параметры при проведении химиотерапии в качестве суррогатной нулевой точки для больных, получающих анти-PD-1/PD-L1-антитела

во 2-й и последующих линиях. Во 2-ю группу вошли 30 больных НМРЛ, получавших платиносодержащий дуплет. Клинико-эпидемиологическая характеристика этих пациентов представлена в табл. 1.

У всех пациентов, включенных в исследование, до начала системного лечения в анамнезе не было аутоиммунных заболеваний. Также до анти-PD-1/PD-L1-терапии у больных исследуемой группы уровень тиреотропного гормона соответствовал референтному значению. У всех пациентов 1-й группы были взяты образцы сыворотки крови для определения иммунологических маркеров через 2 мес от начала анти-PD-1/PD-L1 терапии. Забор крови осуществлялся до начала цикла, а также сразу после окончания введения препарата для изучения уровня цитокинов (рис. 1). С целью определения динамики изменения иммунологических параметров у 16 пациентов 1-й группы дополнительно были взяты образцы периферической крови до ИТ и через 6 мес от начала лечения. У больных 2-й группы забор биоматериала проводили перед очередным циклом химиотерапии.

Во всех группах были определены аутоантитела, ассоциированные с наличием иммуноопосредованных НЯ, развивающихся на фоне приема ИКТИО: антинуклеарный фактор (АНФ), антитела к цитоплазме нейтрофилов класса IgG (АНЦА), экстрагируемым ядерным антигенам, тиреопероксидазе (анти-ТПО), β -2-гликопротеину (анти- β -2-ГП), микросомам печени и почек, митохондриям (АМА), гладким мышцам (АГМА), модифицированному цитруллинированному виментину (анти-MCV), антикардиолипиновые антитела класса IgG и IgM (АКА). Также были исследованы такие воспалительные маркеры, как β -2-МГ, неоптерин, ИЛ-6 и ИЛ-18.

Определение иммунологических маркеров. Исследование иммунологических параметров осуществлялось с помощью иммуноферментного анализа с применением наборов реагентов фирм ORGENTEC Diagnostika GmbH (Германия) (для определения антител к экстрагируемым ядерным антигенам, АКА и анти-MCV); EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG (Германия) (для определения анти-ТПО, анти- β -2-ГП); IBL International GmbH (Германия) (для определения неоптерина); «Вектор-Бест» (Россия) (для определения ИЛ-6 и ИЛ-18). Антинуклеарный фактор, АНЦА, АМА и АГМА выявляли путем непрямой иммунофлюоресценции с использованием коммерческих тест-систем компании EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG (Германия). Концентрацию β -2-МГ измеряли с помощью иммунотурбидиметрического исследования с использованием набора Biosystems S.A. (Испания). С учетом того, что на значение этого маркера в крови влияет функция почек, у всех пациентов был определен уровень креатинина до ИТ и через 2 мес после нее.

С целью выявления групп аллелей гена *HLA-DRB1* у всех пациентов из лейкоцитов периферической

Таблица 1. Клинико-эпидемиологическая характеристика пациентов, включенных в исследование**Table 1.** Clinico-epidemiological data of patients included in the study

Показатель Parameter	1-я группа Group 1	2-я группа Group 2	p
Пол, абс. (%): Gender, abs. (%): мужской male женский female	30 (66,7) 15 (33,3)	21 (70,0) 9 (30,0)	0,806
Возраст: Age: медиана (интерквартильный размах), лет median (interquartile range), years <60, абс. (%) <60, abs. (%) >60, абс. (%) >60, abs. (%)	62 (59–69) 25 (55,6,0) 30 (44,4,0)	64 (59–70) 12 (40,0) 18 (60,0)	0,655
Гистологический тип, абс. (%): Histological type, abs. (%): плоскоклеточная карцинома squamous cell carcinoma аденокарцинома adenocarcinoma	27 (60,0) 18 (40,0)	18 (60,0) 12 (40,0)	1,0
Стадия заболевания, абс. (%): Stage of disease, abs. (%): местно-распространенный locally advanced метастатический metastatic	9 (20,0) 36 (80,0)	6 (20,0) 24 (80,0)	1,0
Прогрессирование заболевания <6 мес, абс. (%): Disease progression within 6 months, abs. (%): да yes нет no	19 (42,2) 26 (57,8)	17 (56,7) 13 (43,3)	0,220

Иммунотерапия, абс. (%): Immunotherapy, abs. (%): ниволумаб nivolumab пембролизумаб embrolizumab атезолизумаб atezolizumab	12 (26,7) 29 (64,4) 4 (8,9)	—	—
Линия системной терапии, абс. (%): Line of systemic therapy, abs. (%): 2-я 2 nd 3-я 3 rd	36 (80,0) 9 (20,0)	—	—
Терапия в 1-й линии, абс. (%): First-line therapy, abs. (%): химиотерапия chemotherapy ингибиторы ALK ALK inhibitors ингибиторы EGFR EGFR inhibitors	40 (88,9) 3 (6,7) 2 (4,4)	—	—
Мутационный статус, абс. (%): Mutational status, abs. (%): EGFR+ ALK+ EGFR/ALK— нет данных no data	2 (4,4) 3 (6,7) 21 (46,7) 19 (42,2)	—	—
Статус PD-L1 на опухолевых клетках, абс. (%): PD-L1 expression on tumor cells, abs. (%): <1 % 1–49 % >50 %	16 (35,6) 20 (44,4) 9 (20,0)	—	—

Примечание. ALK — киназа анапластической лимфомы; EGFR — рецептор эпидермального фактора роста; PD-L1 — лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1.
Note. ALK — anaplastic lymphoma kinase; EGFR — epidermal growth factor receptor; PD-L1 — programmed death ligand-1.

**Рис. 1.** Дизайн взятия образцов периферической крови у пациентов, получающих иммунотерапию. Стрелки указывают на временные точки взятия образцов для исследования**Fig. 1.** Design of peripheral blood sampling from patients receiving immunotherapy. The arrows indicate the time points of sampling for research

крови с помощью набора реагентов ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА («ДНК-Технология», Россия) в соответствии с инструкцией производителя была выделена геномная ДНК. Типирование 13 групп аллелей гена *HLA-DRB1* проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с применением набора HLA-ДНК-ТЕХ («ДНК-Технология», Россия). Также были получены данные о НЛО и ТЛО пациентов 1-й и 2-й групп до терапии и через 2 мес от ее начала, которые могут служить потенциальными предиктивными маркерами ответа на анти-PD-1/PD-L1-анти-тела.

Радиологическая оценка ответа на проводимую терапию (с использованием компьютерной томографии) осуществлялась согласно критериям Response evaluation criteria in solid tumors 1.1 (RECIST 1.1). В 1-й и 2-й группах первичными конечными точками при оценке ответа на терапию стали степень ответа и продолжительность лечения >6 мес. Вторичной конечной точкой было определение ВПБ. Медиана наблюдения составила 6,5 мес (интерквартильный размах — 4,8–9,5 мес).

Статистический анализ. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы GraphPad Prism (версия 9.3.0; GraphPad Software Inc., США). Точный тест Фишера использовали для сравнения качественных признаков, критерий Шапиро–Уилка — для оценки нормальности распределения количественных показателей для каждой исследуемой группы. Различия количественных признаков между 2 группами определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни. Для определения возможности прогнозирования раннего прогрессирования заболевания с помощью исследуемых маркеров, а также оптимальных пороговых значений иммунологических маркеров с целью последующего анализа ВБП применяли ROC-анализ. В 2 подгруппах пациентов с разными показателями иммунологических маркеров для выявления различий в показателях ВБП использовали логарифмический ранговый критерий. Влияние на ВБП клинико-морфологических данных и иммунологических маркеров оценивали с помощью одно- и многофакторного регрессионного анализа Кокса. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинико-морфологические параметры и ответ на иммунотерапию

В 1-й группе пациенты с длительностью ответа ≥ 6 мес и ранним прогрессированием заболевания (<6 мес) не различались по возрасту, полу, статусу по шкале Восточной кооперативной онкологической группы (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG), статусу курения, индексу массы тела, гистологическому типу опухоли, мутационному статусу и уровню экспрессии PD-L1 на опухолевых клетках ($p > 0,05$). Взаимосвязи

ответа на проводимую ИТ со значениями НЛО и ТЛО до лечения и через 2 мес от его начала выявлено не было ($p > 0,05$).

Однофакторный регрессионный анализ показал, что отсутствие мутаций в гене *EGFR* или транслокаций *ALK* (отношение рисков (ОР) 5,18; 95 % доверительный интервал (ДИ) 0,75–22,68; $p = 0,045$) и НЛО <5 (ОР 8,02; 95 % ДИ 1,21–32,24; $p = 0,009$) ассоциировано с высокими показателями ВБП (табл. 2). Согласно результатам многофакторного анализа, только наличие мутаций *EGFR/ALK* (ОР 8,13; 95 % ДИ 1,13–64,97; $p = 0,018$) было независимым предиктором более короткой ВБП.

В 1-й группе при применении ИКТИО в 37,8 % случаев развились иммуноопосредованные НЯ. При этом отмены терапии не потребовалось. Во всех случаях отмечалась токсичность I–II степени. У пациентов с НЯ наблюдались такие заболевания, как аутоиммунный тиреоидит ($n = 7$), экзантема ($n = 4$), гепатит ($n = 3$), пульмонит ($n = 2$), колит ($n = 1$). Появление иммуноопосредованных НЯ было взаимосвязано с продолжительностью ответа ≥ 6 мес: НЯ наблюдались в 53,9 % (14/26) случаев ответа ≥ 6 мес и в 15,8 % (3/19) случаев прогрессирования заболевания <6 мес ($p = 0,013$). Однофакторный регрессионный анализ показал, что появление иммуноопосредованных НЯ ассоциировано с более продолжительной ВБП (ОР 2,88; 95 % ДИ 1,10–8,45; $p = 0,038$). Однако в ходе многофакторного анализа этой взаимосвязи обнаружено не было ($p = 0,064$).

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ И ОТВЕТ НА ИММУНОТЕРАПИЮ

Бета-2-микроглобулин. Было показано, что уровни креатинина у пациентов до ИТ и через 2 мес после нее соответствовали референтным значениям. Это свидетельствует об отсутствии влияния снижения почечного клиренса на данный показатель. У пациентов с длительностью ответа на терапию ≥ 6 мес уровень β -2-МГ через 2 мес после лечения оказался значительно ниже, чем у пациентов с прогрессированием заболевания в течение 6 мес: медиана этого показателя составила 1,7 мг/л (95 % ДИ 1,6–2,3 мг/л) и 2,9 мг/л (95 % ДИ 2,5–3,3 мг/л) соответственно ($p < 0,0001$) (рис. 2). У 16 пациентов 1-й группы в 2 контрольных точках — через 2 и 6 мес от начала терапии — не наблюдалось различий в уровне β -2-МГ.

Площадь под ROC-кривой (area under curve, AUC) для данного маркера при прогнозировании раннего прогрессирования заболевания составила 0,842 (95 % ДИ 0,722–0,962; $p < 0,0001$). Его оптимальное пороговое значение — 2,5 мг/мл. У пациентов с уровнем β -2-МГ $\geq 2,5$ мг/мл показатели ВБП оказались статистически значимо ниже, чем у пациентов с уровнем этого маркера $<2,5$ мг/мл: медиана составила 168 дней и значение не достигнуто соответственно (ОР 2,8; 95 % ДИ 1,2–6,9; $p = 0,017$) (рис. 3). Также в ходе

Таблица 2. Результаты однофакторного и многофакторного регрессионного анализа клинико-морфологических и иммунологических параметров, связанных с выживаемостью без прогрессирования

Table 2. Results of univariate and multivariate regression analysis of clinical, morphological and immunological parameters associated with progression-free survival

Показатель Parameter	Однофакторный анализ Univariate analysis		Многофакторный анализ Multivariate analysis	
	ОР (95 % ДИ) HR (95 % CI)	<i>p</i>	ОР (95 % ДИ) HR (95 % CI)	<i>p</i>
Возраст (≥ 75 vs < 75 лет) Age (≥ 75 vs < 75 years)	1,41 (0,49–3,20)	0,332	—	—
Пол (мужской vs женский) Gender (male vs female)	1,03 (0,36–2,65)	0,914	—	—
Статус по шкале ECOG (0/1 vs 2/3) ECOG status (0/1 vs 2/3)	1,11 (0,56–2,49)	0,834	—	—
Статус курения (курившие/курящие vs. некурящие) Smoking status (former/current vs never)	1,53 (0,43–4,25)	0,452	—	—
Индекс массы тела (≥ 25 vs < 25 kg/m ²) Body mass index (≥ 25 vs < 25 kg/m ²)	0,85 (0,60–1,45)	0,623	—	—
Гистологический тип (неплоскоклеточный рак vs плоскоклеточный рак) Histological type (non-squamous cell carcinoma vs. squamous cell carcinoma)	0,45 (0,16–1,17)	0,110	—	—
Отсутствие мутаций <i>EGFR/ALK</i> vs наличие мутаций <i>EGFR/ALK</i> None <i>EGFR/ALK</i> mutation vs presence <i>EGFR/ALK</i> mutation	5,18 (0,75–22,68)	0,045	8,13 (1,13–64,97)	0,018
Уровень экспрессии PD-L1 (< 50 vs ≥ 50) PD-L1 expression level (< 50 vs ≥ 50)	0,28 (0,04–0,99)	0,091	—	—
Иммуноопосредованные нежелательные явления (наличие vs отсутствие) Immune-related adverse events (presence vs none)	2,88 (1,10–8,45)	0,038	3,46 (1,01–14,78)	0,064
Нейтрофильно-лимфоцитарное отношение до начала терапии (< 5 vs ≥ 5) Neutrophil-lymphocytic ratio before initiation of therapy (< 5 vs ≥ 5)	8,02 (1,21–32,24)	0,009	8,36 (0,78–91,11)	0,068
Уровень β -2-микроглобулина ($\geq 2,5$ vs $< 2,5$) β -2-microglobulin level ($\geq 2,5$ vs $< 2,5$)	0,27 (0,09–0,69)	0,009	0,13 (0,03–0,40)	0,006
Уровень неоптерина (≥ 12 vs < 12) Neopterin level (≥ 12 vs < 12)	0,23 (0,07–0,64)	0,007	0,35 (0,13–0,87)	0,027
Уровень интерлейкина 6 (≥ 6 vs < 6) Interleukin 6 level (≥ 6 vs < 6)	0,46 (0,18–1,16)	0,091	—	—
Уровень интерлейкина 18 (≥ 273 vs < 273) Interleukin 18 level (≥ 273 vs < 273)	0,23 (0,05–1,06)	0,056	—	—
Антитела к тиреопероксидазе (отсутствие vs наличие) Antibodies to thyroperoxidase (none vs presence)	0,31 (0,05–1,09)	0,118	—	—

Примечание. ОР — отношение рисков; ДИ — доверительный интервал; PD-L1 — лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1; ECOG — Восточная кооперативная онкологическая группа (Eastern Cooperative Oncology Group). Жирным начертанием выделены статистически значимые различия.

Note. HR — hazard ratio; CI — confidence interval; PD-L1 — programmed death ligand-1; ECOG — Eastern Cooperative Oncology Group. Statistically significant differences are highlighted in bold.

многофакторного регрессионного анализа была выявлена взаимосвязь уровня β -2-МГ $\geq 2,5$ мг/мл и низких показателей ВБП (ОР 0,13; 95 % ДИ 0,03–0,40; $p = 0,006$) (табл. 2).

Неоптерин. У пациентов, у которых длительность ответа составила ≥ 6 мес, медиана уровня неоптерина оказалась статистически значимо ниже, чем у пациентов с прогрессированием заболевания < 6 мес:

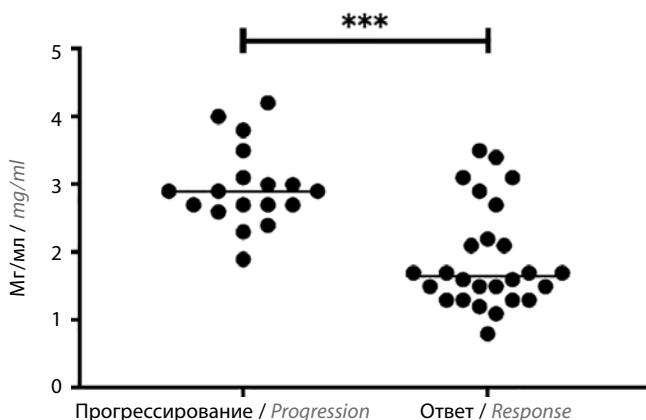
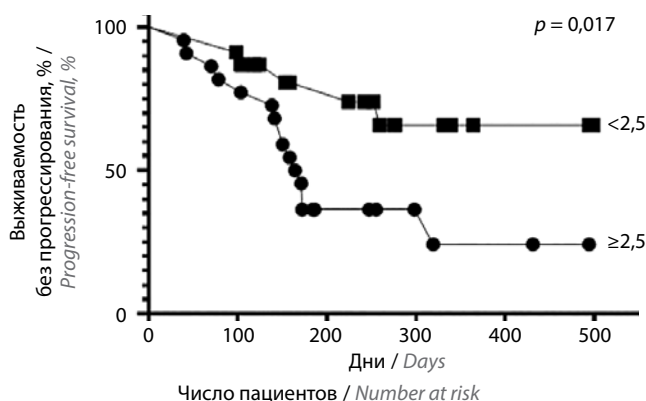


Рис. 2. Сопоставление медианы уровня β-2-микроглобулина у пациентов с прогрессированием заболевания в течение 6 мес и ответом на иммунотерапию ≥6 мес

Fig. 2. Comparison of the median level of β-2-microglobulin in patients with disease progression within 6 months and with a response to immunotherapy ≥6 months



Дни/Days

Рис. 3. Выживаемость без прогрессирования у пациентов с уровнем β-2-микроглобулина ≥2,5 мг/мл и <2,5 мг/мл

Fig. 3. Progression-free survival in patients with a level of β-2-microglobulin ≥2.5 mg/ml and a level <2.5 mg/ml. PFS – progression-free survival

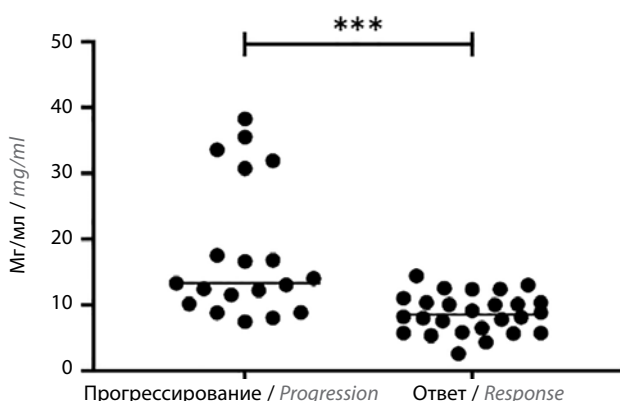


Рис. 4. Сопоставление медианы неоптерина у пациентов с прогрессированием заболевания в течение 6 мес и ответом на иммунотерапию в течение 6 мес

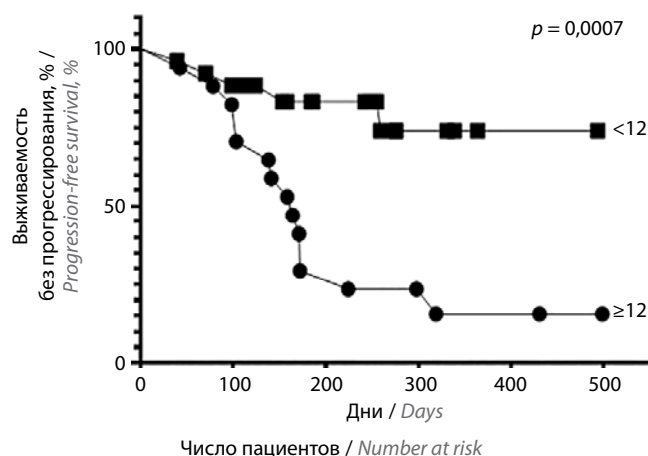
Fig. 4. Comparison of the median of neopterin in patients with disease progression and with a response to immunotherapy within 6 months

8,6 нмоль/л (95 % ДИ 7,6–10,0 нмоль/л) и 13,4 нмоль/л (95 % ДИ 13,0–23,0 нмоль/л) соответственно ($p < 0,0001$) (рис. 4). У 16 больных не было различий в уровне неоптерина через 2 и 6 мес от начала терапии.

Диагностическая ценность неоптерина при определении раннего прогрессирования заболевания была следующей: AUC составила 0,832 (95 % ДИ 0,711–0,953; $p < 0,0001$). Оптимальный уровень данного маркера равен 12 нмоль/л. У пациентов с уровнем неоптерина ≥12 нмоль/л показатели ВБП были статистически значимо ниже, чем у пациентов с уровнем этого маркера <12 нмоль/л (медиана составила 164 дня и значение не достигнуто соответственно) (ОР 4,8; 95 % ДИ 1,9–12,3; $p = 0,0007$) (рис. 5). Также в ходе многофакторного регрессионного анализа Кокса было выявлено, что значение неоптерина ≥12 нмоль/л ассоциировано с более низкими показателями ВБП (ОР 0,35; 95 % ДИ 0,13–0,87; $p = 0,027$) (табл. 2).

Цитокины. У пациентов 1-й группы, у которых отмечалось прогрессирование заболевания <6 мес, уровень ИЛ-6 через 2 мес после начала терапии оказался выше, чем у пациентов с ответом ≥6 мес: медиана составила 14 пг/мл (95 % ДИ 6,0–18,4 пг/мл) и 3,9 пг/мл (95 % ДИ 2,8–5,0 пг/мл) соответственно ($p < 0,0001$) (рис. 6). В свою очередь, у больных с прогрессированием заболевания <6 мес по сравнению с больными с ответом ≥6 мес отмечалась более высокая медиана уровня ИЛ-18: 327,4 пг/мл (95 % ДИ 300,5–405,5 пг/мл) и 233,3 пг/мл (95 % ДИ 198,9–271,8 пг/мл) соответственно ($p = 0,0003$).

