

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ

*Модельные системы in vivo
для исследований в онкологии*

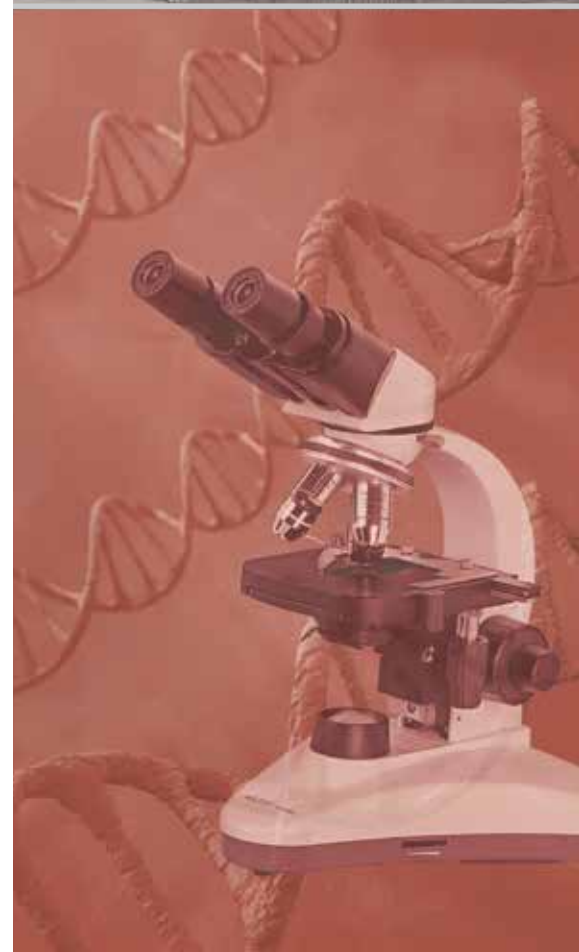
*Растительные полифенолы
в инициации канцерогенеза*

*Молекулярно-генетические аспекты
адренокортикального рака*

*Анализ внеклеточной микроРНК
крови при малоинвазивной
диагностике рака легкого*

*МикроРНК экзосом плазмы крови
и асцитической жидкости пациентов
с раком яичников*

ТОМ 10 № 2
2023

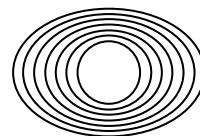


Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук. Журнал включен в Научную электронную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

2 ^{ТОМ 10}
'23

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 Е.С. Самойлова
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.
2023. Том 10. № 2. 1–132.

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2023.
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 Наталия Александровна, д.б.н., заведующая лабораторией механизмов канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

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

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

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)

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)

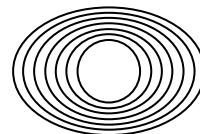
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

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. 10}
'23

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 E.S. Samoylova
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. ΦC77-57560
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.
2023. Vol. 10 No. 2. 1–132.

© PH "ABV-Press", 2023
Pressa Rossii catalogue
index: 93562.

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

1000 copies.

Free distribution.

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

EXECUTIVE EDITOR

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

EDITORIAL BOARD

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

Bozhenko, Vladimir K., MD, PhD, Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry of the Department of Pathomorphology and the Laboratory Diagnostics of the Russian Scientific Center of 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)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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

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)

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

У.А. Бокова, М.С. Третьякова, А.А. Щеголева, Е.В. Денисов Модельные системы <i>in vivo</i> для исследований в онкологии	8
С.В. Бойчук, С.А. Абдураева, П.Б. Копнин Иммунотерапия гастроинтестинальных стромальных опухолей: состояние вопроса и перспективы	17
А.В. Любителиев, А.Л. Сивкина, О.А. Власова, Г.А. Белицкий, В.М. Студитский Механизмы действия растительных полифенолов на инициацию канцерогенеза	30
Д.П. Яшина, З.А. Афанасьева Молекулярно-генетические аспекты аденокарциномы желудка	42
А.А. Шефер, Я.А. Фрик, С.Н. Тамкович Диагностический и терапевтический потенциал белков экзосом при раке молочной железы	58
Т.Н. Сотникова, Н.В. Данилова, П.Г. Мальков, Т.В. Полушкина Экспрессия лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1) при раке желудка: обзор литературы	70