Для прогнозирования ранней прогрессии заболевания AUC для ИЛ-6 и ИЛ-18 составила 0,849 (95 % ДИ 0,719–0,978; $p < 0,0001$) и 0,808 (95 % ДИ 0,668–0,948; $p = 0,0005$) соответственно. Оптимальные пороговые значения этих маркеров составили 6 и 273 пг/мл



Дни/Days

Рис. 5. Выживаемость без прогрессирования у пациентов с уровнями неоптерина ≥12 нмоль/л и <12 нмоль/л

Fig. 5. Progression-free survival in patients with a level of neopterin ≥12 nmol/l and a level <12 nmol/l

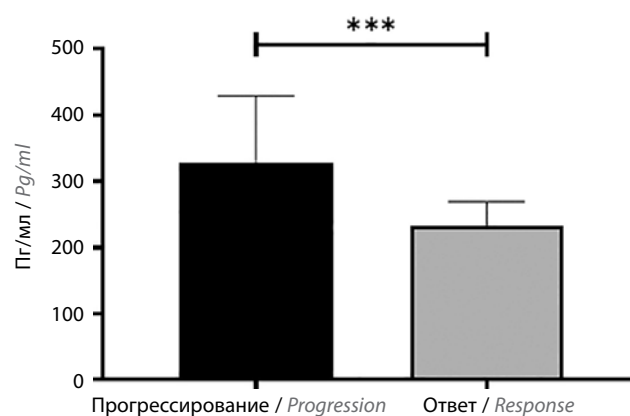
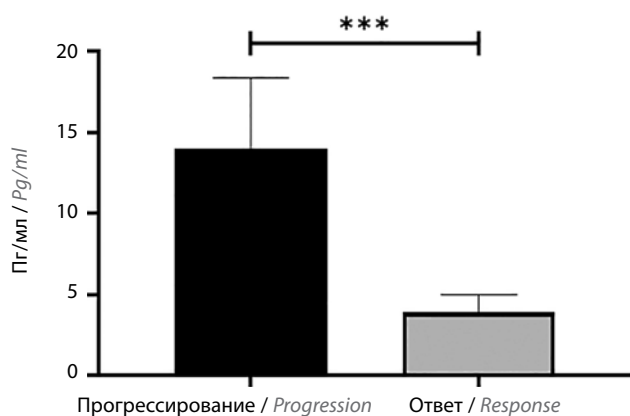


Рис. 6. Уровни интерлейкина 6 (а) и интерлейкина 18 (б) у пациентов с ответом на лечение и прогрессированием заболевания в течение 6 мес
Fig. 6. Interleukin 6 (a) and interleukin 18 (b) levels in patients with response and progression within 6 months

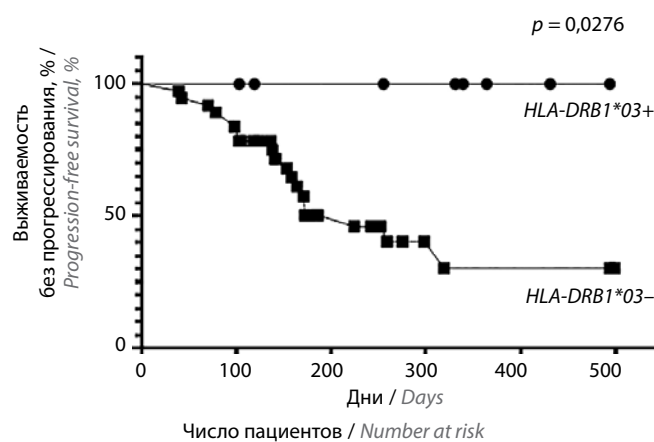
соответственно. Однофакторный регрессионный анализ Кокса не показал статистически значимой взаимосвязи уровней ИЛ-6 ($p = 0,091$), ИЛ-18 ($p = 0,056$) и ВБП.

HLA-DRB1. У пациентов 1-й группы наличие генотипа *HLA-DRB1*03* ассоциировано с длительностью ответа ≥ 6 мес: он наблюдался в 26,9 % (7/26) случаев ответа >6 мес и в 0 % (0/19) при прогрессировании заболевания ($p = 0,016$). У всех больных отмечалась частота объективного ответа: в 6 случаях достигнут частичный ответ, в 1 — полный. У пациентов с наличием аллели *HLA-DRB1*03* показатели ВБП оказались статистически значимо выше, чем у пациентов с другими аллельными вариантами: медиана — значение не достигнуто и 224 дня соответственно (ОР 3,6; 95 % ДИ 1,2–11,2; $p = 0,0276$) (рис. 7). Однако однофакторный регрессионный анализ Кокса не показал взаимосвязи *HLA-DRB1*03* и более длительной ВБП ($p > 0,05$).

Антитела к тиреопероксидазе. Во всех случаях наличия аутоиммунного тиреоидита ($n = 7$) выявлены анти-ТПО (положительное значение в соответствии с инструкцией производителя составляло >50 МЕ/мл). В 1-й группе их наличие ассоциировано с длительностью ответа ≥ 6 мес: они обнаружены в 26,9 % (7/26) случаев при ответе на лечение и в 0 % (0/19) при прогрессировании заболевания ($p = 0,016$). Однако по результатам однофакторного регрессионного анализа взаимосвязи между анти-ТПО и ВБП не обнаружено ($p = 0,118$) (см. табл. 2).

В 1-й группе не было выявлено взаимосвязи длительности ответа на ИТ и наличием исследуемых аутоантител: АНФ, АНЦА, антител к экстрагируемым ядерным антигенам, АКА, анти- β -2-ГП, АМА, АГМА и анти-MCV.

Определение различий в иммунологических параметрах между 1-й и 2-й группами. Во 2-й группе при проведении химиотерапии не выявлено исследуемых антител (АНФ, АНЦА, антитела к экстрагируемым ядерным антигенам, АКА, анти-ТПО, анти- β -2-ГП, АМА, АГМА, анти-MCV). Также в данной группе не обнаружено взаимосвязи аллельных вариантов гена *HLA-DRB1* и ответа на химиотерапию.



Дни / Days						
HLA-DRB1*03+	17	15	7	4	3	1
HLA-DRB1*03-	28	24	14	7	4	3

Рис. 7. Выживаемость без прогрессирования у пациентов с *HLA-DRB1*03* и другими аллельными вариантами
Fig. 7. Progression-free survival in patients with *HLA-DRB1*03* and other allelic variants

У пациентов 1-й группы, получавших ИТ в основном после химиотерапии, и у пациентов 2-й группы, которым назначали платиносодержащий дуплет, выявлено статистически значимое различие уровня β -2-МГ ($p < 0,0001$): медиана данного показателя составила 2,1 мг/л (95 % ДИ 2,0–2,5 мг/л) и 1,1 мг/л (95 % ДИ 1,0–1,2 мг/л) соответственно. У 16 больных 1-й группы медиана уровня β -2-МГ сопоставима с медианой этого маркера во 2-й группе до начала ИТ — 1,2 мг/л (95 % ДИ 1,0–1,4 мг/л).

Также выявлено статистически значимое различие уровня неоптерина в 1-й и 2-й группах: медиана этого показателя составила 9,3 нмоль/л (95 % ДИ 10,0–14,3 нмоль/л) и 6,3 нмоль/л (95 % ДИ 5,7–7,5 нмоль/л) соответственно. До иммунотерапии медиана уровня неоптерина оказалась аналогичной у 16 пациентов 1-й группы и пациентов 2-й группы — 5,9 нмоль/л (95 % ДИ 5,2–6,9 нмоль/л).

У пациентов 1-й группы уровень ИЛ-6 через 2 мес от начала лечения оказался выше, чем у пациентов

2-й группы: медиана составила 5,6 пг/мл (95 % ДИ 5,8–9,7; $n = 19$) и 2,0 пг/мл (95 % ДИ 1,8–2,7 пг/мл) соответственно ($p < 0,0001$). В 1-й группе также отмечалась более высокая медиана уровня ИЛ-18 по сравнению со 2-й группой: 268,7 пг/мл (95 % ДИ 250,9–319,2 пг/мл) и 165,0 пг/мл (95 % ДИ 151,6–181,9 пг/мл) соответственно ($p < 0,0001$). У 16 пациентов 1-й группы до ИТ уровни ИЛ-6 и ИЛ-18 были сопоставимы с этими показателями пациентов 2-й группы (в обоих случаях $p = 1,0$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время ИТ является стандартом лечения пациентов с распространенным НМРЛ. Однако ее низкая эффективность приблизительно у 60 % пациентов обуславливает необходимость поиска новых предиктивных и прогностических маркеров ответа [8]. По результатам оценки клинично-патоморфологических характеристик НМРЛ, в том числе уровня экспрессии PD-L1 на опухолевых клетках, лишь наличие мутаций *EGFR/ALK* является независимым предиктором более короткой ВБП ($p = 0,018$). Исследование биомаркеров в периферической крови является одним из подходов к решению данной проблемы, преимуществом которого служит малоинвазивный характер забора материала.

Была показана предиктивная роль маркеров хронического воспаления. Однофакторный регрессионный анализ показал, что НЛО ≥ 5 до начала лечения является предиктором более низких показателей ВБП ($p = 0,009$). В нашем исследовании впервые обнаружена прогностическая роль β -2-МГ при использовании анти-PD-1/PD-L1-антител. Этот маркер представляет собой гликозилированный белок, компонент HLA I класса, участвующий в регуляции иммунного ответа [9]. У пациентов с распространенным НМРЛ, получающих ИТ в монорежиме во 2-й и последующих линиях, наличие высокого уровня β -2-МГ (медиана 2,9 мг/л) через 2 мес после начала терапии ассоциировано с ранним прогрессированием заболевания (< 6 мес) ($p < 0,0001$). Также результаты многофакторного регрессионного анализа показали, что β -2-МГ $\geq 2,5$ мг/л является независимым предиктором более короткой ВБП ($p = 0,006$).

При этом не обнаружено влияния на уровень данного маркера платиносодержащей химиотерапии в 1-й линии у пациентов с НМРЛ: его медиана во 2-й группе составила 1,1 мг/л. Схожий показатель был получен у пациентов перед началом ИТ. Для исключения влияния нарушения функции почек как ключевого регулятора катаболизма β -2-МГ у больных 1-й группы определен уровень креатина, который соответствовал референтным значениям. В ряде работ продемонстрирована негативная прогностическая роль β -2-МГ при гематологических неоплазиях [10]. Возможным объяснением данного феномена является то, что высокий уровень данного маркера *in vitro* ингибирует иммунный ответ путем замедления образования функциональных дендритных клеток [10].

Еще одним прогностическим маркером, впервые обнаруженным в ходе работы, является неоптерин. В исследованиях показано, что данный белок представляет собой биомаркер постоянной иммунной стимуляции, что обусловлено нарушением иммунного ответа [11]. Повышение уровня неоптерина связано с негативным прогнозом при различных злокачественных новообразованиях [11]. Было впервые показано статистически значимое увеличение уровня неоптерина при ИТ у пациентов с распространенным НМРЛ ($p < 0,0001$). Также высокий уровень этого белка (медиана – 15,4 нмоль/л) связан с прогрессированием заболевания в течение 6 мес. Показатели ВБП у пациентов с неоптерином ≥ 12 нмоль/л оказались значительно хуже, чем у пациентов с низким уровнем данного маркера ($p = 0,0007$). В ходе многофакторного анализа было выявлено, что уровень неоптерина ≥ 12 нмоль/л является независимым предиктором более короткой ВБП ($p = 0,027$).

Согласно результатам исследования цитокины также являются прогностическими маркерами ответа на ИТ. Высокие уровни ИЛ-6 и ИЛ-18 были ассоциированы с ранним прогрессированием заболевания. При этом не показано влияния предшествующей терапии платиносодержащим дуплетом. Аналогичные данные о взаимосвязи ИЛ-6 и ответа на ИТ получены A. Keegan и соавт. [12].

Появление иммуноопосредованных НЯ I–II степени ассоциировано с длительностью ответа ≥ 6 мес ($p = 0,013$). В ходе однофакторного регрессионного анализа было выявлено, что их наличие связано с более продолжительной ВБП ($p = 0,038$). Согласно результатам метаанализа S. Hussaini и соавт. иммуноопосредованные НЯ являются независимыми предикторами увеличения показателей ВБП и ОВ независимо от типа опухоли [13]. Также наличие антител-ТПО, которое отмечалось у всех пациентов с аутоиммунным тиреоидитом, ассоциировано с длительностью ответа > 6 мес, что сопоставимо с данными, полученными в ходе исследования E. Basak и соавт. [14]. Мы не выявили других аутоантител, которые могут служить предиктивными маркерами ответа на терапию ИКТИО. Также впервые была продемонстрирована предиктивная роль генотипа *HLA-DRB1*03*, который ассоциирован с ответом на терапию ≥ 6 мес. Более того, у пациентов с распространенным НМРЛ, получавших анти-PD-1/PD-L1-терапию в монорежиме во 2-й и последующих линиях, наличие данного аллельного варианта ассоциировано с более высокими показателями ВБП. Однако регрессионный анализ Кокса данную взаимосвязь не показал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунологические маркеры могут служить перспективными прогностическими факторами у пациентов с распространенным НМРЛ при применении ингибиторов контрольных точек иммунного ответа.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bai R., Lv Z., Xu D., Cui J. Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. *Biomark Res* 2020;8:34. DOI: 10.1186/s40364-020-00209-0.
2. Pourmir I., Gazeau B., de Saint Basile H., Fabre E. Biomarkers of resistance to immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer: myth or reality? *Cancer Drug Resist* 2020;3:276–86. DOI: 10.20517/cdr.2020.14.
3. Möller M., Turzer S., Schütte W. et al. Blood immune cell biomarkers in patient with lung cancer undergoing treatment with checkpoint blockade. *J Immunother* 2020;43(2):57–66. DOI: 10.1097/CJI.0000000000000297.
4. Salmaninejad A., Vailou S.F., Shabgah A.G. et al. PD-1/PD-L1 pathway: basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol* 2019;234(10):16824–37. DOI: 10.1002/jcp.28358.
5. Reck M., Rodríguez-Abreu D., Robinson A.G. et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1 – positive non–small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2016;375(19):1823–33. DOI: 10.1056/NEJMoa1606774.
6. Duchemann B., Remon J., Naigeon M. et al. Integrating circulating biomarkers in the immune checkpoint inhibitor treatment in lung cancer. *Cancers (Basel)* 2020;12(12):3625. DOI: 10.3390/cancers12123625.
7. Wang L., Hu Y., Wang S. et al. Biomarkers of immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* 2020;20(5):139. DOI: 10.3892/ol.2020.11999.
8. Prelaj A., Tay R., Ferrara R. et al. Predictive biomarkers of response for immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2019;106:144–59. DOI: 10.1016/j.ejca.2018.11.002.
9. Zhang H., Cui B., Zhou Y. et al. B2M overexpression correlates with malignancy and immune signatures in human gliomas. *Sci Rep* 2021;11:5045. DOI: 10.1038/s41598-021-84465-6.
10. Xie J., Wang Y., Freeman M.E. et al. β 2-microglobulin as a negative regulator of the immune system: high concentrations of the protein inhibit *in vitro* generation of functional dendritic cells. *Blood* 2003;101(10):4005–12. DOI: 10.1182/blood-2002-11-3368.
11. Melichar B., Spisarová M., Bartoušková et al. Neopterin as a biomarker of immune response in cancer patients. *Ann Transl Med* 2017;5(13):280. DOI: 10.21037/atm.2017.06.29.
12. Keegan A., Ricciuti B., Garden P. et al. Plasma IL-6 changes correlate to PD-1 inhibitor responses in NSCLC. *J Immunother Cancer* 2020;8:e000678. DOI: 10.1136/jitc-2020-000678.
13. Hussaini S., Chehade R., Boldt R.G. et al. Association between immune-related side effects and efficacy and benefit of immune checkpoint inhibitors – A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2021;92:102134. DOI: 10.1016/j.ctrv.2020.102134.
14. Basak E.A., van der Meer J.W.M., Hurkmans D.P. et al. Overt thyroid dysfunction and anti-thyroid antibodies predict response to anti-PD-1 immunotherapy in cancer patients. *Thyroid* 2020;30(7):966–73. DOI: 10.1089/thy.2019.0726.

Вклад авторов

А.А. Мусаелян: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, оформление иллюстративного материала, статистический анализ, написание текста статьи;
 С.В. Лапин, М.А. Уртеннова, С.В. Одинцова, И.В. Чистяков, А.М. Улитин: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, научное редактирование;
 Н.Т. Исманбаев: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;
 А.Л. Акопов: анализ полученных данных, научное редактирование;
 С.В. Орлов: идея и разработка дизайна, научное редактирование, руководство исследованием.

Authors's contribution

A.A. Musaelyan: development of research design, review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained, design of illustrative material, statistical analysis, article writing;
 S.V. Lapin, M.A. Urtenova, S.V. Odintsova, I.V. Chistyakov, A.M. Ulitin: research design development, analysis of the data obtained, scientific editing;
 N.T. Ismanbaev: development of research design, review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained;
 A.L. Akopov: analysis of the data obtained, scientific editing;
 S.V. Orlov: idea and design development, scientific editing, research management.

ORCID авторов

А.А. Мусаелян / A.A. Musaelyan: <https://orcid.org/0000-0002-7570-2256>
 А.Л. Акопов / A.L. Akopov: <https://orcid.org/0000-0001-8698-7018>
 С.В. Лапин / S.V. Lapin: <https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>
 С.В. Орлов / S.V. Orlov: <https://orcid.org/0000-0001-6080-8042>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Все пациенты подписали информированное согласие на сбор биологического материала, клинических данных и проведение иммунологических исследований. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова».

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients gave written informed consent to participate in the study, to the collection of biological material, clinical data and immunological studies. The study was approved by the local Ethics Committee of I.P. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University.

Статья поступила: 01.07.2021. Принята к публикации: 15.02.2022.

Article submitted: 01.07.2021. Accepted for publication: 15.02.2022.

Метаболизм триптофана при различном эффекте иммунотерапии немелкоклеточного рака легкого ингибиторами PD-1/PD-L1

Е.Ю. Златник¹, А.Б. Сагакянц¹, И.А. Новикова¹, А.Ю. Максимов¹, О.П. Шатова², С.А. Апполонова², Н.Е. Москалева², С.А. Румянцев², А.В. Шестопалов²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037 Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63;

²кафедра биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Александр Борисович Сагакянц asagak@rambler.ru

Введение. В структуре онкологической заболеваемости рак легкого занимает 1-е место среди мужчин. С целью изучения молекулярных механизмов инициации и прогрессирования рака легких необходимо исследовать не только сами опухолевые клетки, но и особенности системного метаболизма триптофана. Катаболиты триптофана, будучи в большой степени продуктами метаболической активности микробиоты кишечника, могут влиять на эффективность проведения иммунотерапии ингибиторами контрольных точек. Кинурениновый путь метаболизма триптофана интенсифицируется в организме онкологических пациентов, его продукты имеют проонкогенное и иммуносупрессивное действие, что может препятствовать эффективности иммунотерапии.

Цель исследования – изучение динамики изменений различных метаболитов триптофанового обмена в сыворотке крови и кале больных немелкоклеточным раком легкого при различных эффектах иммунотерапии ингибиторами PD-1 (рецептора программируемой клеточной гибели 1)/PD-L1 (лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1).

Материалы и методы. В исследование были включены образцы сыворотки крови и кала, полученные от 20 больных немелкоклеточным раком легкого, получавших ингибиторы PD-1/PD-L1. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим анализом проведена оценка уровней 13 метаболитов триптофана у больных с различными эффектами иммунотерапии. Достоверность различий между выборками оценивали с помощью непараметрического метода по критерию Манна–Уитни. Они считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. В анализах кала пациентов, у которых наблюдали положительный эффект от иммунотерапии, исходные уровни 5-гидроксииндолацетата и хинолиновой кислоты были ниже, чем у больных с прогрессированием опухоли. Положительная клиническая динамика сопровождалась снижением содержания индол-3-лактата, кинуренина и индол-3-карбоксальдегида в анализах кала больных. В сыворотке пациентов с положительным ответом исходное содержание 5-гидроксииндолацетата, индол-3-ацетата, индол-3-бутирата и хинолиновой кислоты оказалось ниже, чем у пациентов с прогрессированием немелкоклеточного рака легкого. Положительный ответ на иммунотерапию характеризовался повышением уровней индол-3-бутирата и индол-3-пропионата, а отрицательный – не сопровождался статистически значимыми изменениями исследованных триптофановых метаболитов.

Заключение. Профилирование метаболитов триптофана в кале и сыворотке больных немелкоклеточным раком легкого может быть использовано для прогнозирования эффективности иммунотерапии ингибиторами PD-1/PD-L1.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, иммунотерапия ингибиторами PD-1/PD-L1, метаболиты триптофана, прогнозирование

Для цитирования: Златник Е.Ю., Сагакянц А.Б., Новикова И.А. и др. Метаболизм триптофана при различном эффекте иммунотерапии немелкоклеточного рака легкого ингибиторами PD-1/PD-L1. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2):89–96. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-89-96.

Metabolism of tryptophan in non-small lung cancer patients with different effect of PD-1/PD-L1 inhibitors immunotherapy

E. Yu. Zlatnik¹, A. B. Sagakyan¹, I. A. Novikova¹, A. Yu. Maksimov¹, O. P. Shatova², S. A. Appolonova², N. E. Moskaleva², S. A. Rumyantsev², A. V. Shestopalov²

¹National Medical Research Centre for Oncology; 63 14th Liniya St., Rostov-on-Don 344037, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovitianov St., Moscow 117997, Russia

Contacts: Alexander Borisovich Sagakyants asagak@rambler.ru

Introduction. In the structure of cancer incidence, lung cancer ranks first among men. In order to study the molecular mechanisms of the initiation and progression of lung cancer, it is necessary to study not only the tumor cells themselves, but also the features of the systemic tryptophan metabolism. Tryptophan catabolites, being to a large extent product of the metabolic activity of the intestinal microbiota, can affect the effectiveness of immunotherapy with checkpoint inhibitors. The kynurenine pathway of tryptophan metabolism is intensified in the body of cancer patients; its products have a pro-oncogenic and immunosuppressive effect, which may hinder the effectiveness of immunotherapy.

Objective – to study the dynamics of changes in various metabolites of tryptophan metabolism in the blood serum and feces of patients with non-small cell lung cancer with various effects of immunotherapy with inhibitors of PD-1 (programmed cell death receptor 1)/PD-L1 (programmed cell death receptor 1 ligand).

Materials and methods. The study included blood serum and stool samples obtained from 20 patients with non-small cell lung cancer treated with PD-1/PD-L1 inhibitors. Using high-performance liquid chromatography with mass spectrometric analysis, the levels of 13 tryptophan metabolites were assessed in patients with various effects of immunotherapy. The significance of differences between the samples was assessed using a nonparametric method according to the Mann – Whitney test. They were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. In fecal analyzes of patients in whom a positive effect of immunotherapy was observed, baseline levels of 5-hydroxyindole acetate and quinolinic acid were lower than in patients with tumor progression. Positive clinical dynamics was accompanied by a decrease in the content of indole-3-lactate, kynurenine and indole-3-carboxaldehyde in the feces of patients. In the serum of patients with a positive response, the initial content of 5-hydroxyindole acetate, indole-3-acetate, indole-3-butyrate and quinoline acid was lower than in patients with progression of non-small cell lung cancer. A positive response to immunotherapy was characterized by an increase in the levels of indole-3-butyrate and indole-3-propionate, and a negative response was not accompanied by statistically significant changes in the studied tryptophan metabolites.

Conclusion. Profiling tryptophan metabolites in feces and serum of patients with non-small cell lung cancer can be used to predict the effectiveness of immunotherapy with PD-1/PD-L1 inhibitors.

Key words: non-small lung cancer, immunotherapy with PD-1/PD-L1 inhibitors, tryptophan metabolites, prognosis

For citation: Zlatnik E.Yu., Sagakyants A.B., Novikova I.A. et al. Metabolism of tryptophan in non-small lung cancer patients with different effect of PD-1/PD-L1 inhibitors immunotherapy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):89–96. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-89-96.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с высокой заболеваемостью метастатическим немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) и недостаточной эффективностью методов его лечения многие исследовательские группы ведут активный поиск новых подходов к терапии данной патологии. Актуальным и обнадеживающим направлением иммунотерапии является применение ингибиторов контрольных точек (ИКТ) системы PD-1 (рецептор программируемой клеточной гибели 1)/PD-L1 (лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1), которые гиперэкспрессированы на Т-лимфоцитах и опухолевых клетках соответственно [1–3]. Однако использование ИКТ не всегда дает желаемый эффект, который зависит не только от экспрессии рецепторов и лигандов, но и от системного метаболизма триптофана.

В настоящее время известно, что опухоль является «ловушкой» не только для глюкозы, но и для незаменимой аминокислоты триптофана. Показано, что в большинстве образцов рака толстой кишки гиперэкспрессированы гены транспортеров триптофана SLC1A5 (solute carrier – растворимые переносчики) и SLC7A5 [4], вследствие чего опухолевое метаболическое микроокружение характеризуется дефицитом

триптофана и повышением содержания иммуносупрессивных триптофановых катаболитов [5]. Многочисленные работы, посвященные изучению роли триптофанового обмена в канцерогенезе, демонстрируют плейотропные эффекты продуктов катаболизма триптофана: кинуренина [5], кинуреновой кислоты [6], индола [7], индол-3-ацетата [8], индол-3-бутирата, самого триптофана, серотонина [9] и др. [10]. Сывороточный уровень триптофана зависит как от поступления с пищей, так и от микробиотического синтеза и реутилизации аминокислоты [11] благодаря катаболизму собственных белков. В макроорганизме триптофан превращается по 3 ключевым путям: серотониновому, индольному и кинурениновому [12]. Последний интенсифицирован в опухолевой ткани [4], что объясняется активирующим действием протоонкогена *c-MYC*, а также генов, гиперэкспрессированных в опухолях и ответственных за ферменты продукции кинуренина: триптофан-2,3-диоксигеназы (TDO2), индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO1) и арилформамидазы (AFMID).

Гиперпродукция кинуренина и высокая экспрессия транспортеров триптофана обеспечивают межклеточное вещество опухоли высокой концентрацией кинуренина, участвующего в иммуноредактировании

опухолевого микроокружения и вызывает инактивацию Т-клеток [13] и деградацию Е-кадгерина, что является критическим событием для миграции и метастазирования опухолевых клеток [14]. Согласно недавним исследованиям триптофан путем присоединения к остаткам лизина в различных белках (триптофанилирования) способствует регуляции экспрессии PD-1 [4]. Таким образом, у пациентов со злокачественными новообразованиями, в частности с раком легкого, триптофановый обмен, включающий системный (сывороточный) и локальный (кишечный) компартменты, может отразиться на результативности применения ИКТ [2].

Цель исследования — изучение динамики изменения различных метаболитов триптофанового обмена в сыворотке крови и кале больных НМРЛ при разном эффекте иммунотерапии ингибиторами PD-1/PD-L1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включен 21 пациент с НМРЛ различной морфологии и стадии TNM, получавший ингибиторы PD-1/PD-L1. Средний возраст больных составил $62,3 \pm 5,7$ года. У 1 пациента развилось иммуноопосредованное нежелательное явление (синдром Гийена—Барре), вследствие чего ИКТ были отменены. Среди обследованных в динамике 20 больных НМРЛ (12 мужчин и 8 женщин) при поступлении заболевание I стадии было диагностировано у 2 (9 %) пациентов, II стадии — у 1 (5 %), III стадии — у 5 (24 %), IV стадии — у 13 (62 %).

Больные получали лечение согласно стандартам, а при развитии генерализации им назначали ингибиторы PD-1/PD-L1. Так, 9 (45 %) пациентов исследуемой группы получали атезолизумаб, 8 (40 %) — пембролизумаб и 3 (15 %) — ниволумаб. Больные были разделены на 3 группы в соответствии с ответом на терапию: положительной динамики после иммунотерапии (уменьшение опухоли, ремиссия), отрицательной динамики (прогрессирование заболевания) и стабилизации процесса (отсутствие динамики) (табл. 1). Пациенты исследуемой группы ($n = 20$) ответили на терапию ИКТ следующим образом: у 2 был полный ответ, у 6 — частичный ответ, у 4 — стабилизация процесса и у 8 — отрицательная динамика (прогрессирование заболевания).

Критериями включения пациентов в исследование были отсутствие приема антибиотиков, пре- и/или пробиотических препаратов в течение 3 мес до его начала и наличие письменного информированного согласия на участие в нем. Все больные прошли клиническое обследование, антропометрическую оценку и анкетирование. Также у них были взяты образцы крови и кала для лабораторного анализа.

Количественную оценку 13 метаболитов триптофана в сыворотке крови и кале проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим определением (ВЭЖХ-МС/МС)

с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1200 (Agilent Inc., США).

Хроматографическое разделение проводили с помощью аналитической колонки Discovery PFP HS F5 ($2,1 \times 150$ мм; 3 мкм). Для детектирования использовался масс-спектрометрический детектор на основе MPM Agilent 6460 с тройным квадруполем (Agilent Inc., США) и ионизацией электрораспылением. Полученный сигнал обрабатывался с помощью программного обеспечения Masshunter (Agilent Inc., США).

Концентрацию метаболитов рассчитывали методом внутреннего стандарта с использованием 2-гидроксиникотиновой кислоты. Аналитические стандарты были подготовлены с помощью искусственной матрицы, содержащей бычий сывороточный альбумин и хлорид натрия. Изученные метаболиты добавлены в матрицу и приготовлены в соответствии с методом анализа. Для подготовки образцов к 100 мкл сыворотки крови добавляли внутренний стандарт (2-гидроксиникотиновую кислоту), белки осаждали ацетонитрилом, супернатант выпаривали и повторно растворяли в 10 % метаноле с добавлением аскорбиновой кислоты для предотвращения окисления анализируемых веществ. Образцы кала лиофилизировали до сухого остатка, затем навеску массой около 5 мг экстрагировали 50 % метанолом в воде с добавлением внутреннего стандарта и аскорбиновой кислоты. После центрифугирования образец анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Статистический анализ проводили с помощью пакета статистических программ MedCalc и Statistica 13.3 (StatSoft Inc., США), что предполагало расчет основных статистических характеристик выборок, выявление характера распределения показателей с использованием критерия Шапиро—Уилка. Поскольку полученные данные имели ненормальное распределение, результаты представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Me (нижний квартиль — верхний квартиль)). Достоверность различий между выборками оценивали с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке динамики уровня метаболитов триптофана в целом по группе больных было установлено, что на фоне проведения иммунотерапии в сыворотке крови наблюдается повышение уровня хинолиновой кислоты (с Me 162,44 (105,420—214,794) до Me 171,812 (123,548—255,301); $p < 0,05$) и снижение уровня серотонина (с Me 371,693 (264,420—545,143) до Me 309,685 (182,781—475,658); $p < 0,05$). При этом уровень триптофана статистически значимо не изменился, а в кале было обнаружено возрастание этого показателя (с Me 37,025 (19,351—61,810) до Me 57,451 (25,183—83,859); $p < 0,05$) (см. рисунок). Изменений других исследованных метаболитов триптофана обнаружено не было.

Таблица 1. Содержание триптофана и его метаболитов в кале пациентов с немелкоклеточным раком легкого до и после иммунотерапии в зависимости от эффекта лечения, нмоль/г

Table 1. Levels of tryptophan and its metabolites in feces of patients with non-small-cell lung carcinoma before and after immunotherapy depending on their response to treatment, nmol/g

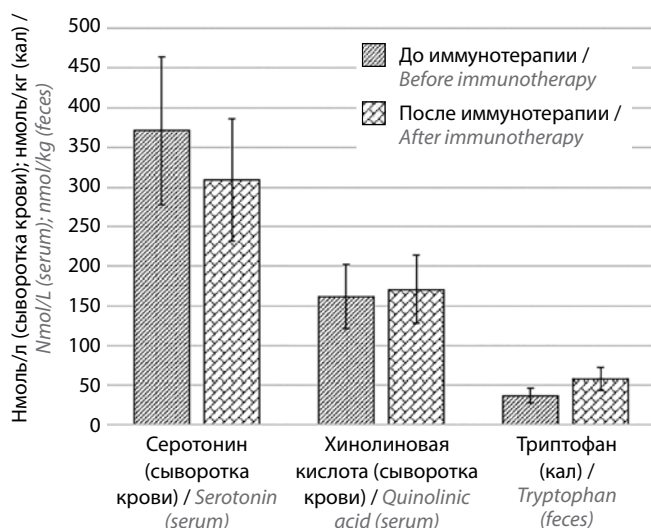
Метаболит Metabolite	Отрицательная динамика, медиана (нижний квартиль — верхний квартиль) Negative dynamics, median (lower quartile — upper quartile)		Положительная динамика, медиана (нижний квартиль — верхний квартиль) Positive dynamics, median (lower quartile — upper quartile)		Стабилизация, медиана (нижний квартиль — верхний квартиль) Stabilization, median (lower quartile — upper quartile)	
	До лечения Before treatment	После лечения After treatment	До лечения Before treatment	После лечения After treatment	До лечения Before treatment	После лечения After treatment
Триптофан Tryptophan	32,9 (25,6–70,8)	76,5 (25,7–92,8)	41,5 (23,3–53,3)	50,1 (26,1–64,4)	11,5 (11,5–48,4)	39,2 (17,6–62,1)
Индол-3-ацетат Indole-3-acetate	2,95 (1,38–24,60)	11,30 (6,56–15,70)	10,10 (3,69–13,40)	6,66 (3,28–16,80)	10,60 (3,59–14,40)	3,86 (2,31–4,81)
Индол-3-пропионат Indole-3-propionate	2,57 (0,83–6,21)	7,92 (2,72–10,90)	5,86 (1,49–7,84)	5,58 (3,76–5,83)	1,66 (0,95–4,49)	3,01 (2,55–10,1)
Кинуреновая кислота Hyaluronic acid	3,29 (1,75–8,28)	1,99 (1,36–4,79)	2,65 (1,17–10,40)	5,25 (0,98–9,07)	0,92 (0,82–1,21)	1,71 (1,01–6,85)
Хинолиновая кислота Quinolic acid	4,42 (1,73–5,49)	2,01 (1,86–8,81)	1,24* (0,91–2,30)	1,74 (1,06–2,41)	1,76 (1,21–1,96)	3,41 (3,18–9,14)
Индол-3-карбоксаль- дегид Indole-3-carboxaldehyde	1,47 (1,07–4,27)	1,37 (0,88–2,03)	3,41 (1,51–4,89)	1,86* (0,79–2,56)	2,72 (1,22–6,95)	1,41 (0,53–2,71)
Ксантуреновая кислота Xanthurenic acid	1,66 (0,43–2,49)	0,86 (0,42–3,69)	0,28 (0,15–4,22)	0,41 (0,03–1,45)	1,69 (0,48–10,10)	2,27 (1,72–2,62)
Индол-3-бутират Indole-3-butyrate	0,437 (0,202–0,825)	0,373 (0,314–0,641)	0,476 (0,233–0,744)	0,414 (0,133–0,818)	0,266 (0,256–0,333)	0,314 (0,129–0,657)
Кинуренин Kinurenin	0,284 (0,126–1,560)	0,295 (0,210–1,470)	0,276 (0,079–0,508)	0,197** (0,163–0,198)	0,111 (0,098–0,128)	0,124 (0,108–0,162)
5-гидроксииндолацетат 5-hydroxyindolacetate	0,567 (0,150–0,993)	0,611 (0,195–0,915)	0,064* (0,025–0,363)	0,173 (0,038–0,657)	0,106 (0,045–0,217)	0,394 (0,184–1,06)
Индол-3-лактат Indole-3-lactate	0,198 (0,122–0,801)	0,227 (0,204–0,678)	0,185 (0,142–0,301)	0,114** (0,066–0,154)	0,357 (0,136–0,567)	0,314 (0,143–0,723)
Триптамин Tryptamine	0,136 (0,029–0,430)	0,123 (0,056–2,110)	0,096 (0,054–0,175)	0,041 (0,009–0,201)	0,257 (0,084–0,344)	0,191 (0,017–1,320)
Антраниловая кислота Anthranilic acid	0,081 (0,067–0,128)	0,087 (0,076–0,175)	0,123 (0,072–0,163)	0,084 (0,060–0,160)	0,074 (0,061–0,125)	0,128 (0,068–0,214)

*Статистически значимые различия показателей по сравнению с группой, в которой наблюдалась отрицательная динамика ($p \leq 0,05$). **Статистически значимые различия до и после иммунотерапии в каждой группе.

*Statistically significant differences in indicators compared to the group in which negative dynamics was observed ($p \leq 0.05$). **Statistically significant differences before and after immunotherapy in each group.

В табл. 1 и 2 представлены результаты оценки содержания метаболитов триптофана в кале и сыворотке крови пациентов с различным ответом на иммунотерапию: с отрицательным, положительным ответами и стабилизацией процесса. Выявлены статистически значимые различия показателей как до лечения, так и в ходе его проведения. Так, в кале исходное содержание 5-гидроксииндолацетата и хинолиновой кислоты было ниже у пациентов, у которых отмечалась

эффективность терапии, по сравнению с больными с прогрессированием опухоли на фоне лечения (см. табл. 1). Положительная клиническая динамика сопровождалась снижением содержания индол-3-лактата, кинуренина и индол-3-карбоксальдегида в кале. Статистически значимых различий исследованных показателей (в том числе в динамике — до и после лечения) у пациентов со стабилизацией процесса и других групп не отмечено.



Содержание триптофана и его метаболитов в сыворотке крови и кале у пациентов с немелкоклеточным раком легкого до и после иммунотерапии

Levels of tryptophan and its metabolites in serum and feces of patients with non-small-cell lung carcinoma before and after immunotherapy

Анализ содержания метаболитов триптофана в сыворотке крови также выявил ряд статистически значимых различий как до лечения, так и в ходе его проведения (табл. 2). Исходное содержание 5-гидроксииндолацетата, индол-3-ацетата, индол-3-бутирата и хинолиновой кислоты оказалось ниже у пациентов с положительным эффектом иммунотерапии по сравнению с группой больных с отрицательной динамикой; при стабилизации статистически значимых различий до и после лечения не обнаружено.

Положительный ответ на иммунотерапию характеризовался повышением уровней индол-3-бутирата и индол-3-пропионата, тогда как отрицательный ответ не сопровождался статистически значимыми изменениями исследованных метаболитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы установили, что иммунотерапия ингибиторами PD-1/PD-L1 у пациентов с НМРЛ способствует повышению уровня триптофана в кишечнике, по-видимому, за счет активности его микробиоты. При этом

Таблица 2. Содержание триптофана и его метаболитов в сыворотке крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого до и после иммунотерапии в зависимости от эффекта лечения, нмоль/г

Table 2. The content of tryptophan and its metabolites in the blood serum of patients with non-small cell lung cancer before and after immunotherapy, depending on the effect of treatment, nmol/g

Метаболит Metabolite	Отрицательная динамика, медиана (нижний квартиль – верхний квартиль) Negative dynamics, median (lower quartile – upper quartile)		Положительная динамика, медиана (нижний квартиль – верхний квартиль) Positive dynamics, median (lower quartile – upper quartile)		Стабилизация, медиана (нижний квартиль – верхний квартиль) Stabilization, median (lower quartile – upper quartile)	
	До лечения Before treatment	После лечения After treatment	До лечения Before treatment	После лечения After treatment	До лечения Before treatment	После лечения After treatment
Триптофан Tryptophan	20 305 (17 000–24 277)	17 419 (14 338–18 468)	14 256 (12 872–22 850)	16 574 (15 542–22 888)	18 627 (16 727–20 784)	20 526 (19 718–28 199)
Индол-3-ацетат Indole-3-acetate	1498 (1055–2093)	808 (773–1900)	721* (662–957)	942 (752–1364)	1588 (844–2067)	1813 (1341–2779)
Индол-3-пропионат Indole-3-propionate	502 (286–905)	316 (235–745)	211 (110–602)	726* (656–2397)	1112 (836–1385)	1454 (961–2310)
Кинуреновая кислота Hyaluronic Acid	11,80 (8,91–17,70)	8,97 (5,85–15,50)	12,20 (5,14–24,50)	14,50 (11,40–17,80)	9,64 (7,41–44,50)	36,30 (16,50–56,20)
Хинолиновая кислота Quinolinic acid	181,0 (96,1–256,0)	171,0 (138,0–249,0)	136,0* (97,3–140,0)	167,0 (89,8–244,0)	179,0 (172,0–430,0)	337,0 (119,0–1121,0)
Индол-3-карбоксальдегид Indole-3-carboxaldehyde	43,9 (33,3–62,7)	27,1 (22,2–40,3)	34,2 (28,7–66,2)	40,9 (24,5–55,5)	45,3 (33,8–74,3)	68,5 (64,1–73,1)
Ксантуриновая кислота Xanthurenic acid	1,230 (0,404–2,160)	0,862 (0,627–1,470)	0,845 (0,457–2,910)	1,170 (0,795–1,490)	1,050 (0,655–4,870)	2,710 (2,040–4,140)
Индол-3-бутират Indole-3-butyrate	8,63 (7,03–18,30)	7,07 (5,75–12,90)	4,65* (3,78–8,44)	9,04* (5,93–9,61)	9,63 (6,85–22,30)	14,20 (13,50–20,10)
Кинуренин Kinurenin	3125 (2613–4088)	2117 (1640–2999)	3034 (2810–4788)	2735 (1828–3167)	2615 (2223–3357)	3048 (2100–3336)
5-гидроксииндолацетат 5-hydroxyindolacetate	75,9 (63,4–107,0)	56,6 (42,1–83,8)	51,7* (38,9–69,5)	88,8 (54,4–115,0)	60,4 (53,8–258,0)	129,0 (89,6–152,0)

Окончание табл. 2

The end of table 2

Метаболит Metabolite	Отрицательная динамика, медиана (нижний квартиль — верхний квартиль) Negative dynamics, median (lower quartile — upper quartile)		Положительная динамика, медиана (нижний квартиль — верхний квартиль) Positive dynamics, median (lower quartile — upper quartile)		Стабилизация, медиана (нижний квартиль — верхний квартиль) Stabilization, median (lower quartile — upper quartile)	
	До лечения Before treatment	После лечения After treatment	До лечения Before treatment	После лечения After treatment	До лечения Before treatment	После лечения After treatment
Индол-3-лактат Indole-3-lactate	8,98 (3,38–15,60)	9,21 (4,84–14,50)	6,42 (3,45–9,67)	14,50 (5,72–24,10)	6,71 (4,62–11,20)	8,26 (7,11–26,80)
Триптамин Tryptamine	0,187 (0,107–0,345)	0,104 (0,058–0,194)	0,091 (0,074–0,121)	0,105 (0,079–0,139)	0,096 (0,055–0,131)	0,176 (0,131–0,371)
Антралиловая кислота Anthranilic acid	20,6 (12,1–25,4)	16,4 (12,7–27,1)	11,9 (8,5–24,7)	20,5 (11,7–21,8)	11,4 (10,8–36,2)	28,3 (21,2–45,1)

*Статистически значимые различия показателей по сравнению с группой, в которой наблюдалась отрицательная динамика ($p \leq 0,05$). *Статистически значимые различия до и после иммунотерапии в каждой группе.

*Statistically significant differences in indicators compared to the group in which negative dynamics was observed ($p \leq 0.05$). *Statistically significant differences before and after immunotherapy in each group.

в сыворотке крови увеличивается уровень хинолиновой кислоты и снижается концентрация серотонина. Положительная динамика течения заболевания при иммунотерапии ингибиторами PD-1/PD-L1 связана с низкой концентрацией как в сыворотке, так и в кале хинолиновой кислоты — токсичного вещества, продуцируемого макрофагами. Скорее всего, это отражает изменение их количества и функциональной активности, что еще предстоит изучить.

Эффективность иммунотерапии ингибиторами PD-1/PD-L1 зависит как от таксономического разнообразия и количества полезных микроорганизмов [14], так и от метаболизма триптофановых производных и их регуляторной функции в отношении различных систем организма. Недавнее таксономическое исследование микробиоты кишечника пациентов с опухолями желудочно-кишечного тракта до и после иммунотерапии PD-1/PD-L1-ингибиторами продемонстрировало, что при положительном ответе на лечение в кишечнике преобладали *Prevotella*, *Ruminococcaceae* и *Lachnospiraceae*. Кроме того, показано, что представленность кишечной микробиоты, продуцирующей короткоцепочечные жирные кислоты (*Eubacterium*, *Lactobacillus* и *Streptococcus*), взаимосвязана с положительным ответом на анти-PD-1/PD-L1-терапию [15, 16].

Также мы установили, что успешность проведения иммунотерапии ингибиторами PD-1/PD-L1 НМРЛ зависит от концентраций индол-3-ацетата и индол-3-бутирата, которые образуются микробиотой кишечника, т.е. ее эффективность связана с составом микробиотических метаболитов. При этом сама иммунотерапия, по-видимому, способна редактировать микробиоту как таксономически, так и метаболически, поскольку

после лечения изменяется концентрация главного редактора триптофанирования белков — триптофана. Это, в свою очередь, снижает синтез PD-1 и определяет эффективность терапии НМРЛ PD-1/PD-L1-ингибиторами [2, 16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный анализ системного и локального содержания метаболитов триптофана у пациентов с НМРЛ при различном ответе на иммунотерапию ингибиторами PD-1/PD-L1 показал ряд различий, что позволяет выделить как предиктивные, так и характеризующие развитие эффекта факторы. Среди первых низкий уровень хинолиновой кислоты и 5-гидроксииндолацетата в кале и сыворотке крови, а также высокий уровень индол-3-ацетата, индол-3-бутирата в сыворотке, которые позволяют прогнозировать положительный ответ, среди последних — повышение уровней индол-3-пропионата и индол-3-бутирата в сыворотке и снижение содержания индол-3-карбоксальдегида, индол-3-лактата и кинуренина в кале больных при развитии положительного ответа, что свидетельствует об активации триптофанового пути метаболизма и о возможном изменении филометаболического ядра микробиоты у данной группы пациентов.

По-видимому, полученные различия связаны с состоянием микробиоты и локального иммунитета, детальное изучение и коррекция которых может способствовать улучшению результатов иммунотерапии. Таким образом, профилирование метаболитов триптофана в кале и сыворотке крови у пациентов с НМРЛ может быть использовано для прогноза эффективности иммунотерапии ингибиторами PD-1/PD-L1.

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

1. Wu Y., Chen W., Xu Z.P., Gu W. PD-L1 distribution and perspective for cancer immunotherapy-blockade, knockdown, or inhibition. *Front Immunol* 2019;10:2022. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02022.
2. Qin R., Zhao C., Wang C.J. et al. Tryptophan potentiates CD8+ T cells against cancer cells by TRIP12 tryptophanylation and surface PD-1 downregulation. *J Immunother Cancer* 2021;9(7):e002840. DOI: 10.1136/jitc-2021-002840.
3. Кит О.И., Водолазский Д.И., Максимов А.Ю. и др. Молекулярно-генетические и фенотипические особенности больных аденокарциномой легкого жителей юга России. *Молекулярная медицина* 2016;14(6):35–40. [Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Maksimov A.Yu. et al. Molecular genetic and phenotypic characteristics of patients with lung adenocarcinoma among inhabitants of the south of Russia. *Molekulyarnaya medicina = Molecular medicine* 2016;14(6):35–40. (In Russ.)].
4. Venkateswaran N., Lafita-Navarro M.C., Hao Y.H. et al. MYC promotes tryptophan uptake and metabolism by the kynurenine pathway in colon cancer. *Genes Dev* 2019;33(17–18):1236–51. DOI: 10.1101/gad.327056.119.
5. Platten M., Wick W., Van den Eynde B.J. Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer Res* 2012;72(21):5435–40. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0569.
6. Walczak K., Turski W.A., Rajtar G. Kynurenic acid inhibits colon cancer proliferation in vitro: effects on signaling pathways. *Amino Acids* 2014;46(10):2393–401. DOI: 10.1007/s00726-014-1790-3.
7. Wan Y., Li Y., Yan C. et al. Indole: a privileged scaffold for the design of anti-cancer agents. *Eur J Med Chem* 2019;183:111691. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111691.
8. Chowdhury M.M.I., Kurata K., Yuasa K. et al. Suppression of TNF α expression induced by indole-3-acetic acid is not mediated by AhR activation in Caco-2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2021;85(4):902–6. DOI: 10.1093/bbb/zbaa101.
9. Sakita J.Y., Bader M., Santos E.S. et al. Serotonin synthesis protects the mouse colonic crypt from DNA damage and colorectal tumorigenesis. *J Pathol* 2019;249(1):102–13. DOI: 10.1002/path.5285.
10. Walczak K., Langner E., Szalast K. et al. A tryptophan metabolite, 8-hydroxy-quinolinaldic acid, exerts antiproliferative and anti-migratory effects on colorectal Cancer Cells. *Molecules* 2020;25(7):1655. DOI: 10.3390/molecules25071655.
11. Tzin V., Galili G. The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book* 2010;8:e0132. DOI: 10.1199/tab.0132.
12. Agus A., Planchais J., Sokol H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Host Microbe* 2018;23(6):716–24. DOI: 10.1016/j.chom.2018.05.003.
13. Liu Y., Liang X., Dong W. et al. Tumor-repopulating cells induce PD-1 expression in CD8+ T cells by transferring kynurenine and AhR activation. *Cancer Cell* 2018;33(3):480–94.e7. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.02.005.
14. Hsu Y.L., Hung J.Y., Chiang S.Y. et al. Lung cancer-derived galectin-1 contributes to cancer associated fibroblast-mediated cancer progression and immune suppression through TDO2/kynurenine axis. *Oncotarget* 2016;7(19):27584–98. DOI: 10.18632/oncotarget.8488.
15. Grenda A., Krawczyk P. Cancer trigger or remedy: two faces of the human microbiome. *Appl Microbiol Biotechnol* 2021;105(4):1395–405. DOI: 10.1007/s00253-021-11125-0.
16. Peng Z., Cheng S., Kou Y. et al. The gut microbiome is associated with clinical response to anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in gastrointestinal cancer. *Cancer Immunol Res* 2020;8(10):1251–61. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-1014.

Вклад авторов

Е.Ю. Златник: анализ результатов, написание текста статьи;
 А.Б. Сагакянц: анализ результатов, статистическая обработка данных, редактирование;
 И.А. Новикова: подбор материала для лабораторного исследования;
 А.Ю. Максимов: сбор клинического материала;
 О.П. Шатова: проведение исследования, сбор данных, анализ результатов, написание текста статьи, редактирование;
 С.А. Апполонова, Н.Е. Москалева: проведение исследования, сбор данных, анализ результатов;
 С.А. Румянцев: анализ результатов;
 А.В. Шестопалов: общее руководство, разработка научной концепции.

Authors' contribution

E.Yu. Zlatnik: analysis of results, article writing;
 A.B. Sagakyan: analysis of results, statistical data processing, article editing;
 I.A. Novikova: selection of material for laboratory research;
 A.Yu. Maksimov: collection clinical material;
 O.P. Shatova: research, data collection, analysis of results, article writing, article editing;
 S.A. Appolonova, N.E. Moskaeva: research, data collection, analysis of results;
 S.A. Rumyantsev: analysis of results;
 A.V. Shestopalov: general guidance, development of a scientific concept.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.Б. Сагакянц / A.B. Sagakyan: <https://orcid.org/0000-0003-0874-5261>
 Е.Ю. Златник / E.Yu. Zlatnik: <https://orcid.org/0000-0002-1410-122X>
 И.А. Новикова / I.A. Novikova: <https://orcid.org/0000-0002-6496-9641>
 А.Ю. Максимов / A.Yu. Maksimov: <https://orcid.org/0000-0002-1397-837X>
 О.П. Шатова / O.P. Shatova: <https://orcid.org/0000-0003-4265-1293>
 С.А. Апполонова / S.A. Appolonova: <https://orcid.org/0000-0002-9032-1558>
 Н.Е. Москалева / N.E. Moskaeva: <https://orcid.org/0000-0002-7309-8913>
 С.А. Румянцев / S.A. Rumyantsev: <https://orcid.org/0000-0002-7418-0222>
 А.В. Шестопалов / A.V. Shestopalov: <https://orcid.org/0000-0002-1428-7706>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы по договору № 0373100122121000031 на выполнение научно-исследовательской работы по проекту «Изучение системы IDO1/TDO2-KYN-AhR в системе хозяин — микробиота — опухоль при злокачественных новообразованиях с целью разработки пролекарства для их лечения» от 01.06.2021 г. с ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства.

Financing. The study was carried out within the framework of research work under the contract No. 0373100122121000031 for the implementation of research work under the project “Study of the IDO1/TDO2-KYN-AhR system in the host-microbiota-tumor system in malignant neoplasms in order to develop a prodrug for their treatment”, dated 01.06.2021 with the Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Biomedical Agency.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Одобрено советом по этике при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России (протокол № 44 от 20.12.2019 г.).

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients gave written informed consent to participate in the study. Approved by the Ethics Council at the National Medical Research Centre for Oncology (protocol No. 44 of 20.12.2019).

Статья поступила: 11.11.2021. **Принята к публикации:** 06.04.2022.

Article submitted: 11.11.2021. **Accepted for publication:** 06.04.2022.

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-97-104



Иммуногистохимическое исследование увеальной меланомы и ее клеточного микроокружения

С.В. Саакян, Л.А. Катаргина, Е.Б. Мякошина, Г.П. Захарова, И.П. Хорошилова—Маслова, А.М. Майбогин

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. Гельмгольца» Минздрава России; Россия, 105062 Москва, ул. Садовая-Черногрозская, 14/19

Контакты: Елена Борисовна Мякошина myakoshina@mail.ru

Введение. Патогенез увеальной меланомы определяется целым рядом факторов, включая молекулярно-генетические, иммунологические и др. Одним из подходов к изучению особенностей патогенеза опухолей данного типа является определение локального содержания в них отдельных субпопуляций лимфоцитов и макрофагов в сочетании с анализом пролиферативной активности опухолевых клеток.

Цель исследования – изучить иммуногистохимические особенности увеальной меланомы и ее клеточного микроокружения.

Материалы и методы. Проанализированы 24 энуклеированных глаза с увеальной меланомой (144 гистологических и 216 иммуногистохимических препаратов) без предшествующего лечения. Изучены клетки иммунного микроокружения: субпопуляции лимфоцитов и экспрессируемые макрофагами антигены CD68+ и CD163+ в строме меланомы и в 2–3 мм от нее. Определен индекс пролиферации опухолевых клеток Ki-67.

Результаты. Во всех образцах ткани увеальной меланомы выявлено наличие лимфоцитов в микроокружении опухолевых клеток. Большую часть исследуемых популяций лимфоцитов составили Т-цитотоксические CD28+–лимфоциты (абсолютное количество положительно окрашенных клеток – $607,3 \pm 431,2$; относительное – $18,84 \pm 12,12$ %) ($p = 0,018$), меньшую часть (практически в равном соотношении) – Т-хелперы CD4+, Т-цитотоксические CD8+– и CD25+–лимфоциты ($p = 0,6$). Абсолютное количество натуральных киллеров субпопуляции CD16+ оказалось ниже по сравнению с субпопуляцией CD56+ ($p = 0,05$). Однако отмечено практически равное относительное количество изучаемых субпопуляций ($p = 0,9$).

Гистологическое исследование выявило наличие в микроокружении ткани увеальной меланомы макрофагов. При иммуногистохимическом исследовании экспрессируемых противовоспалительными и проопухолевыми макрофагами антигенов CD68+ и CD163+ отмечено, что их абсолютное и относительное количество в ткани данной опухоли практически одинаковое, с небольшим преобладанием CD163+ ($p = 0,7$). Иммуногистохимический анализ показал, что в ядрах клеток меланомы в среднем содержится $575,2 \pm 388,5$ значимых клеток белка пролиферации Ki-67. Этот белок обнаружен в $16,69 \pm 10,88$ % опухолевых клеток.

Заключение. Иммуногистохимическое исследование позволяет выявить субпопуляции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, определить подтипы макрофагов и оценить индекс Ki-67 пролиферации опухолевых клеток. Полученные данные в дальнейшем дают возможность оценить значимость обнаружения отдельных субпопуляций иммунных клеток (в частности, Т-цитотоксических CD28+–лимфоцитов) в патогенезе увеальной меланомы в целях разработки таргетного воздействия, обоснования новых иммунотерапевтических подходов к лечению первичной опухоли и перепрограммирования измененных иммунных клеток.

Ключевые слова: увеальная меланома, иммуногистохимическое исследование, субпопуляции лимфоцитов, антигены макрофагов, индекс пролиферации

Для цитирования: Саакян С.В., Катаргина Л.А., Мякошина Е.Б. и др. Иммуногистохимическое исследование увеальной меланомы и ее клеточного микроокружения. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2):97–104. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-97-104.

Immunohistochemical study of uveal melanoma and its cellular microenvironment

S.V. Saakyan, L.A. Katargina, E.B. Myakoshina, G.P. Zakharova, I.P. Khoroshilova—Maslova, A.M. Maibogin

Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases; 14/19 Sadovaya-Chernogryazskaya St., Moscow 105062, Russia

Contacts: Elena Borisovna Myakoshina myakoshina@mail.ru

Introduction. Uveal melanoma pathogenesis is determined by a number of factors, including the tumor molecular genetics, the organism's immune response, and other ones. One of the approaches to studying the peculiarities of pathogenesis

of this cancer is to determine the local subpopulations of lymphocytes and macrophages in combination with the study of the proliferative activity of tumor cells.

Objective – to study the immunohistochemical features of uveal melanoma and its cellular microenvironment.

Materials and methods. 24 enucleated eyes with uveal melanoma (144 histological and 216 immunohistochemical preparations) without previous treatment were analyzed. Cells of the immune microenvironment were analyzed: lymphocyte subpopulations and CD 68+ and CD 163+ antigens expressed by macrophages in the melanoma stroma and 2–3 mm from it. The tumor cell proliferation index Ki-67 was diagnosed.

Results. All tissue samples of uveal melanoma revealed the presence of lymphocytes in the microenvironment of tumor cells. A large proportion of the studied subpopulations of lymphocytes were T-cytotoxic CD28+ lymphocytes (absolute content: 607.3 ± 431.2 , relative: $18.84 \% \pm 12.12 \%$) ($p = 0.018$). A smaller proportion, but in equal proportions, were T-helpers CD4+, T-cytotoxic CD8+ and CD25+ lymphocytes ($p = 0.6$). The absolute number of natural killer cells subpopulation CD16+ was lower compared to CD56+ ($p = 0.05$). However, an almost equal relative content of the studied subpopulations was noted ($p = 0.9$).

Histological examination revealed the presence of uveal melanoma macrophages in the microenvironment of the tissue. The immunohistochemical study of CD68+ and CD163+ antigens expressed by anti-inflammatory and pro-tumor macrophages showed that their absolute and relative content in the uveal melanoma tissue is almost the same with a slight predominance of CD163+ ($p = 0.7$). Immunohistochemical analysis showed that the nuclei of melanoma cells contain, on average, 575.2 ± 388.5 significant cells of the Ki-67 proliferation protein. This protein was found in $16.69 \pm 10.88 \%$ of tumor cells.

Conclusion. Immunohistochemical study allows to identify subpopulations of lymphocytes infiltrating the tumor, to determine the subtypes of macrophages and to estimate the Ki-67 index of tumor cell proliferation. The data obtained will make it possible to further evaluate the significance of individual immune cells (in particular, T-cytotoxic CD28+ lymphocytes) in the pathogenesis of uveal melanoma in order to develop targeted effects, substantiate new immunotherapeutic approaches to the treatment of primary tumors and reprogramming altered immune cells.

Key words: uveal melanoma, immunohistochemical study, lymphocyte subpopulations, macrophage antigens, proliferation index

For citation: Saakyan S.V., Katargina L.A., Myakoshina E.B. et al. Immunohistochemical study of uveal melanoma and its cellular microenvironment. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):97–104. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-97-104.

ВВЕДЕНИЕ

Уvealная меланома (УМ) — злокачественная опухоль, характеризующаяся ранним метастазированием [1]. В настоящее время большое внимание уделяется патогенетическим аспектам неопластического процесса [2, 3]. Одним из компонентов опухолевой прогрессии являются иммунокомпетентные клетки организма человека, перепрограммированные на рост и развитие новообразования [4, 5]. Роль опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в канцерогенезе изучается давно. Исследования продолжаются по настоящее время [6]. Терапевтические, иммуномодулирующие стратегии, нацеленные на ингибирование контрольных точек иммунитета, имеют важное значение в комбинированном лечении УМ [7]. В связи с этим изучение иммунобиологии ОИЛ с акцентом на субпопуляционный лимфоцитарный состав играют большую роль в поиске новых мишеней для противоопухолевой терапии.

Наличие в ткани УМ значительного количества опухоль-ассоциированных макрофагов (ОАМ) связано с неблагоприятным прогнозом [8]. По данным литературы, из существующих типов макрофагов проангиогенными и канцерогенными считаются макрофаги M2 [9]. Углубленное изучение ОАМ и ОИЛ дает возможность проанализировать патофизиологический механизм, связанный с наличием воспаления при УМ.

Идентификация пролиферации клеток УМ имеет важнейшее значение в выживаемости и прогнозе за-

болевания [10]. Ранее доказано, что высокий индекс клеточной пролиферации коррелирует с эпителиоидно-клеточным типом УМ и связан с более высоким риском развития метастатического поражения [11]. Анализ пролиферативной активности клеток УМ в совокупности с ОАМ и ОИЛ требует более глубокого изучения.

Цель исследования — изучить иммуногистохимические особенности УМ и ее клеточного микроокружения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы 24 энуклеированных глаза с УМ (144 гистологических и 216 иммуногистохимических препаратов) без предшествующего лечения. Возраст пациентов составил от 34 до 67 лет (в среднем $55 \pm 2,7$ года). Материал фиксировали 10 % нейтральным формалином и заливали в парафин по стандартной методике. Подготовка к патоморфологическим исследованиям включала микротомию и окрашивание парафиновых срезов (толщиной 5–6 мкм) гематоксилином, эозином и пикрофуксином по методу Ван-Гизона. Анализ гистологических препаратов выполняли с помощью микроскопической системы фирмы Leica DMRB2500 (Германия).

По данным патоморфологических исследований в 9 случаях наблюдалась эпителиоидно-клеточная УМ, в 9 — веретенклеточная типа АВ, в 6 — смешанно-

клеточная (рис. 1). Проминенция опухоли составила от 1,5 до 8,9 мм (в среднем $4,7 \pm 1,8$ мм), диаметр основания — от 1,5 до 24,5 мм (в среднем $13,4 \pm 3,3$ мм). Выявлены опухоли малых размеров (5 глаз), которые локализовались юстапапиллярно с вовлечением диска зрительного нерва, что потребовало энуклеации. Преобладали опухоли хориоидеи ($n = 20$). Опухоли иридоцилиохориоидальной зоны диагностировали у 4 пациентов. По степени пигментации меланомы были слабо ($n = 11$) или умеренно ($n = 13$) пигментированными.

Было определено наличие клеток иммунного микроокружения — лимфоцитов и макрофагов — в стро-ме меланомы и в 2–3 мм от нее. Количественный подсчет выполняли в 10 полях зрения при 400-кратном увеличении.

Иммуногистохимические (ИГХ) исследования включали определение в ткани УМ абсолютного и относительного состава субпопуляций лимфоцитов: Т-хелперов CD4+, Т-цитотоксических CD8+, натуральных киллеров CD16+ и CD56+, Т-цитотоксических CD28+, CD25+. Также выполняли анализ экспрессируемых макрофагами антигенов CD68+ и CD163+, выявляли способность к пролиферации опухолевых клеток (на основе индекса пролиферации Ki-67).

В ходе ИГХ-исследования применяли поликлональные (CD163, CD16, CD28) и моноклональные (CD4 (клон 4B12), CD8 (клон C8/144B), CD56 (клон 123C3), CD 68 (клон KP1), CD25 (клон IL2R. 1)) мышиные антитела к человеческим антигенам в рабочем разведении для использования в стейнере Avtosteiner Link 48 (Dako, Дания).

Для выявления маркера пролиферации клеток Ki-67 применяли моноклональные мышиные антитела к человеческим Ki-67 антигенам (клон MIB-1). Клеточный пролиферативный индекс экспрессии Ki-67 (MIB-1) вычисляли путем определения процентного соотношения Ki-67-положительных клеточных ядер меланомы к общему количеству ядер клеток опухоли, подсчитанных при 400-кратном увеличении. Подсчет

проводился для клеточной популяции, насчитывающей не менее 1 тыс. клеток (не менее чем в 2 случайных полях зрения). В качестве системы детекции использовали систему EnVisionFlex (Dako, Дания).

Были проанализированы 216 ИГХ-препаратов. Для каждого случая изготавливали срезы толщиной 4 мкм для нанесения первичных антител и реагента негативного контроля. После депарафинизации и демаскировки антигенов ИГХ-исследование проводили в автоматическом режиме в автостейнере Dako-Link 48.

Анализировали срезы с ИГХ-реакцией, оценивали количество положительно окрашенных иммунных клеток и определяли их долю от общего числа иммунных клеток в 10 полях зрения. Положительным считали точечное или линейное, темно-коричневое, полное или частичное мембранное окрашивание клеток.

Статистические расчеты проводили в пакетах программ для Windows (Microsoft Excel, Statistica 12.5). Применяли t-критерий Стьюдента, критерии Фишера и χ^2 , уровень статистической значимости ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Согласно результатам патоморфологических исследований во всех образцах ткани УМ в микроокружении опухолевых клеток наблюдались лимфоциты. Они представляли собой клетки округлой формы с наличием круглого ядра и светлой узкой цитоплазмы (рис. 2, а). Иммуногистохимическое исследование выявило наличие различных субпопуляций лимфоцитов в микроокружении УМ. При этом большую их часть составили Т-цитотоксические CD28+-лимфоциты (абсолютное количество положительно окрашенных клеток — $607,3 \pm 431,2$; относительное количество — $18,84 \pm 12,12$ %) ($p = 0,018$) (рис. 2, б).

Меньшими долями, но в равном соотношении, были представлены Т-хелперы CD4+, Т-цитотоксические CD8+- (рис. 2в, г) и CD25+- (рис. 2, д) лимфоциты. Их абсолютное количество составило $387,6 \pm 362,5$; $409,4 \pm 383,9$ и $371,9 \pm 332,6$ положительно

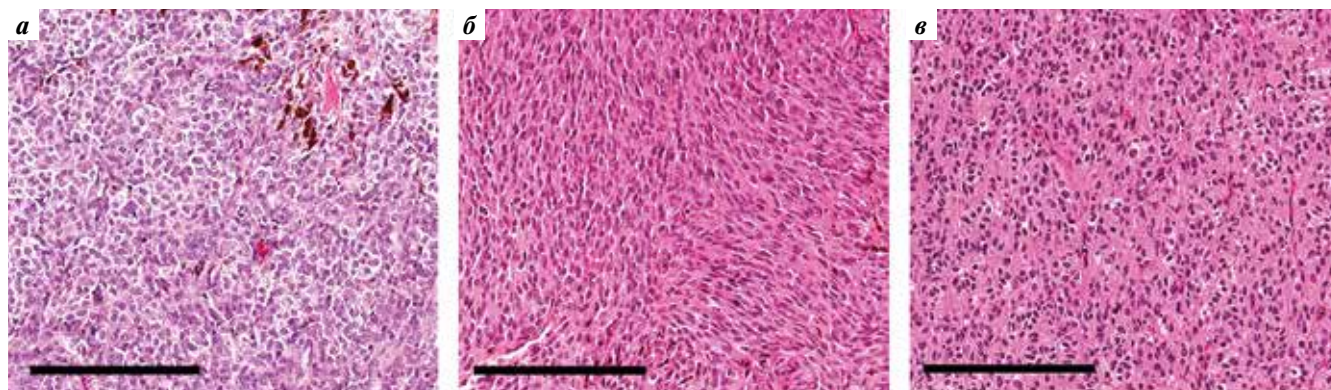


Рис. 1. Патоморфологические типы увеальной меланомы: а — эпителиоидно-клеточный; б — веретенноклеточный; в — смешанно-клеточный. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$. Шкала 200 мкм

Fig. 1. Pathomorphological types of uveal melanoma: а — epithelioid cell; б — spindle cell; в — mixed cell. Stained with hematoxylin and eosin. $\times 100$. Scale 200 microns

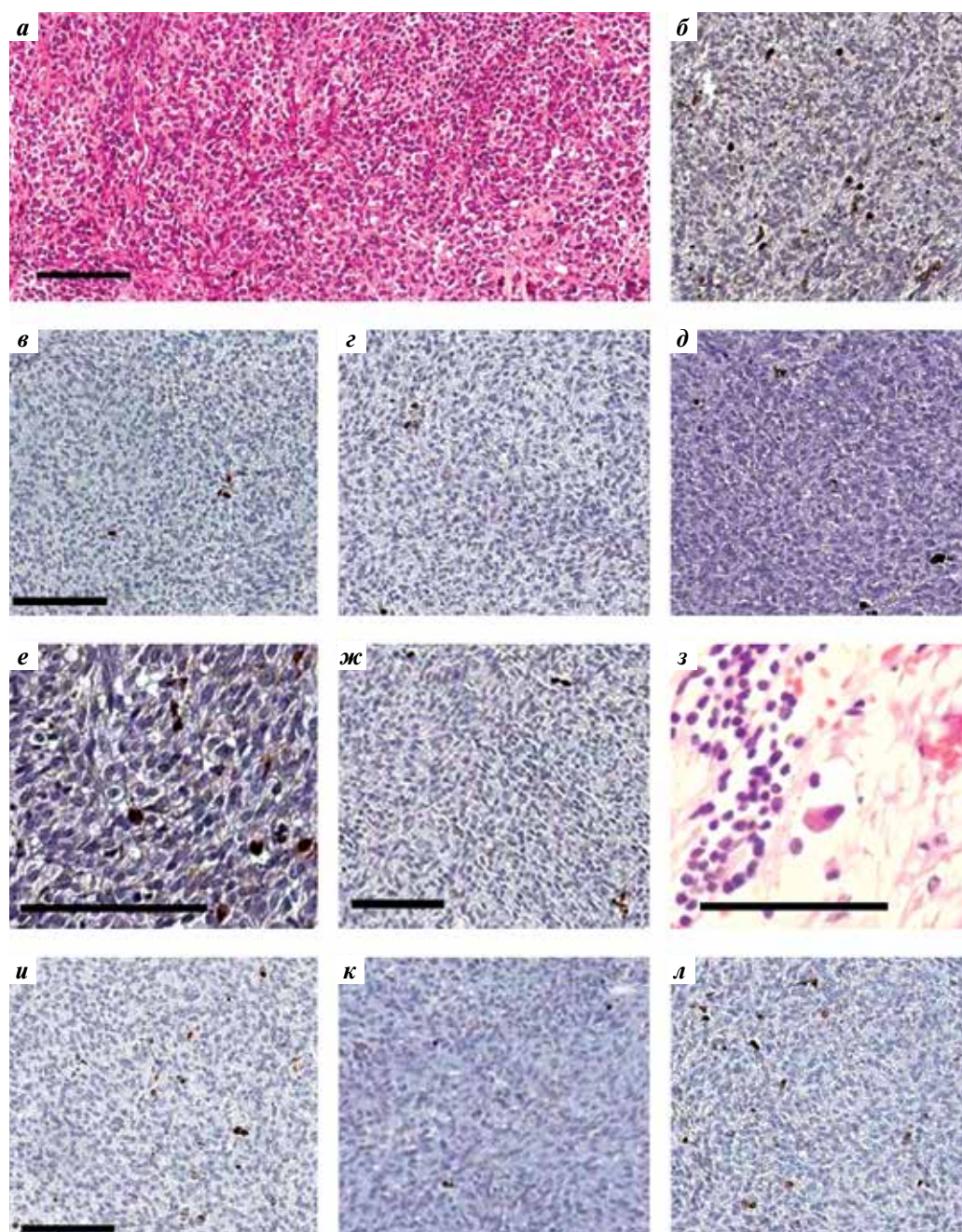


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование образцов увеальной меланомы (УМ): а – лимфоидный инфильтрат в ткани УМ (окраска гематоксилином и эозином; $\times 100$); б – положительная иммуногистохимическая (ИГХ) реакция с антителами CD28 для выявления Т-цитотоксических CD28⁺-лимфоцитов в ткани УМ ($\times 100$); в – положительная ИГХ-реакция с антителами CD4 для выявления Т-хелперов CD4⁺-лимфоцитов в ткани УМ ($\times 100$); г – положительная ИГХ-реакция с антителами CD8 для выявления Т-цитотоксических CD8⁺-лимфоцитов в ткани УМ ($\times 100$); д – положительная ИГХ-реакция с антителами CD25 для выявления CD25⁺-лимфоцитов в ткани УМ ($\times 100$); е – положительная ИГХ-реакция с антителами CD16 для выявления натуральных киллеров CD16⁺ в ткани УМ ($\times 200$); ж – положительная ИГХ-реакция с антителами CD56 для выявления натуральных киллеров CD56⁺ в ткани УМ ($\times 100$); з – макрофаг в ткани УМ (окраска гематоксилином и эозином; $\times 200$); и – положительная ИГХ-реакция с антителами CD68 для выявления макрофагов CD68⁺ в ткани УМ ($\times 100$); к – положительная ИГХ-реакция с антителами CD163 для выявления макрофагов CD163⁺ в ткани УМ; л – положительная ИГХ-реакция с антителами к белку пролиферации Ki-67 в ткани УМ ($\times 100$). Шкала 100 мкм

Fig. 2. Immunohistochemical study of uveal melanoma (UM) samples: а – lymphoid infiltrate in the UM tissue (staining with hematoxylin and eosin; $\times 100$); б – positive immunohistochemical (IHC) reaction with antibodies CD28 for the detection of T-cytotoxic CD28⁺ lymphocytes in the tissue UM ($\times 100$); в – positive IHC reaction with antibodies CD4 for the detection of T-helpers CD4⁺ lymphocytes in the tissue UM ($\times 100$); г – positive IHC reaction with CD8 antibodies to detect T-cytotoxic CD8⁺ lymphocytes in the UM tissue ($\times 100$); д – positive IHC reaction with antibodies CD25 for the detection of CD25⁺ lymphocytes of tissue UM ($\times 100$); е – positive IHC reaction with antibodies CD16 for the detection of natural killer cells CD16⁺ in the tissue UM ($\times 200$); ж – positive IHC reaction with antibodies CD56 for the detection of natural killer cells CD56⁺ in the tissue UM ($\times 100$); з – macrophage in the tissue UM ($\times 300$; staining with hematoxylin and eosin); и – positive IHC reaction with antibodies CD68 for the detection of macrophages CD68⁺ in the tissue UM ($\times 100$); к – positive IHC reaction with antibodies CD163 for the detection of macrophages CD163⁺ in the tissue of the UM ($\times 100$); л – positive IHC reaction with antibodies to the proliferation protein Ki-67 in the UM tissue ($\times 100$). Scale 100 microns

Таблица 1. Иммуногистохимическое исследование субпопуляций лимфоцитов в ткани увеальной меланомы

Table 1. Immunohistochemical study of lymphocyte subpopulations in uveal melanoma tissue

Субпопуляция лимфоцитов Lymphocyte subpopulation	Абсолютное количество положительно окрашенных клеток субпопуляций лимфоцитов, M ± m (мин.—макс.) Absolute number of lymphocyte subpopulations, M ± m (min—max)	Относительное количество субпопуляций лимфоцитов (%), M ± m, (мин.—макс.) Relative number of lymphocyte subpopulations, %, M ± m (min—max)
Т-хелперы CD4+ T-helpers CD4+	387,6 ± 362,5 (5–2500)	8,18 ± 4,45 (2,80–20,91)
Т-цитотоксические CD8+ T-cytotoxic CD8+	409,4 ± 383,9 (3–1600)	7,59 ± 4,96 (0–16,26)
Т-цитотоксические CD28+ T-cytotoxic CD28+	607,3 ± 431,2 (11–1920)	18,84 ± 12,12 (3,17;42,02)
CD25+	371,9 ± 332,6 (5–1800)	8,19 ± 4,52 (2,59–17,36)
Натуральные киллеры CD16+ Natural killers CD16+	394,3 ± 387,1 (4–1520)	9,77 ± 6,07 (1,84–25,04)
Натуральные киллеры CD56+ Natural killers CD56+	466,8 ± 436,6 (2–1600)	9,02 ± 4,71 (1,12–14,93)

Таблица 2. Иммуногистохимическое исследование экспрессируемых макрофагами антигенов CD68+ и CD163+ в ткани увеальной меланомы

Table 2. Immunohistochemical study of CD68+ and CD163+ antigens expressed by macrophages in uveal melanoma tissue

Вид макрофагов Type of macrophages	Абсолютное количество различных видов макрофагов положительно окрашенных клеток, M ± m (мин.—макс.) The absolute number of different types of macrophages in uveal melanoma tissue, M ± m (min—max)	Относительное количество различных видов макрофагов, %, M ± m (мин.—макс.) Relative content of different types of macrophages in the uveal melanoma tissue, %, M ± m (min—max)
M2-макрофаги CD68+ M2 macrophages CD68+	457,2 ± 381,8 (4–1530)	10,52 ± 5,58 (1,67–24,59)
M2-макрофаги CD163+ M2 macrophages CD163+	461,6 ± 376,9 (4–2100)	11,20 ± 7,89 (0–30,61)

окрашенных клеток соответственно, относительное количество — $8,18 \pm 4,45$; $7,59 \pm 4,96$ и $8,19 \pm 4,52$ % соответственно ($p = 0,6$).

Анализ 2 субпопуляций натуральных киллеров CD16+ и CD56+ показал, что абсолютное количество CD16+ оказалось ниже по сравнению с CD56+ ($p = 0,05$) (рис. 2, е, ж; табл. 1). Однако отмечено отсутствие статистически значимых различий в относительном количестве этих субпопуляций ($p = 0,9$).

Гистологическое исследование выявило наличие в микроокружении ткани УМ макрофагов. При окраске гематоксилином и эозином они представляли собой клетки небольших размеров, как правило, овальной формы с четкими границами и глубокими складками оболочки с эксцентрично расположенным ядром (рис. 2з). Согласно данным ИГХ-исследования экспрессируемых противовоспалительными и проопухолевыми макрофагами антигенов CD68+ и CD163+ их абсолютное и относительное содержание в ткани УМ было практически одинаковым, с небольшим преобладанием CD163+ ($p = 0,7$) (рис. 2, и, к; табл. 2).

В ходе ИГХ-исследования о наличии белка пролиферации Ki-67 в ядрах клеток меланомы свидетельствовало коричневое окрашивание на фоне светло-голубых опухолевых клеток (рис. 2л). В 10 полях зрения выявлено в среднем $575,2 \pm 388,5$ значимых клеток. Это составило $16,69 \pm 10,88$ % относительного количества опухолевых клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Увеальная меланوما — злокачественная опухоль, в патогенезе которой большую роль играют молекулярно-генетические мутации, запускающие неадекватный иммунный ответ организма [12]. Злокачественный неопластический процесс приводит к метастазированию [13]. Несмотря на то, что существуют различные стратегии лечения УВ, ни одна из них не показала увеличения показателей общей выживаемости [14–16]. Это обуславливает необходимость поиска новых терапевтических мишеней.

Исследованию «воспалительного» клеточного микроокружения опухоли посвящен ряд работ [17–19].

Большую роль в неоангиогенезе, пролиферации, прогрессировании новообразования и неблагоприятном витальном прогнозе при УМ играет наличие лимфоцитарного и макрофагального инфильтратов [20–24]. В связи с этим особое внимание уделяют иммунофенотипированию лимфоцитарного инфильтрата в микроокружении опухоли [25]. По мнению ученых, инфильтрация ткани меланомы CD4+ и CD8+-Т-лимфоцитами оказывает прямое цитотоксическое воздействие на клетки опухоли [26]. По данным литературы проангиогенными и канцерогенными свойствами обладают макрофаги M2 [9]. Некоторые исследователи считают, что наличие в ткани УМ значительного количества опухоль-инфильтрирующих макрофагов связано с неблагоприятным прогнозом [8]. Содержание в ткани меланомы макрофагов CD68+ подтверждено, хотя их значимость в витальном прогнозе разноречива [27].

Наши комплексные ИГХ-исследования, проведенные впервые в России, показали наличие ОИЛ и ОАМ во всех изученных образцах слабо и умеренно пигментированных форм первичной УМ. Было выявлено, что в основном встречаются CD28+-лимфоциты, реже – Т-хелперы CD4+, Т-цитотоксические CD8+- и CD25+-лимфоциты (в равном соотношении). Также в микроокружении опухоли обнаружено больше CD56+ натуральных киллеров по сравнению с CD16+. Иммуногистохимическое исследование макрофагов показало практически одинаковое содержание CD68+ и CD163+.

Ранними событиями канцерогенеза являются нарушение механизмов пролиферации и апоптоза клеток

[25]. Одним из методов определения пролиферативной активности опухоли служит подсчет индекса Ki-67 [28]. Его пограничные значения различаются в зависимости от локализации опухоли. В случае меланоцитарных новообразований индекс Ki-67 менее 10 % свидетельствует о низком уровне пролиферации, 10–20 % – о пограничном уровне, более 20 % – о высоком уровне [28]. Иммунореактивность Ki-67 коррелирует с доброкачественностью или злокачественностью меланоцитарных поражений [29]. Проведенное ИГХ-исследование показало наличие $16,69 \pm 10,88$ % клеток с положительной реакцией с Ki-67 в ткани УМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммуногистохимическое исследование позволило выявить в ткани слабо и умеренно пигментированной УМ наличие субпопуляций лимфоцитов со значительным преобладанием Т-цитотоксических CD28+-лимфоцитов. Наблюдалось практически одинаковое количество экспрессируемых противовоспалительными и проопухолевыми макрофагами антигенов CD68+ и CD163+. Иммуногистохимическое исследование белка пролиферации Ki-67 в ядрах клеток меланомы показало, что он содержится в $16,69 \pm 10,88$ % опухолевых клеток. Полученные данные позволяют в дальнейшем оценить значимость отдельных иммунных клеток (в частности, субпопуляции Т-цитотоксических CD28+-лимфоцитов) в патогенезе УМ с целью разработки таргетного воздействия, обоснования новых иммунотерапевтических подходов к лечению первичной опухоли и перепрограммирования измененных иммунных клеток.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бровкина А.Ф., Панова И.Е., Саакян С.В. Офтальмоонкология: новое за последние два десятилетия. Вестник офтальмологии 2014;130(6):13–9. [Brovkina A.F., Panova I.E., Saakyan S.V. Ophthalmic oncology: new over the past two decades. Vestnik oftal'mologii = Ophthalmology bulletin 2014;130(6): 13–9. (In Russ.)].
2. Саакян С.В., Балацкая Н.В., Катаргина Л.А. и др. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при увеальной меланоме. Медицинская иммунология 2019;21(4):765–72. [Saakyan S.V., Balatskaya N.V., Katargina L.A. et al. Subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in uveal melanoma. Meditsinskaya immunologiya = Medical immunology 2019;21(4):765–72. (In Russ.)].
3. Саакян С.В., Амирян А.Г., Цыганков А.Ю. и др. Клинические, патоморфологические и молекулярно-генетические особенности увеальной меланомы с высоким риском метастазирования. Российский офтальмологический журнал 2015;8(2):47–52. [Saakyan S.V., Amiryani A.G., Tsyganov A.Yu. et al. Clinical, pathological and molecular genetic features of uveal melanoma with a high risk of metastasis. Rossiyskiy oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal 2015;8(2):47–52. (In Russ.)].
4. Fidler I.J., Kim S.J., Langley R.R. The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis. J. Cell Biochem 2007;101(4): 927–36. DOI: 10.1002/jcb.21148.
5. Саакян С.В., Захарова Г.П., Мякошина Е.Б. Тучные клетки в микроокружении увеальной меланомы. Архив патологии 2019;81(6):63–70. [Saakyan S.V., Zakharova G.P., Myakoshina E.B. Mast cells in the microenvironment of uveal melanoma. Arkhiv patologii = Archive of pathology 2019;81(6):63–70. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/patol20198106163.
6. Johansson J., Siarov J., Kiffin R. et al. Presence of tumor-infiltrating CD8+ T cells and macrophages correlates to longer overall survival in patients undergoing isolated hepatic perfusion for uveal melanoma liver metastasis. Oncoimmunology 2020;10(9):1854519. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1854519.
7. Lee N., Zakka L.R., Mihm M.C. Jr. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes in melanoma prognosis and cancer

- immunotherapy. *Pathology* 2016;48(2):177–87. DOI: 10.1016/j.pathol.2015.12.006.
8. Bronkhorst I.H., Ly L.V., Jordanova E.S. et al. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;3:52(2):643–50. DOI: 10.1167/iov.10-5979.
 9. Toivonen P., Mäkitie T., Kujala E. et al. Microcirculation and tumor-infiltrating macrophages in choroidal and ciliary body melanoma and corresponding metastases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(1):1–6. DOI: 10.1167/iov.03-0622.
 10. Mooy C.M., de Jong P.T., Van der Kwast T.H. et al. Ki-67 immunostaining in uveal melanoma. The effect of pre-enucleation radiotherapy. *Ophthalmology* 1990;97(10):1275–80. DOI: 10.1016/s0161-6420(90)32420-x.
 11. Al-Jamal R.T., Kivelä T. Ki-67 immunopositivity in choroidal and ciliary body melanoma with respect to nucleolar diameter and other prognostic factors. *Curr Eye Res* 2006;31(1):57–67. DOI: 10.1080/02713680500478535.
 12. Tian T., Olson S., Whitacre J. et al. The origins of cancer robustness and evolvability. *Integr Biol* 2011;3(1):17–30. DOI: 10.1039/c0ib00046a.
 13. Lane A.M., Kim I.K., Gragoudas E.S. Survival rates in patients after treatment for metastasis from uveal melanoma. *JAMA Ophthalmol* 2018;136(9):981–6. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2018.2466.
 14. Rantala E.S., Hernberg M., Kivela T.T. Overall survival after treatment for metastatic uveal melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Melanoma Res* 2019;29(6):561–8. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000575.
 15. Hept M.V., Heinzerling L., Kähler K.C. et al. Prognostic factors and outcomes in metastatic uveal melanoma treated with programmed cell death-1 or combined PD-1/cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 inhibition. *Eur J Cancer* 2017;82:56–65. DOI: 10.1016/j.ejca.2017.05.038.
 16. Roma-Rodrigues C., Mendes R., Baptista P.V. et al. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2019;20(4):840. DOI: 10.3390/ijms20040840.
 17. Bronkhorst I.H.G., Jager M.J. Uveal melanoma: the inflammatory microenvironment. *J Innate Immun* 2012;4:454–62. DOI: 10.1159/000334576.
 18. Саакян С.В., Захарова Г.П., Мякошина Е.Б. Клеточное микроокружение увеальной меланомы: клинико-морфологические корреляции и предикторы неблагоприятного прогноза. *Молекулярная медицина* 2020;18(3):27–33. [Saakyan S.V., Zakharova G.P., Myakoshina E.B. Cellular micro-environment of uveal melanoma: clinical and morphological correlations and predictors of poor prognosis. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine* 2020;18(3):27–33. (In Russ.)]. DOI: 10.29296/24999490-2020-03-04.
 19. Франк Г.А., Кузнецова О.А., Завалишина Л.Э. и др. Исследование PD-L1-статуса рака молочной железы с использованием моноклонального антитела SP142 и перспективы для определения лечебной тактики. *Архив патологии* 2019;81(5):5–10. [Frank G.A., Kuznetsova O.A., Zavalishina L.E. et al. Investigation of PD-L1-status of breast cancer using monoclonal antibody SP142 and prospects for determining therapeutic tactics. *Arkhiv patologii = Archive of pathology* 2019;81(5):5–10. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/patol2019810515.
 20. Oble D.A., Loewe R., Yu P. et al. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun* 2009;9(1):3.
 21. McLean I.W., Saraiva V.S., Burnier M.N. Pathological and prognostic features of uveal melanomas. *Can J Ophthalmol* 2004;39:343–50. DOI: 10.1016/s0008-4182(04)80004-8.
 22. Qin Y., Bollin K., Petaccia de Macedo M. et al. Immune profiling of uveal melanoma identifies a potential signature associated with response to immunotherapy. *J Immunother Cancer* 2020;8(2):e000960. DOI: 10.1136/jitc-2020-000960.
 23. Krishna Y., McCarthy C., Kalirai H. et al. Inflammatory cell infiltrates in advanced metastatic uveal melanoma. *Human Pathology* 2017;66:159–66. DOI: 10.1016/j.humpath.2017.06.005.
 24. Ly L.V., Bronkhorst I.H.G., van Beelen E. et al. Inflammatory cytokines in eyes with uveal melanoma and relation with macrophage infiltration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(11):5445–51. DOI: 10.1167/iov.10-5526.
 25. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420(6917):860–7. DOI: 10.1038/nature01322.
 26. Tobal K., Deuble K., McCartney A. et al. Characterization of cellular infiltration in choroidal melanoma. *Melanoma Res* 1993;3(1):63–5. DOI: 10.1097/00008390-199304000-00009.
 27. Mantovani A. Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines. *Lab Invest* 1994;71(1):5–16.
 28. Sun X., Kaufman P.D. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma* 2018;127(2):175–86. DOI: 10.1007/s00412-018-0659-8.
 29. Новикова И.А., Максимова Н.А., Позднякова В.В. и др. Некоторые иммуногистохимические особенности меланоцитарных образований кожи. *Современные проблемы науки и образования* 2016;5:1–8. [Novikova I.A., Maksimova N.A., Pozdnyakova V.V. et al. Some immunohistochemical features of skin melanocytic formations. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education* 2016;5:1–8. (In Russ.)].

Благодарность. Авторы выражают благодарность д.м.н., профессору, академику РАН, заслуженному деятелю науки Российской Федерации Г.А. Франку и д.б.н., профессору кафедры патологической анатомии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России Л.Э. Завалишиной за помощь в проведении исследований, научное консультирование и научное редактирование статьи.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to G.A. Frank, MD, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Honored Scientist of the Russian Federation, and L.E. Zavalishina, PhD, Professor of the Department of Pathological Anatomy of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia for assistance in conducting research and scientific consulting and scientific editing of the article.

Вклад авторов

С.В. Саакян, Л.А. Катаргина, И.П. Хорошилова—Маслова: разработка концепции и дизайна исследования;

Е.Б. Мякошина: разработка концепции и дизайна исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка полученных данных, написание текста статьи, редактирование статьи;

Г.П. Захарова: разработка концепции и дизайна исследования, сбор и обработка материала, редактирование статьи;

А.М. Майбогин: редактирование статьи.

Authors' contribution

S.V. Sahakyan, L.A. Katargina, I.P. Khoroshilova–Maslova: development of the concept and design of the study;

E.B. Myakoshina: development of the concept and design of the study, collection and processing of the material, statistical processing of the data obtained, article writing, article editing;

G.P. Zakharova: development of the concept and design of the study, collection and processing of material, article editing;

A.M. Maybogin: article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.В. Саакян / S.V. Saakyan: <https://orcid.org/0000-0001-8591-428X>

Л.А. Катаргина / L.A. Katargina: <https://orcid.org/0000-0002-4857-0374>

Е.Б. Мякошина / E.B. Myakoshina: <https://orcid.org/0000-0002-2087-7155>

Г.П. Захарова / G.P. Zakharova: <https://orcid.org/0000-0002-0824-534X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients gave written informed consent to participate in the study.

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-105-110



Первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома с редкой мутацией в гене *ALK*

О.И. Кит, И.А. Камаева, И.Б. Лысенко, И.А. Новикова, Н.Н. Тимошкина, Н.В. Николаева, Я.С. Гайсултанова, Н.Ю. Саманева, А.А. Пушкин

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037 Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63

Контакты: Инна Анатольевна Камаева inkamaeva@yandex.ru

Введение. Первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома представляет собой агрессивный вариант лимфомы, характеризующийся генетической гетерогенностью. В 1-й линии лечения данной патологии принято проводить иммунохимиотерапию. Однако, несмотря на успехи в лечении первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы, есть большая группа пациентов, рефрактерных к терапии.

Цель исследования – оценка особенностей клинического течения первично рефрактерной первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы с учетом данных таргетного секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS).

Материалы и методы. Пациентке, 22 лет, с первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой, у которой не наблюдалось эффекта от иммунохимиотерапии, выполнено таргетное секвенирование нового поколения с использованием панели из 77 генов.

Результаты. В ходе таргетного секвенирования нового поколения выявлены 2 редких варианта мутаций в гене *ALK* с неясным клиническим значением. Согласно данным литературы они встречаются преимущественно в солидных опухолях.

Заключение. Выявленные миссенс-мутации в гене *ALK*, возможно, связаны с особенностью течения первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы, в частности с первичной рефрактерностью к проводимому лечению.

Ключевые слова: первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома, таргетное секвенирование нового поколения, первично рефрактерное течение заболевания

Для цитирования: Кит О.И., Камаева И.А., Лысенко И.Б. и др. Первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома с редкой мутацией в гене *ALK*. Успехи молекулярной онкологии 2021;9(2):105–110. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-105-110.

Primary mediastinal large B-cell lymphoma with a rare *ALK* gene mutation

O.I. Kit, I.A. Kamaeva, I.B. Lysenko, I.A. Novikova, N.N. Timoshkina, N.V. Nikolaeva, Ya.S. Gaisultanova, N. Yu. Khamaneva, A.A. Pushkin

National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14th Liniya St., Rostov-on-Don 344037, Russia

Contacts: Inna Anatolyevna Kamaeva inkamaeva@yandex.ru

Introduction. Primary mediastinal large B-cell lymphoma is an aggressive variant of lymphoma characterized by genetic heterogeneity. First-time therapy for primary mediastinal large B-cell lymphoma usually includes immunochemotherapy. However, a substantial proportion of patients do not respond to this therapy.

Objective – to analyze clinical characteristics of primary refractory primary mediastinal large B-cell lymphoma taking into account the results of targeted next-generation sequencing (NGS).

Materials and methods. A 22-year-old patient with primary mediastinal large B-cell lymphoma who had not responded to immunochemotherapy was tested using targeted NGS for 77 genes.

Results. We identified 2 rare mutations in the *ALK* gene with an unclear clinical value. According to the literature, these mutations are primarily found in solid tumors.

Conclusion. Missense mutations identified in the *ALK* gene are presumably associated with the course of primary mediastinal large B-cell lymphoma, in particular, with primary refractory disease.

Key words: primary mediastinal large B-cell lymphoma, targeted next-generation sequencing, primary refractory disease

For citation: Kit O.I., Kamaeva I.A., Lysenko I.B. et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma with a rare *ALK* gene mutation. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2021;9(2):105–10. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-105-110.

ВВЕДЕНИЕ

Первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома (ПМБКЛ) представляет собой тип агрессивной лимфомы, которая часто встречается у молодых пациентов. Несмотря на успехи в лечении данной патологии, у трети больных наблюдается первично рефрактерное и рецидивирующее течение ПМБКЛ [1, 2]. Одним из важнейших патогенетических механизмов развития этого заболевания является генетическая нестабильность опухоли. В литературе описаны генетические сходства ПМБКЛ с другими лимфомами, такими как лимфома Ходжкина, диффузная В-крупноклеточная лимфома, однако четких представлений о молекулярно-генетическом профиле данной патологии на сегодняшний день нет.

В связи с отсутствием структурированных данных о молекулярной картине ПМБКЛ и наличием большого числа пациентов, у которых не наблюдается эффекта от лечения, возникает необходимость поиска новых методов диагностики этого заболевания, а также потенциальных мишеней для дальнейшей разработки подходов к таргетной терапии.

Цель исследования — оценка особенностей клинического течения первично рефрактерной ПМБКЛ с учетом данных таргетного секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были проанализированы данные пациентки, поступившей в гематологическое отделение ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России (Ростов-на-Дону). Пациентка, 22 лет, с диагнозом ПМБКЛ с поражением периферических (надключичных) лимфатических узлов (ЛУ) справа, внутригрудных ЛУ (bulky disease), легочной ткани с 2 сторон, молочной железы справа, стадия IVB, международный прогностический индекс — 2. Риск раннего прогрессирования был оценен как высокий/промежуточный. После проведения 6 курсов полихимиотерапии было выявлено первично рефрактерное течение ПМБКЛ. Наследственность онкологическими заболеваниями неотягощена.

Опухолевый биоптат исследован методом таргетного NGS с помощью секвенатора Illumina NextSeq 550 со средним покрытием не менее 1000x с применением таргетной панели AVENIO Tumor Expanded Panel, (Roche, США), включающей в себя 77 генов. Аналитическая чувствительность детекции мутаций составила 5 %. Патогенность выявленных нуклеотидных замен оценивали согласно рекомендациям Американской коллегии медицинской генетики и геномики (American College of Medical Genetics and Genomics,

ACMG) и Ассоциации молекулярной патологии (Association of Molecular Pathology, AMP) [3].

Выделение геномной ДНК из FFPE-блоков проводили с использованием панели Gene Read DNA FFPE Kit (Qiagen, США) согласно официальному протоколу. Концентрацию ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Life Technologies, США). Для обработки данных (поиска клинически значимых мутаций) использовали программное обеспечение AVENIO Oncology Analysis Software. Проведено исследование генетического материала на наличие клинически значимых мутаций, содержащихся в известных базах данных: COSMIC v83, TCGA 9.0, ExAC v1.0, dbSNP v150, 1000 Genomes Phase 3, SnpEff 4.2.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При поступлении в гематологическое отделение ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России (Ростов-на-Дону) состояние пациентки было тяжелым: наблюдались синдром сдавления верхней полой вены, дыхательная недостаточность III стадии. Оценка по шкале Восточной кооперативной группы исследования рака (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG) составила 2 балла (сохранена способность к самостоятельному обслуживанию, однако большую часть бодрствования больная проводит лежа).

При осмотре на передней поверхности грудной клетки наблюдались усиление сосудистого рисунка, синюшность и бледность кожных покровов. Согласно результатам спиральной компьютерной томографии органов грудной клетки и брюшной полости в легочной ткани с обеих сторон выявлены множественные инфильтраты и очаги размером до 32 мм, увеличение надключичных ЛУ справа (до 24 мм), внутригрудных ЛУ (в переднем средостении — конгломерат размерами 115 × 73 × 143 мм), сдавливающих трахею, сужение просвета главных бронхов до 3 мм. Гидроперикард до 60 мл, печень и селезенка не увеличены, объемных образований в брюшной полости не обнаружено.

По данным ультразвукового исследования молочных желез в верхнем наружном квадранте правой молочной железы обнаружено изоэхогенное образование размерами 16 × 13 мм с ровным контуром. Подкрыльцовые ЛУ слева размером до 20 мм, справа — до 26 мм. Выполнена трепанобиопсия ткани правой молочной железы. Гистологическое заключение: морфологическая картина в объеме трепанобиоптатов ткани молочной железы более всего характерна для неходжкинской лимфомы.

В отделении торакальной хирургии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр

онкологии» Минздрава России (Ростов-на-Дону) выполнена трансторакальная пункция конгломерата, расположенного в средостении. Морфологическая картина соответствовала ПМБКЛ с поражением ткани молочной железы (CD20+, Bcl-6+, MUM1+, CD30+, panCK—).

В отделении онкогематологии пациентка получила лечение по схеме DA-EPOCH-R (ритуксимаб в дозе 375 мг/м² внутривенно капельно в 0-й день все циклы курса или 1 цикл, далее ритуксимаб в дозе 1400 мг подкожно в 0-й день, этопозид в дозе 50 мг/м²/сут внутривенно в 1–4-й дни (непрерывная 96-часовая инфузия), доксорубин в дозе 10 мг/м²/сут внутривенно в 1–4-й дни (непрерывная 96-часовая инфузия), винкристин в дозе 0,4 мг/м²/сут внутривенно в 1–4-й дни (непрерывная 96-часовая инфузия), циклофосфамид в дозе 750 мг/м² внутривенно в 5-й день, преднизолон в дозе 60 мг/м² 2 раза в сутки внутрь в 1–5-й дни, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) в дозе 5 мкг/кг подкожно, начиная с 6-го дня и продолжая до достижения абсолютного уровня нейтрофилов (более чем $0,5 \times 10^9$ /л). Лечение возобновилось на 22-й день.

В ходе химиотерапии у пациентки наблюдались явления гематологической токсичности, нейтропения II–III степени, купирующаяся введением препаратов Г-КСФ. После проведения 6 курсов выполнена позитронная эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией. Согласно полученным данным в обоих легких определяются объемные образования, расположенные субплеврально, с высоким уровнем захвата радиофармпрепарата (standardized uptake value, SUV): максимальный SUV — 14,4 (SUV печени — 1,54, SUV крови — 0,62). В клетчатке переднего средостения определяется метаболически активное объемное образование размерами до 151 × 133 мм (SUV = 17,7), отесняющее анатомические структуры. Также выявлены образования в области молочной железы справа размерами 17 × 23 мм с высоким уровнем метаболической активности, поражение внутригрудных ЛУ и легких. Результат лечения соответствовал 5 баллам по шкале визуальной оценки Deauville, что свидетельствует о первично рефрактерном течении заболевания.

В ходе лечения было решено включить пациентку в исследование генетического профиля ПМБКЛ с помощью таргетного NGS. В образце ДНК, выделенной из ткани опухоли, обнаружены 2 однонуклеотидных полиморфизма гена *ALK* — с.3542G>A (p.Arg1181His) и с.422G>A (p.Arg141His) — rs1034835558, которые локализовались в 23-м и 5-м экзонах соответственно. Общая частота аллелей составила 23,47 %.

Согласно результатам более раннего исследования [4] вариант *ALK* p.Arg1181His (с.3542G>A), расположенный внутри протеинкиназного домена гена *ALK*, был идентифицирован в ходе NGS аденокарциномы поджелудочной железы 50 пациентов с резистент-

ностью к химиотерапии. Авторы, основываясь на локализации миссенс-мутации, предположили ее значимость для онкогенеза. Однако в ходе исследования вариант не был охарактеризован, и его влияние на функцию белка *ALK* неизвестно. Согласно данным литературы у пациентов с ПМБКЛ данная мутация не выявлена.

Миссенс-вариант rs1034835558 зарегистрирован в базе данных соматических мутаций COSMIC (COSM6226578) для рака шейки матки, толстой кишки и поджелудочной железы. В базе VarSome также есть описание данной мутации при нейробластоме. В то же время ранее она не была зафиксирована у пациентов с ПМБКЛ. В базах данных ClinVar и VarSome этот полиморфный вариант характеризуется как мутация с неопределенным клиническим значением. Согласно Genome Aggregation Database (GnomAD_exome) rs1034835558 является чрезвычайно редким событием в популяции (1/251 324). При скрининге меньшей выборки, результаты которого приведены в базе ALFA, полиморфизм не был зарегистрирован (0/10680).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ген *ALK*, кодирующий тирозинкиназный рецептор, расположен на 2-й хромосоме в локусе 2p23. Схема сигнального пути *ALK* (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase — киназы анапластической лимфомы) представлена на рисунке. Несмотря на широкое использование рецептора *ALK* в качестве мишени для таргетной терапии, функции этого фермента до конца неясны. Данный рецептор активно экспрессируется на ранней стадии эмбриогенеза, предположительно, помогая регулировать пролиферацию нервных клеток. Было обнаружено, что ген *ALK* претерпевает aberrantные изменения в ряде опухолей, включая анапластические крупноклеточные лимфомы, нейробластому и мелкоклеточный рак легких (НМРЛ). Хромосомные перестройки *ALK* являются наиболее распространенными генетическими изменениями [5]. Молекулярно-генетическое исследование наличия мутации в генах *EGFR*, *ALK* и *ROS* входит в стандарт обследования пациентов с НМРЛ в связи с наличием ряда препаратов, направленных на ингибирование соответствующих целей. При этом считается, что аденокарциномы легких с транслокацией *ALK* чаще встречаются у пациентов среднего возраста и некурящих людей. Согласно морфологическим данным в основном опухоли имели крибриформное и перстневидное строение с обилием муцина [6, 7]. Мутации в гене *EGFR* и слияние генов *ALK* и *RET* могут считаться прогностическими факторами метастазирования в мозг у пациентов с НМРЛ.

Н. Majewska и соавт. (2021) исследовали статус *ALK* у пациентов с раком слюнных желез [10]. Как и при НМРЛ, в случае внутрипротоковой карциномы наблюдались крибриформный вариант архитектурного строения опухоли и очаговая муцинозная дифференцировка.

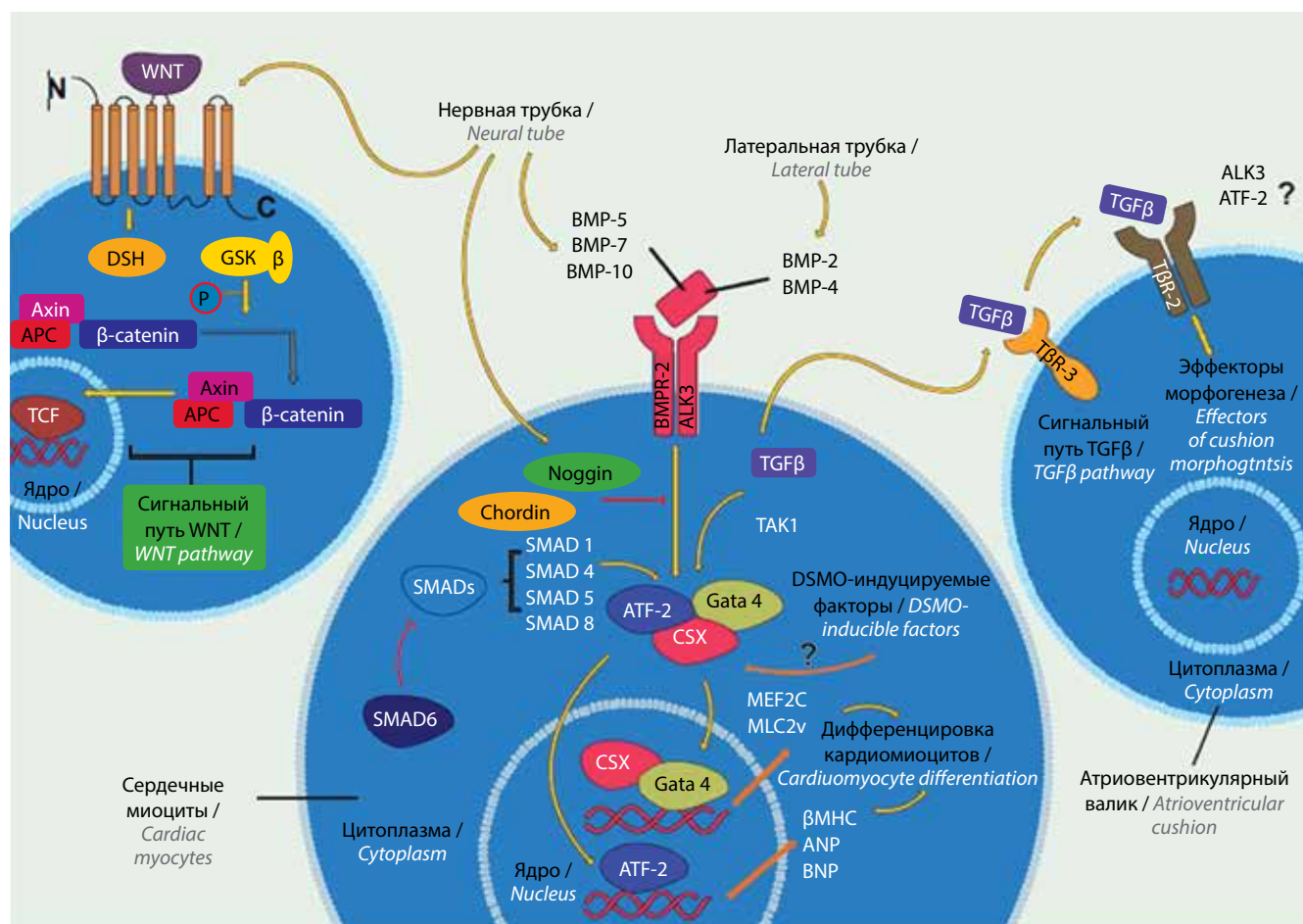


Схема сигнального пути ALK [8, 9]. TCF – фактор транскрипции; GSK3 β – киназа гликогенсинтаза 3 β ; BMP-5-костный морфогенетический белок 5; BMP-7 – костный морфогенетический белок 7; BMP-10 – костный морфогенетический белок 10; BMPR-2 – белки-рецепторы костного морфогенетического белка типа 2; ATF-2 – активирующий фактор транскрипции 2; TGF β – трансформирующий фактор роста β ; TAK1 – киназа трансформирующего фактора роста бета-активируемая киназа 1; DMSO – диметилсульфоксид; MEFG2C – фактор энхансера миоцитов 2C; MLC2v – легкая цепь миозина; β MHC – тяжелая цепь β -миозина; T β R-2-рецептор трансформирующего фактора роста типа 2; ANP – предсердный натрийуретический пептид; BNP – мозговой натрийуретический пептид

Scheme of the ALK signaling pathway [8, 9]. TCF – transcription factor; GSK3 β – glycogen synthase kinase 3 β ; BMP-5 – bone morphogenetic protein 5; BMP-7 – bone morphogenetic protein 7; BMP-10 – bone morphogenetic protein 10; BMPR-2 – bone morphogenetic protein receptor, type II; ATF-2 – activating transcription factor 2; TGF β – transforming growth factor β ; TAK1 – transforming growth factor β -activated kinase 1; DMSO – dimethyl sulfoxide; ME2C – myocyte enhancer factor 2C; MLC2v – myosin light chain; β MHC – β myosin heavy chain; T β R-2 – transforming growth factor β ; ANP – atrial natriuretic peptide; BNP – brain natriuretic peptide

Также в литературе описываются недавно обнаруженные транслокации *ALK* в новообразованиях кожи, например в акральных меланоммах и шпидоидных опухолях, что может представлять интерес для планирования таргетной терапии таких пациентов [11]. Экспрессию и перестройки в *ALK* выявляют и при злокачественной фиброзной гистиоцитоме [12]. С целью поиска новых терапевтических мишеней также были исследованы перестройки в данном гене при светлоклеточных карциномах. Однако согласно полученным результатам слияния *ALK* обуславливали патогенетический механизм лишь в небольшом числе случаев светлоклеточных карцином [13].

ALK является одним из ключевых генов, влияющих на развитие нейробластомы, для которых характерно наличие активирующих SNPs, а не крупных

перестроек гена. Исследователи связывают наличие мутаций в этом гене в опухолях с неблагоприятным клиническим исходом, агрессивным течением и резистентностью к проводимому лечению [14, 15]. Они обнаруживаются и при рецидивах нейробластомы [16]. Отметим, что мутации в гене *ALK* встречаются в 80 % семейных случаев развития данного заболевания, при этом соматические мутации составляют около 10 % всех случаев [17]. При семейной нейробластоме они проявляются фенотипически лишь в 50 % носительства, что свидетельствует о неполной пенетрантности данного гена [18].

В ходе современных молекулярно-генетических исследований ПМВКЛ ранее обнаружен ряд аномалий, в том числе мутации в известных генах *p53*, *BCL6*, *BCL2*, *JAK2*, *STAT* и др. [19–22]. Мы же выявили

мутацию, ранее не описанную при этой нозологии, которая может служить основой для дальнейших клинических испытаний. Опубликовано много исследований, посвященных сравнению различных схем терапии ПМВКЛ. Однако выбор оптимального лечения представляет определенные трудности. Несмотря на активное применение ингибиторов ALK в лечении солидных опухолей, их использование в терапии ПМВКЛ требует дальнейшего изучения на большей выборке пациентов. Анализ молекулярного профиля данного злокачественного новообразования позволит найти потенциальные терапевтические мишени для

пациентов с рецидивирующими и рефрактерными формами заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный клинический случай демонстрирует стремительное развитие первично рефрактерной ПМВКЛ у молодой пациентки, не имеющей отягощенного онкологическими заболеваниями семейного анамнеза. Выявленные в ходе таргетного NGS редкие миссенс-мутации с. 3542G>A и с. 422G>A в гене *ALK*, возможно, ассоциированы с особенностями течения заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Архипова О.Е., Черногубова Е.А., Тарасов В.А. и др. Уровень онкологических заболеваний как индикатор медико-экологической безопасности территорий (на примере Ростовской области). Вестник Южного научного центра РАН 2013;9(3):7–14. [Arkhipova O.E., Chernogubova E.A., Tarasov V.A. et al. The level of oncological diseases as an indicator of the medical and environmental safety of territories (on the example of the Rostov region). Vestnik Yuzhnogo nauchnogo centra RAN = Bulletin of the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences 2013;9(3):7–14. (In Russ.)].
2. Камаева И.А., Лысенко И.Б., Николаева Н.В. и др. Применение иммунотерапии для лечения рефрактерных форм лимфомы Ходжкина в реальной клинической практике. Южно-Российский онкологический журнал 2021;2(2):34–41. [Kamaeva I.A., Lysenko I.B., Nikolaeva N.V. et al. The use of immunotherapy for the treatment of refractory forms of Hodgkin's lymphoma in real clinical practice. Yuzhno-Rossiyskiy onkologicheskij zhurnal = South Russian Journal of Oncology 2021;2(2):34–41. (In Russ.)]. DOI: 10.37748/2686-9039-2021-2-2-4.
3. Li M.M., Datto M., Duncavage E.J. et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. J Mol Diagn 2017;19(1):4–23. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2016.10.002.
4. Taghizadeh H., Müllauer L., Mader R.M., Schindl M., Prager G.W. Applied precision medicine in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. Ther Adv Med Oncol 2020;12:1758835920938611. DOI: 10.1177/1758835920938611.
5. NCBI. ALK receptor tyrosine kinase [Homo sapiens (human)]. Available at: <https://www.ncbi.com>.
6. Wang H., Wang Z., Zhang G. et al. Driver genes as predictive indicators of brain metastasis in patients with advanced NSCLC: EGFR, ALK, and RET gene mutations. Cancer Med 2020;9(2):487–95. DOI: 10.1002/cam4.2706.
7. Majewska H., Gorczyński A., Czapiewski P. et al. ALK alterations in salivary gland carcinomas. Virchows Arch 2021;478(5):933–41. DOI: 10.1007/s00428-020-02971-w.
8. ALK Pathway. Gene Set Enrichment Analysis. Available at: <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>.
9. Genetics illustrations. Smart Servier Medical Art. Available at: <https://smart.servier.com/category/cellular-biology/genetics/>.
10. Ronchi A., Montella M., Cozzolino I. et al. The potential diagnostic and predictive role of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene alterations in melanocytic tumors. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2020;24(7):3829–38. DOI: 10.26355/eurrev_202004_20849.
11. Kazlouskaya V., Ho J., Jedrych J., Karunamurthy A. Spindle cell variant of epithelioid cell histiocytoma (spindle cell histiocytoma) with ALK gene fusions: cases series and review of the literature. J Cutan Pathol 2021;48(7):837–41. DOI: 10.1111/cup.13923.
12. Yang C., Zhang L., Love-Gregory L. et al. Identification of novel ALK rearrangements in gynecologic clear cell carcinoma. Int J Cancer 2021;154(2):459–68. DOI: 10.1002/ijc.33330.
13. Fetahu I.S., Taschner-Mandl S. Neuroblastoma and the epigenome. Cancer Metastasis Rev 2021;40(1):173–89. DOI: 10.1007/s10555-020-09946-y.
14. Berry T., Luther W., Bhatnagar N. et al. The ALK(F1174L) mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma. Cancer Cell 2012;22(1):117–30. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.06.001.
15. Umapathy G., Mendoza-Garcia P., Hallberg B., Palmer R.H. Targeting anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. APMIS 2019;127(5):288–302. DOI: 10.1111/apm.12940.
16. Mossé Y.P., Laudenslager M., Longo L. et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. Nature 2008;455(7215):930–5. DOI: 10.1038/nature07261.
17. Mlakar V., Morel E., Mlakar S.J. et al. A review of the biological and clinical implications of RAS-MAPK pathway alterations in neuroblastoma. J Exp Clin Cancer Res 2021;40(1):189. DOI: 10.1186/s13046-021-01967-x.
18. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary Acta Neuropathol 2016;131:803–20. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
19. Hadjadj J., Castro C.N., Tusseau M. et al. Early-onset autoimmunity associated with SOCS1 haploinsufficiency. Nat Commun 2020;11(1):5341. DOI: 10.1038/s41467-020-18925-4.
20. Chapuy B., Stewart C., Dunford A.J. et al. Genomic analyses of PMBL reveal new drivers and mechanisms of sensitivity to PD-1 blockade. Blood 2019;134(26):2369–82. DOI: 10.1182/blood.2019002067.
21. Dubois S., Viailly P.J., Mareschal S. et al. Next-generation sequencing in diffuse large B-cell lymphoma highlights molecular divergence and therapeutic opportunities: a LYSA study. Clin Cancer Res 2016;22(12):2919–28. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2305.
22. Zhou H., Xu-Monette Z.Y., Xiao L. et al. Prognostic factors, therapeutic approaches, and distinct immunobiologic features in patients with primary mediastinal large B-cell lymphoma on long-term follow-up. Blood Cancer J 2020;10(5):49. DOI: 10.1038/s41408-020-0312-7.

Вклад авторов

О.И. Кит: разработка концепции и дизайна исследования, написание текста статьи, обработка материала;

И.А. Камаева: разработка концепции и дизайна исследования, написание текста статьи, обработка материала, сбор, анализ и интерпретация данных;

И.Б. Лысенко: разработка концепции и дизайна исследования, написание текста статьи, обработка материала, научное редактирование;

И.А. Новикова, Н.Н. Тимошкина: разработка концепции и дизайна исследования, написание текста статьи, обработка материала;

Н.В. Николаева: редактирование, в том числе научное;

Я.С. Гайсултанова, Н.Ю. Саманева: сбор, анализ и интерпретация данных;

А.А. Пушкин: разработка концепции и дизайна исследования.

Authors' contribution

O.I. Kit: development of the concept and design of the study, article writing, processing the material;

I.A. Kamaeva: development of the concept and design of the study, article writing, material processing, data collection, analysis and interpretation;

I.B. Lysenko: development of the concept and design of the study, writing the text of the article, processing the material, scientific editing;

I.A. Novikova, N.N. Timoshkina: development of the concept and design of the study, article writing, processing the material;

N.V. Nikolaeva: editing, including scientific;

Ya.S. Gaisultanova, N.Yu. Samaneva: data collection, analysis and interpretation;

A.A. Pushkin: development of the concept and design of the study.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.И. Кит / O.I. Kit: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>

И.А. Камаева / I.A. Kamaeva: <https://orcid.org/0000-0003-3001-0675>

И.Б. Лысенко / I.B. Lysenko: <https://orcid.org/0000-0003-4457-3815>

Н.В. Николаева / N.V. Nikolaeva: <https://orcid.org/0000-0001-7224-3106>

Н.Ю. Саманева / N.Yu. Samaneva: <https://orcid.org/0000-0003-0843-6012>

А.А. Пушкин / A.A. Pushkin: <https://orcid.org/0000-0003-2385-6285>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 11.11.2021. **Принята к публикации:** 06.04.2022.

Article submitted: 11.11.2021. **Accepted for publication:** 06.04.2022.

Противоопухолевый эффект рекомбинантного интерферона гамма в экспериментальной модели билатеральной солидной карциномы Эрлиха

В.Г. Исаева, Л.Ю. Гривцова, Л.П. Жовтун, С.М. Самборский, Н.А. Фалалеева

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 249036 Обнинск, ул. Маршала Жукова, 10

Контакты: Станислав Михайлович Самборский samborsky.stas@yandex.ru

Введение. Иммуноterapia, входящая в состав комплексной и комбинированной терапии рака, является одним из приоритетных направлений в лечении онкологических больных. Однако эффективность применения иммунотерапевтических препаратов последнего поколения не так высока, а у некоторых больных эффект терапии оказался кратковременным. Факторами, препятствующими полноценной реализации противоопухолевого эффекта цитостатиков и иммунопрепаратов, возможно, являются особенности антигенного состава опухоли, а также ее клеточного и стромального микроокружения. Данные факты способствовали развитию новой стратегии, обозначенной как иммуноредактирование рака посредством воздействия различных биологически активных агентов, способных изменить соотношение организм — опухоль в пользу больного и сделать опухоль доступной для реализации противоопухолевого воздействия иммунной системы хозяина.

Цель исследования — экспериментальное обоснование разработки новых иммунотерапевтических подходов в лечении агрессивных форм рака.

Материалы и методы. Проведено экспериментальное изучение влияния человеческого рекомбинантного интерферона гамма (IFN γ) на рост карциномы Эрлиха при подкожной билатеральной трансплантации клеток опухоли животным. Трансплантацию карциномы Эрлиха мышам-самцам гибридам F1 (CBAx57Bl6) проводили подкожным введением $2,0 \times 10^6$ опухолевых клеток (7-дневная культура) в 0,1 мл суспензии в область латеральной поверхности правого и левого бедер с имитацией мультицентричного роста.

Результаты. Через сутки после курса введения препарата (6-е сутки роста опухолевых узлов) отмечен эффект подавления роста опухоли по отношению к росту в контрольной группе. Максимальный эффект торможения, составляющий 19,8 % ($p < 0,05$) роста опухоли, получен через 5 сут после курса препарата (10-е сутки опухолевого роста, правый узел) и 18,5 % ($p < 0,001$) через 9 суток после введения (14-е сутки опухолевого роста, левый узел).

Заключение. Таким образом, установлен отчетливый, статистически значимый противоопухолевый эффект IFN γ в отношении опухоли с мультицентричным характером роста.

Ключевые слова: иммуноterapia, цитокины, интерферон гамма, опухоли с мультицентричным характером роста

Для цитирования: Исаева В.Г., Гривцова Л.Ю., Жовтун Л.П. и др. Противоопухолевый эффект рекомбинантного интерферона гамма в экспериментальной модели билатеральной солидной карциномы Эрлиха. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2):111–9. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-111-119.

Antitumor effect of recombinant interferon-gamma in an experimental model of Ehrlich's bilateral solid carcinoma.

V.G. Isaeva, L.Y. Grivtsova, L.P. Zhovtun, S.M. Samborsky, N.A. Falaleeva

A.F. Tsyba Medical Radiological Research Center — branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 10 Marshala Zhukova St., Obninsk 249036, Russia

Contacts: Stanislav Mikhailovich Samborsky samborsky.stas@yandex.ru

Introduction. Immunotherapy, which is part of the complex and combined cancer therapy, is one of the priority areas in the treatment of cancer patients. However, the effectiveness of the use of immunotherapeutic drugs of the latest generation is not so high, and in some patients the effect of therapy was short-lived. Factors that prevent the full realization of the antitumor effect of cytostatics and immunopreparations may be the features of the antigenic composition of the tumor, as well as its cellular and stromal microenvironment. These facts contributed to the development of a new

strategy, designated as immunoreduction of cancer by exposure to various biologically active agents that can change the body – tumor ratio in favor of the patient and make the tumor available for the implementation of antitumor effects of the host immune system.

The study objective – experimental substantiation of the development of new immunotherapeutic approaches in the treatment of aggressive forms of cancer.

Materials and methods. An experimental study of the effect of human recombinant interferon-gamma (IFN γ) on the growth of Ehrlich's carcinoma during subcutaneous bilateral transplantation of tumor cells to animals was carried out. Transplantation of Ehrlich's carcinoma to male F1 hybrids (SWAhC57Bl6) was performed by subcutaneous injection of 2.0×10^6 tumor cells (7-day culture) in 0.1 ml of suspension into the lateral surface of the right and left femur with imitation of multicentric growth.

Results. A day after the course of drug administration (day 6 of tumor node growth), the effect of suppressing tumor growth in relation to growth in the control group was noted. The maximum inhibition effect of 19.8 % ($p < 0.05$) of tumor growth was obtained 5 days after the course of the drug (10 days of tumor growth, right node) and 18.5 % ($p < 0.001$) 9 days after administration (14 days of tumor growth, left node).

Conclusion. Thus, a distinct, statistically significant antitumor effect of IFN γ was established in relation to a tumor with a multicentric growth pattern.

Key words: immunotherapy, cytokines, interferon-gamma, tumors with multicentric growth pattern

For citation: Isaeva V.G., Grivtsova L.Y., Zhovtun L.P. et al. Antitumor effect of recombinant interferon-gamma in an experimental model of Ehrlich's bilateral solid carcinoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):111–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-111-119.

ВВЕДЕНИЕ

Опухоль – результат сложного механизма взаимодействия генетических и эпигенетических изменений, приводящего к нарушению регуляции межклеточных взаимосвязей и внутриклеточных сигнальных путей. Гетерогенный клеточный состав опухоли и измененное ею микроокружение ограничивают эффективность стандартной химиотерапии из-за внутренней, уже имеющейся или приобретенной, лекарственной устойчивости, а также в связи с подавлением апоптоза [1].

Иммунотерапия – одно из приоритетных направлений в лечении онкологических больных, входящее в состав комплексной и комбинированной терапии рака. Однако эффективность применения иммунотерапевтических препаратов последнего поколения не так высока, как ожидалось: в 25 % случаев ответа на лечение ингибиторами контрольных точек иммунитета не получено, а у некоторых больных эффект терапии оказался кратковременным, и причины этого до сих пор неизвестны. Факторами, препятствующими полноценной реализации противоопухолевого эффекта цитостатиков и иммунопрепаратов, возможно, являются особенности антигенного состава опухоли, а также ее клеточного и стромального микроокружения. Данные факты способствовали развитию новой стратегии, обозначенной как иммуноредактирование рака посредством воздействия различных биологически активных агентов, способных изменить соотношение организм – опухоль в пользу больного и сделать опухоль доступной для реализации противоопухолевого воздействия иммунной системы хозяина [2].

В одном из недавних исследований показано, что резистентность к иммунотерапии ингибиторами контрольных точек иммунитета объясняется дефектами в сигнале интерферона гамма (IFN γ) [3].

Интерферон гамма составляет семейство интерферонов 2-го типа и секретируется целым рядом иммунокомпетентных клеток. Роль IFN γ в модулировании иммунных реакций огромна. В большей степени секреция IFN γ свойственна активированным лимфоцитам: в основном это CD4⁺ Т-хелперы 1-го типа (Th1), CD8⁺ цитотоксические Т-клетки, $\gamma\delta$ -Т-клетки, естественные киллеры (NK) и, в меньшей степени, Т-клетки с киллерной функцией (NKT), В-клетки и антигенпрезентирующие клетки. Экспрессия IFN γ индуцируется митогенами и цитокинами, такими как интерлейкин 12 (ИЛ-12), интерлейкин 15 (ИЛ-15), интерлейкин 18 (ИЛ-18) и интерфероны 1-го типа. Плейотропные функции IFN γ опосредуются клеточно-специфичной экспрессией более 250 IFN γ -регулируемых генов, контролирующих сигнальные воспалительные молекулы, апоптоз, регуляторы клеточного цикла и активаторы транскрипции [4–19].

Интерферон гамма может считаться одним из ключевых игроков в иммунном контроле рака, стимулировании противоопухолевого иммунитета и содействии в распознавании и элиминации опухолей [20–26].

Кроме активации антигенпрезентирующих клеток, усиления экспрессии ряда цитокинов (ИЛ-12 и ИЛ-18), приводящих к дифференцировке Th-1 в цитотоксические лимфоциты, индукции каскада сигналов в Т-клетках для обеспечения их эффекторных функций и активации экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости, т.е. реализации цитотоксичности в отношении опухоли, IFN γ вызывает также регрессию сосудистой системы опухоли. Таким образом, возможно, что IFN γ замедляет рост опухоли за счет индукции ее ишемии [27, 28].

При физиологических условиях содержание интерферонов и 1-го (интерфероны альфа), и 2-го (IFN γ) типов жестко контролируется, и их локализация

ограничена тканями. Постоянные уровни эндогенного IFN γ способствуют гомеостазу иммунной системы, сохранению клеточных функций, поддержанию постоянства костно-мозговых ниш стволовых кроветворных клеток и остеогенеза [29–33].

При злокачественных новообразованиях содержание IFN γ различно. Так, уровни данного цитокина снижены у больных раком легкого, а гиперметилирование гена-промотора IFN γ в CD4 $^{+}$ Т-клетках показывает обратную корреляцию с уровнями цитокина в плазме крови [34].

К сожалению, IFN γ -индуцированные сигналы могут оказывать и иммуносупрессивное действие и даже индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). Данный факт установлен на экспериментальной модели папиллярного рака щитовидной железы [35].

Секреция IFN γ клетками опухолевого микроокружения способствует усилению опухолевого ангиогенеза, и высокие уровни данного цитокина в циркуляции являются фактором неблагоприятного прогноза, в частности при раке яичников. Повышенная продукция IFN γ CD8 $^{+}$ Т-клетками микроокружения может вызывать экспрессию синтазы оксида азота (iNOS) в моноцитарных миелоидно-супрессорных клетках опухолевого микроокружения, тем самым повышая их иммуносупрессорную активность и способствуя росту опухоли [36, 37].

Интерферон гамма, как и все эндогенные цитокины, обладает плеiotропностью биологических эффектов, и данные относительно его влияния на процессы канцерогенеза на первый взгляд противоречивы. Однако необходимо учитывать, что IFN γ , синтезируемый в организме больного, секретируется трансформированными клетками опухолевого микроокружения.

Таким образом, исследование противоопухолевой активности экзогенного IFN γ представляется перспективным для последующей разработки иммунотерапевтических стратегий для полной эрадикации рака. При этом критически важной для дальнейшего применения препаратов интерферона у онкологических больных является необходимость изучения его влияния и выявления клеточных мишеней IFN γ , в первую очередь в тех опухолях, где этот цитокин может оказывать противоопухолевое воздействие.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена в рамках государственного задания по разработке иммунотерапевтических подходов у онкологических больных.

Лабораторные животные. Исследования проведены на 20 половозрелых мышах-самцах гибридах F1 (CBAxС57Bl6), массой 27–29 г (10 животных — контрольная группа, 10 животных — опытная группа). Животные были получены из питомника Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-

биологического агентства России, имели ветеринарный сертификат и прошли 20-суточный карантин в виварии Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба. Экспериментальные работы выполнены в соответствии с требованиями приказа Минздрава России № 708н от 08.10.2015 г. Животные содержались в пластиковых клетках в условиях естественного освещения и принудительной 16-кратной вентиляции при температуре 18–20 °С и относительной влажности воздуха 40–70 %, на подстилке из простерилизованных древесных стружек, со свободным доступом к питьевой воде и стандартному брикетированному корму ПК-120–1 (ООО «Лабораторснаб», Россия). Каждая исследованная группа животных состояла из 10 особей.

Работы с лабораторными животными выполнены в соответствии с общепринятыми этическими нормами на основе стандартных операционных процедур, которые приняты в Медицинском радиологическом научном центре им. А.Ф. Цыба и отвечают правилам Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123).

Опухолевая модель. Исследования проведены на перевиваемой мышинной карциноме Эрлиха. Штамм поддерживался на аутбредных мышах-самцах в виде асцитной карциномы. Трансплантацию солидной карциномы Эрлиха мышам-самцам гибридам F1 (CBAxС57Bl6), проводили подкожным введением $2,0 \times 10^6$ опухолевых клеток (7-дневная культура) в 0,1 мл суспензии в область латеральной поверхности правого и левого бедер с имитацией мультицентричного роста (рис. 1).

Интерферон гамма. В данной экспериментальной работе использован ингарон[®] — запатентованный препарат (ООО «НПП «Фармаклон», Россия), представляющий собой рекомбинантный IFN γ человека, содержащий в качестве действующего вещества IFN γ человеческий рекомбинантный (100 000 МЕ) и маннит в качестве вспомогательного вещества (14,5 мг) (регистрационный номер ЛС — 000924; международное непатентованное название — интерферон гамма человеческий рекомбинантный).

Ингарон[®] получают с помощью микробиологического синтеза в рекомбинантном штамме *Escherichia coli* с последующей очисткой колоночной хроматографией. Интерферон гамма, входящий в состав данного препарата, является измененной молекулой с молекулярной массой 16,9 кДа, состоит из 144 аминокислотных остатков (а. о.), лишен первых трех а. о. — Cys-Туг-Cys, замененных на Met.

Данный препарат вводили через 3 сут после трансплантации опухолевых клеток в дозе 42860 МЕ/кг массы тела трехкратно подкожно в область холки животного в объеме 0,1 мл 1 раз в сутки. Контрольным животным по аналогичной схеме и в том же объеме вводили 0,9 % раствор хлорида натрия (физиологический раствор).

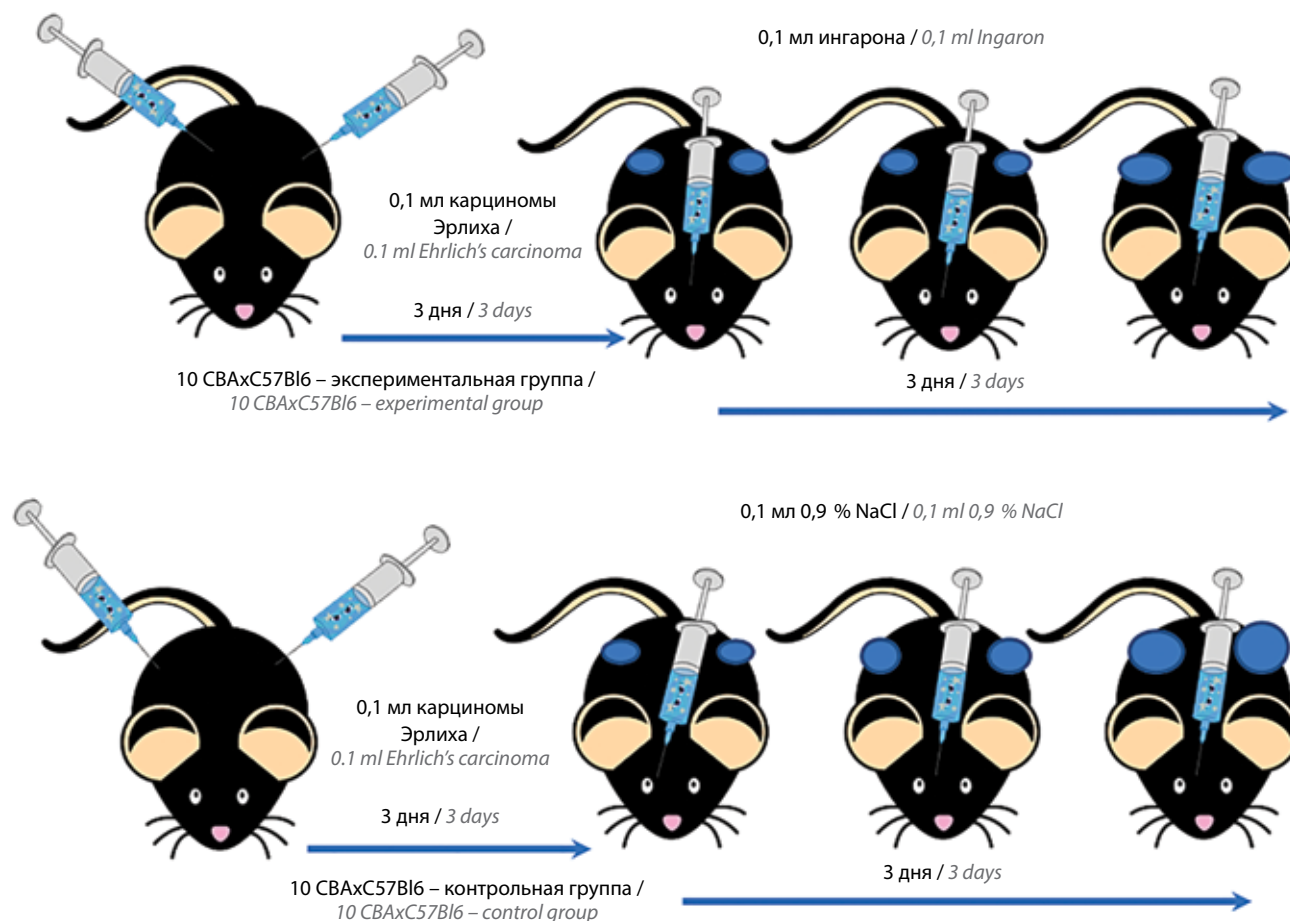


Рис. 1. Трансплантация опухолевых клеток карциномы Эрлиха билатерально в область бедра опытным и контрольным мышам и введение через 3 сут опытным особям ингарона, а контрольным — 0,9 % NaCl трехкратно подкожно в область холки
Fig. 1. Transplantation of tumor cells of Ehrlich's carcinoma bilaterally into the thigh area to experimental and control mice and introduction of ingarone to experimental individuals three days later, and 0.9 % NaCl to control subjects three times subcutaneously into the withers

Доза вводимого препарата соответствует суточной терапевтической дозе для человека (500 000 МЕ), пересчитанной на поверхность тела экспериментального животного [38]. Исходя из расчета, доза ингарона на мышь составила 857 МЕ или 1,7 мкл из флакона, содержащего 500 000 МЕ. Для введения препарата в объеме 0,1 мл эту дозу разводили в 59 раз 0,9 % раствором NaCl. В связи с этим контрольным животным-опухоленосителям вводили 0,9 % раствор NaCl.

Оценка эффектов. Влияние препаратов на опухолевый процесс изучали по динамике роста опухолевых узлов солидной формы карциномы Эрлиха. Для этого на протяжении всего эксперимента у животных измеряли длину и ширину опухолевых узлов на обеих лапах, вычисляя объем опухоли (V) по формуле:

$$V = (a^* \times b^2) / 2,$$

где a — больший; b — меньший размер узла.

Процент торможения роста опухоли (ТРО) на правой и левой лапах опытных мышей вычисляли по отношению к росту опухоли на правой или левой лапах контрольных особей по формуле:

$$\text{ТРО} = (V_k - V_o) / V_k \times 100 \%,$$

где V_k — среднестатистический объем опухоли у контрольных особей; V_o — среднестатистический объем опухоли у опытных животных.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statistika 10.0 (StatSoft, Inc.) с применением методов вариационной статистики. После проверки нормальности распределения вариационных рядов подсчитывали средний показатель и стандартную ошибку среднего ($M \pm SEM$). Групповые сравнения количественных показателей оценивали с использованием параметрических критериев Фишера и Стьюдента и непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Достоверность основных полученных данных подтверждалась также результатами их воспроизведения в 2 независимых сериях экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования показали, что IFN γ (Ингарон[®]), введенный животным курсом с 3-х по 6-е

Влияние препарата ингарон[®] на динамику роста солидной формы карциномы Эрлиха у мышей-самцов гибридов F1 (CBAXC57BL6)

Effect of Ingaron[®] on the dynamics of growth of the solid form of Ehrlich's carcinoma in F1 (CBAXC57BL6) hybrid male mice

Время от 1-го введения препарата, сут Time from the first injection the drug, days	Рост опухоли, сут Tumor growth, days	Правый узел Right tumor node		Левый узел Left tumor node	
		Объем опухоли (M ± m), см ³ Tumor volume (M ± m), cm ³	Торможение роста опухоли, % Tumor growth inhibition index, %	Объем опухоли (M ± m), см ³ Tumor volume (M ± m), cm ³	Торможение роста опухоли, % Tumor growth inhibition index, %
3-и сутки: 3 rd day: контрольная группа control group ингарон Ingaron	6	0,58 ± 0,02 0,51 ± 0,01*	— 13,4	0,60 ± 0,02 0,52 ± 0,01*	— 13,8
4-е сутки: 4 th day: контрольная группа control group ингарон Ingaron	7	0,85 ± 0,04 0,72 ± 0,01*	— 15,3	0,88 ± 0,05 0,75 ± 0,01*	— 14,8
7-е сутки: 7 th day: контрольная группа control group ингарон Ingaron	10	1,31 ± 0,07 1,05 ± 0,02*	— 19,8*	1,34 ± 0,03 1,22 ± 0,03*	— 9,0
9-е сутки: 9 th day: контрольная группа control group ингарон Ingaron	12	1,80 ± 0,11 1,63 ± 0,03	— 9,4	1,92 ± 0,08 1,74 ± 0,02*	— 9,4
11-е сутки: 11 th day: контрольная группа control group ингарон Ingaron	14	2,63 ± 0,11 2,28 ± 0,05*	— 13,3	2,71 ± 0,11 2,21 ± 0,06*	— 18,5
15-е сутки: 15 th day: контрольная группа control group ингарон Ingaron	18	3,62 ± 0,14 3,17 ± 0,07*	— 12,4	3,71 ± 0,23 3,47 ± 0,14	— 6,5
16-е сутки: 16 th day: контрольная группа control group ингарон Ingaron	19	4,0 ± 0,18 3,71 ± 0,15	— 7,3	4,18 ± 0,19 3,63 ± 0,15*	— 13,2
21-е сутки: 21 st day: контрольная группа control group ингарон Ingaron	24	5,41 ± 0,24 5,22 ± 0,29	— 3,5	5,98 ± 0,28 5,60 ± 0,34	— 6,4
23-и сутки: 23 rd day: контрольная группа control group ингарон Ingaron	26	6,14 ± 0,23 5,64 ± 0,33	— 8,1	6,47 ± 0,29 6,34 ± 0,44	— 2,0

*Статистически значимые различия ($p < 0,05$).

*Statistically significant differences ($p < 0.05$).

сутки опухолевого роста, обладает противоопухолевой активностью. Торможение роста опухоли отмечено с 2-х сторон, однако оно было неравномерным и составило от 13,4 до 19,8 %. Противоопухолевый эффект продолжался с 6-х по 19-е сутки роста опухоли (с 1-х по 14-е сутки после окончания курса введения препарата). Максимальный эффект торможения роста правого опухолевого узла достигнут на 10-е сутки его роста, т. е. через 5 сут после окончания введения препарата, а левого опухолевого узла — на 14-е сутки роста (на 9-е сутки после окончания введения препарата). Торможение роста опухоли правого опухолевого узла составило 19,8 %, а левого — 18,5 % (см. таблицу; рис. 2).

Таким образом, человеческий рекомбинантный IFN γ (ингарон[®]) при введении мышам трехкратно подкожно в область холки в объеме 0,1 мл 1 раз в сутки в дозе 42 860 МЕ/кг с 3-х по 6-е сутки после трансплантации опухолевых клеток карциномы Эрлиха билатерально в область бедра обеих лап обладает противоопухолевой активностью и способен задерживать рост опухоли на ранних стадиях процесса.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании мы показали, что 3-кратное введение рекомбинантного человеческого IFN γ (препарата ингарон[®]) в дозе 42 860 МЕ/кг замедляет рост билатерально привитой солидной формы карциномы Эрлиха у мышей гибридов F1 (CBAx57Bl6). Этот эксперимент прямо свидетельствует о противоопухолевой активности экзогенного IFN γ (препарата ингарон[®]).

Первые сообщения, указывающие на значимость IFN γ в противоопухолевом иммунитете, были получены более 25 лет назад в результате исследований с клетками фибросаркомы линии Мет А, характеризующейся отсутствием экспрессии рецептора к IFN γ (IFN γ R1). В ходе этих экспериментов было установ-

лено, что эндогенный IFN γ играет облигатную роль в опосредовании LPS-индуцированного отторжения опухоли. Этот вывод был дополнительно подтвержден исследованиями с использованием 129/SV мышей, нокаутных по рецептору IFN γ (IFN γ R1) или STAT1, у которых химически индуцированные саркомы развивались быстрее и чаще, чем у мышей дикого типа. Примечательно, что у этих мышей отсутствует также и опухоль-супрессорный белок p53, и скорость образования спонтанных опухолей у них выше в сравнении с IFN γ -чувствительными p53-дефицитными мышами [39, 40].

Прямой противоопухолевый эффект IFN γ выявлен в нескольких экспериментальных моделях, однако механизмы развития данного эффекта были различными. Так, в клеточных линиях колоректального рака он вызывал ассоциированный с аутофагией апоптоз путем индукции митохондриями активных форм кислорода. В T98G-линии глиобластомы индукция апоптоза обусловлена подавлением пути PI3K (фосфоинзитид-3-киназа)/АКТ (протеинкиназа В), а апоптоз другой клеточной линии глиобластомы (U87MG) произошел независимо от сигнального пути PI3K/АКТ, посредством активации NF- κ B. А в клетках карциномы поджелудочной железы человека IFN γ индуцирует апоптоз в каспаза-1-зависимой манере [41–43].

Интерферон гамма может индуцировать активацию некоторых микро-РНК, оказывающих противоопухолевый эффект. Так, на клеточных линиях меланомы показано, что активация miR-29a/b через STAT1 посредством IFN γ приводит к увеличению скорости взаимодействия IFN γ с другими молекулами для реализации противоопухолевого эффекта. Так, у мышей, дефицитных одновременно по генам IFN γ и гранулоцитарно-макрофагальному колониестимулирующему фактору (ГМ-КСФ), развивались лимфомы и солидные опухоли существенно быстрее, чем у животных, нокаутных только по ГМ-КСФ или IFN γ [44, 45].

Однако реакции миелоидных и других кроветворных клеток на IFN γ недостаточно для регрессии опухоли, тогда как влияние IFN γ на эндотелиальные клетки обеспечивает значимый противоопухолевый эффект. То есть для развития противоопухолевого эффекта недостаточно воздействия IFN γ непосредственно на клетки опухоли и опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, и необходимо его воздействие и на клетки стромы [46–49].

Клинические исследования показали эффективность IFN γ -терапии в комбинации с циклофосфамидом и цисплатином, обеспечившей существенное увеличение периода выживаемости без прогрессирования при раке яичников [50].

Несмотря на довольно обнадеживающие факты относительно противоопухолевого эффекта IFN γ , он до настоящего момента не одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA)

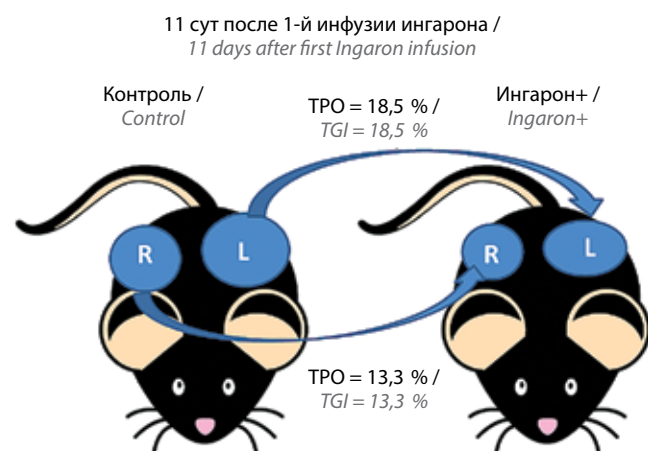


Рис. 2. Торможение роста (ТРО) левого и правого опухолевых узлов у опытных мышей после введения ингарона (14-е сутки роста опухоли)
Fig. 2. Inhibition of growth (TRO) of the left and right tumor nodes in experimental mice after ingaron introduction (14th day of tumor growth)

для клинического использования при раке, за исключением опухолевого остеопороза. Это объясняется недостаточностью наших знаний относительно механизмов влияния IFN γ в той или иной клинической ситуации, а также в связи указанной выше возможностью усиления посредством IFN γ способности опухоли к инвазии.

К сожалению, опухоль может избегать воздействия IFN γ вследствие утраты экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости класса I (HLA-I) из-за метаболического стресса. Кроме того, IFN γ в комбинации с фактором некроза опухоли альфа (ФНО α) индуцирует экспрессию MUC16 — муцина, вовлечен-

ного в канцерогенез при раке молочных желез, яичников и эндометриальных опухолях [51, 52].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, накоплено много данных относительно роли IFN γ в опухолевом канцерогенезе. Несомненно, он может оказывать прямое противоопухолевое воздействие, как показало в том числе и наше исследование. Однако для широкого клинического применения IFN γ необходимо дальнейшее экспериментальное изучение механизмов и условий, которые обеспечат максимальный противоопухолевый эффект при минимуме побочных и нежелательных явлений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tian T., Olson S., Whitacre J.M., Harding A. et al. The origins of cancer robustness and evolvability. *Integr Biol (Camb.)* 2011;3(1):17–30. DOI: 10.1039/c0ib00046a.
2. Dunn G.P., Koebel C.M., Schreiber R.D. et al. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006;6(11):836–48. DOI: 10.1038/nri1961.
3. Manguso R.T., Pope H.W., Zimmer M.D. et al. *In vivo* CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target. *Nature* 2017;547(7664):413–8. DOI: 10.1038/nature23270.
4. Kasahara T., Hooks J.J., Dougherty S.F. et al. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. *J Immunol* 1983;130(4):1784–9.
5. Corthay A., Skovseth D.K., Lundin K.U. et al. Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity* 2005;22(3):371–83. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.02.003.
6. Matsushita H., Hosoi A., Ueha S. et al. Cytotoxic T lymphocytes block tumor growth both by lytic activity and IFN gamma-dependent cell-cycle arrest. *Cancer Immunol Res* 2015;3(1):26–36. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0098.
7. Girardi M., Oppenheim D.E., Steele C.R. et al. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 2001;294(5542):605–9. DOI: 10.1126/science.1063916.
8. Gao Y., Yang W., Pan M. et al. Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med* 2003;198(3):433–42. DOI: 10.1084/jem.20030584.
9. Ribot J.C., deBarros A., Pang D.J. et al. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gamma-delta T cell subsets. *Nat Immunol* 2009;10(4):427–36. DOI: 10.1038/ni.1717.
10. Silva-Santos B., Serre K., Norell H. $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* 2015;15(11):683–91. DOI: 10.1038/nri3904.
11. Yu J., Wei M., Becknell B. et al. Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Immunity* 2006;24(5):575–90. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.03.016.
12. Keppel M.P., Saucier N., Mah A.Y. et al. Activation-specific metabolic requirements for NK cell IFN-gamma production. *J Immunol* 2015;194(4):1954–62. DOI: 10.4049/jimmunol.1402099.
13. Yoshimoto T., Takeda K., Tanaka T. et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 1998;161(7):3400–7. DOI: 10.4049/jimmunol.1001431.
14. Barr T.A., Brown S., Mastroeni P. et al. TLR and B cell receptor signals to B cells differentially program primary and memory Th1 responses to Salmonella enterica. *J Immunol* 2010;185(5):2783–9. DOI: 10.4049/jimmunol.1001431.
15. Bao Y., Liu X., Han C. et al. Identification of IFN-gamma-producing innate B cells. *Cell Res* 2014;24(2):161–76. DOI: 10.1038/cr.2013.155.
16. Ohteki T., Fukao T., Suzue K. et al. Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8 alpha+ lymphoid dendritic cells. *J Exp Med* 1999;189(12):1981–6. DOI: 10.1084/jem.189.12.1981.
17. Nguyen K.B., Cousens L.P., Doughty L.A. et al. Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nat Immunol* 2000;1(1):70–6. DOI: 10.1038/76940.
18. Matikainen S., Paananen A., Miettinen M. et al. IFN-alpha and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma production in human NK cells: differential regulation of Stat4 activation and IFN-gamma gene expression by IFN-alpha and IL-12. *Eur J Immunol* 2001;31(7):2236–45.
19. De Veer M.J., Holko M., Frevel M. et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* 2001;69(6):912–20.
20. Shankaran V., Ikeda H., Bruce A.T. et al. IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001;410(6832):1107–11. DOI: 10.1038/35074122.
21. Wang L., Wang Y., Song Z. et al. Deficiency of interferon-gamma or its receptor promotes colorectal cancer development. *J Interferon Cytokine Res* 2015;35(4):273–80. DOI: 10.1089/jir.2014.0132.
22. Kaplan D.H., Shankaran V., Dighe A.S. et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(13):7556–61. DOI: 10.1073/pnas.95.13.7556.
23. Street S.E., Cretney E., Smyth M.J. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 2001;97(1):192–7. DOI: 10.1182/blood.v97.1.192.
24. Street S.E., Trapani J.A., MacGregor D. et al. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med* 2002;196(1):129–34. DOI: 10.1084/jem.20020063.
25. Enzler T., Gillesen S., Manis J.P. et al. Deficiencies of GM-CSF and interferon gamma link inflammation and cancer. *J Exp Med* 2003;197(9):1213–9. DOI: 10.1084/jem.20021258.
26. Mitra-Kaushik S., Harding J., Hess J. et al. Enhanced tumorigenesis in HTLV-1

- tax-transgenic mice deficient in interferon-gamma. *Blood* 2004;104(10):3305–11. DOI: 10.1182/blood-2004-01-0266.
27. Anderson C.C., Bretscher P., Corthay A. et al. Immunological tolerance. Part I of a Report of a Workshop on foundational concepts of immune regulation. *Scand J Immunol* 2017;85(2):84–94. DOI: 10.1111/sji.12500.
 28. Girardi M., Glusac E., Filler R.B. et al. The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR)gammadelta+ and TCRalphabeta+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *J Exp Med* 2003;198(5):747–55. DOI: 10.1084/jem.20021282.
 29. Tovey M.G., Streuli M., Gresser I. et al. Interferon messenger RNA is produced constitutively in the organs of normal individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84(14):5038–42. DOI: 10.1073/pnas.84.14.5038.
 30. Gattass C.R., King L.B., Luster A.D. et al. Constitutive expression of interferon gamma-inducible protein 10 in lymphoid organs and inducible expression in T cells and thymocytes. *J Exp Med* 1994;179(4):1373–8. DOI: 10.1084/jem.179.4.1373.
 31. Sercan O., Hammerling G.J., Arnold B. et al. Innate immune cells contribute to the IFN-gamma-dependent regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis. *J Immunol* 2006;176(2):735–9. DOI: 10.4049/jimmunol.176.2.735.
 32. Baldrige M.T., King K.Y., Boles N.C. et al. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature* 2010;465(7299):793–7. DOI: 10.1038/nature09135.
 33. Duque G., Huang D.C., Dion N. et al. Interferon γ plays a role in bone formation in vivo and rescues osteoporosis in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 2011;26(7):1472–83. DOI: 10.1002/jbmr.350.
 34. Wang F., Xu J., Zhu Q. et al. Downregulation of IFNG in CD4(+) T cells in lung cancer through hypermethylation: a possible mechanism of tumor-induced immunosuppression. *PLoS One* 2013;8(11):e79064. DOI: 10.1371/journal.pone.0079064.
 35. Lv N., Gao Y., Guan H. et al. Inflammatory mediators, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma, induce EMT in human PTC cell lines. *Oncol Lett* 2015;10(4):2591–7. DOI: 10.3892/ol.2015.3518.
 36. Lu Y., Gu X., Chen L. et al. Interferon-gamma produced by tumor-infiltrating NK cells and CD4+ T cells downregulates TNFSF15 expression in vascular endothelial cells. *Angiogenesis* 2014;17(3):529–40. DOI: 10.1007/s10456-013-9397-y.
 37. Shime H., Maruyama A., Yoshida S. et al. Toll-like receptor 2 ligand and interferon-gamma suppress anti-tumor T cell responses by enhancing the immunosuppressive activity of monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology* 2017;7(1):e1373231. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1373231.
 38. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. М., 2005. [Guidelines for conducting preclinical studies of medicinal substances. Ed. by R.U. Khabriev. Moscow, 2005. (In Russ.)].
 39. Dighe A.S., Richards E., Old L.J. et al. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1994;1(6):447–56. DOI: 10.1016/1074-7613(94)90087-6.
 40. Kaplan D.H., Shankaran V., Dighe A.S. et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(13):7556–61. DOI: 10.1073/pnas.95.13.7556.
 41. Wang Q.S., Shen S.Q., Sun H.W. et al. Interferon-gamma induces autophagy-associated apoptosis through induction of cPLA2-dependent mitochondrial ROS generation in colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;498(4):1058–65. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.03.118.
 42. Zhang R., Banik N.L., Ray S.K. Combination of all-trans retinoic acid and interferon-gamma suppressed PI3K/Akt survival pathway in glioblastoma T98G cells whereas NF-kappaB survival signaling in glioblastoma cells for induction of apoptosis. *Neurochem Res* 2007;32(12):2194–202. DOI: 10.1007/s11064-007-9417-7.
 43. Detjen K.M., Farwig K., Welzel M. et al. Interferon gamma inhibits growth of human pancreatic carcinoma cells via caspase-1 dependent induction of apoptosis. *Gut* 2001;49(2):251–62. DOI: 10.1136/gut.49.2.251.
 44. Schmitt M.J., Philippidou D., Reinsbach S.E. et al. Interferon- γ -induced activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) up-regulates the tumor suppressing microRNA-29 family in melanoma cells. *Cell Commun Signal* 2012;10(1):41. DOI: 10.1186/1478-811X-10-41.
 45. Enzler T., Gillesen S., Manis J.P. et al. Deficiencies of GM-CSF and interferon gamma link inflammation and cancer. *J Exp Med* 2003;197(9):1213–9. DOI: 10.1084/jem.20021258.
 46. Braumüller H., Wieder T., Brenner E. et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* 2013;494(7437):361–5. DOI: 10.1038/nature11824.
 47. Zhang B., Karrison T., Rowley D.A. et al. IFN γ - and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers. *J Clin Invest* 2008;118(4):1398–404. DOI: 10.1172/JCI33522.
 48. Listopad J., Kammertoens T., Anders K. et al. Fas expression by tumor stroma is required for cancer eradication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(6):2276–81. DOI: 10.1073/pnas.1218295110.
 49. Kammertoens T., Friese C., Arina A. et al. Tumour ischaemia by interferon-gamma resembles physiological blood vessel regression. *Nature* 2017;545(7652):98–102. DOI: 10.1038/nature22311.
 50. Windbichler G.H., Hausmaninger H., Stummvoll W. et al. Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial. *Br J Cancer* 2000;82(6):1138–44. DOI: 10.1054/bjoc.1999.1053.
 51. Marijt K.A., Sluijter M., Blijleven L. et al. Metabolic stress in cancer cells induces immune escape through a PI3K-dependent blockade of IFN γ receptor signaling. *J Immunother Cancer* 2019;7(1):152. DOI: 10.1186/s40425-019-0627-8.
 52. Morgado M., Sutton M.N., Simmons M. et al. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma stimulate MUC16 (CA125) expression in breast, endometrial and ovarian cancers through NFkappaB. *Oncotarget* 2016;7(12):14871–84. DOI: 10.18632/oncotarget.7652.

Вклад авторов

В.Г. Исаева: проведение экспериментов и оценка результатов;
 Л.Ю. Привцова: разработка концепции исследования, анализ данных, написание текста статьи;
 Л.П. Жовтун: проведение экспериментов;
 С.М. Самборский: проведение экспериментов, редактирование статьи;
 Н.А. Фалалеева: научное консультирование.

Authors' contributions

V.G. Isaeva: conducting experiments and evaluating the results;
L.Y. Grivtsova: development of the research concept, data analysis, writing the text of the article;
L.P. Zhovtun: conducting experiments;
S.M. Samborskiy: conducting experiments, article editing;
N.A. Falaleeva: scientific advice.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.Г. Исаева / V.G. Isaeva: <https://orcid.org/0000-0003-0599-0691>
Л.Ю. Гривцова / L.Y. Grivtsova: <https://orcid.org/0000-0001-9103-9688>
Л.П. Жовтун / L.P. Zhovtun: <https://orcid.org/0000-0002-2166-6608>
С.М. Самборский / S.M. Samborskiy: <https://orcid.org/0000-0003-3095-4158>
Н.А. Фалалеева / N.A. Falaleeva: <https://orcid.org/0000-0002-0023-4216>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» 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 principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of A.F. Tsyba Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center, 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 Vertebrate Animals used for research and other scientific purposes.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ

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

1. Общие правила

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

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

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

Последняя страница должна содержать:

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

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

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

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

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

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

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

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

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

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

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

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

7. Иллюстративный материал

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Данные таблицы 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 граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице. Вся информация, содержащаяся в таблице, включая ее название и примечание (если есть), должна быть переведена на английский язык.

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

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

9. Список литературы

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

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

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

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

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

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

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

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

Общие положения:

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

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

Полная версия требований представлена на сайте журнала.