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

М.Ю. Коношенко, П.П. Лактионов, Ю.А. Ланцухай, С.В. Пак, С.Э. Красильников, О.Е. Брызгунова Малоинвазивная диагностика рака легкого на основе анализа внеклеточной микроРНК крови	78
Т.Г. Гончарова, Н.А. Омарбаева, Д.Р. Кайдарова, М.Г. Оразгалиева, Л.А. Малышева Особенности метилирования CpG-сайтов некоторых генов Т-лимфоцитов периферической крови пациентов с раком молочной железы до и после лечения	90
Н.Е. Кушлинский, О.В. Ковалева, Ю.Б. Кузьмин, Е.В. Самойлова, П.Л. Прищеп, Е.С. Герштейн, С.Р. Варфоломеева, Д.В. Рогожин, Н.Ю. Соколов, К.А. Борзов, Е.А. Сушенцов, А.К. Валиев, И.С. Стилиди Содержание sEMMPRIN/CD147 в сыворотке крови больных с опухолями костей и его связь с клинико-морфологическими характеристиками заболевания	100
Е.И. Джугашвили, Н.В. Юнусова, А.И. Яловая, А.Е. Григорьева, Е.Е. Середа, Л.А. Коломиец, С.Н. Тамкович Сравнительная оценка уровней опухолеассоциированных микроРНК экзосом плазмы крови и асцитической жидкости пациентов с раком яичников	108
Н.Е. Арноцкая, Т.И. Кушнир, И.А. Кудрявцев, А.А. Митрофанов, А.Х. Бекашев, В.Е. Шевченко Идентификация предиктивных маркеров в спинномозговой жидкости больных глиобластомой	117
А.В. Шестопалов, О.И. Кит, В.В. Давыдов, Я.М. Байзянова, Е.Ю. Златник, И.А. Новикова, А.Б. Сагакянц, С.А. Апполонова, Н.Е. Москалева, С.А. Румянцев Взаимосвязь хинолоновых регуляторов <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и уровня иммуноглобулинов в крови больных раком легких	126

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ	132
------------------------------	-----

REVIEW

<i>U.A. Bokova, M.S. Tretyakova, A.A. Schegoleva, E.V. Denisov</i> In vivo models in cancer research	8
<i>S.V. Boichuk, S.A. Abduraeva, P.B. Kopnin</i> Immunotherapy of gastrointestinal stromal tumors: current view and future directions	17
<i>A.V. Lyubitelev, A.L. Sivkina, O.A. Vlasova, G.A. Belitsky, V.M. Studitsky</i> Mechanisms of action of plant polyphenols on the initiation of carcinogenesis	30
<i>D.P. Yashina, Z.A. Afanasyeva</i> Molecular genetic aspects of adrenocortical cancer	42
<i>A.A. Shefer, Ya.A. Frik, S.N. Tamkovich</i> The diagnostic and therapeutic potential of exosomal proteins in breast cancer	58
<i>T.N. Sotnikova, N.V. Danilova, P.G. Malkov, T.V. Polushkina</i> Programmed death ligand 1 (PD-L1) expression in gastric cancer: literature review	70

EXPERIMENTAL REPORT

<i>M.Yu. Konoshenko, P.P. Laktionov, Yu.A. Lancuhaj, S.V. Pak, S.E. Krasilnikov, O.E. Bryzgunova</i> Cell-free plasma miRNAs analysis for low invasive lung cancer diagnostics	78
<i>T.G. Goncharova, N.A. Omarbayeva, D.R. Kaidarova, M.G. Orazgaliyeva, L.A. Malysheva</i> The specifics of CpG islets methylation of some genes of peripheral blood T-lymphocytes in breast cancer patients before and after treatment	90
<i>N.E. Kushlinskii, O.V. Kovaleva, Yu.B. Kuzmin, E.V. Samoilova, P.L. Prishchep, E.S. Gershtein, S.R. Varfolomeeva, D.V. Rogozhin, N.Yu. Sokolov, K.A. Borzov, E.A. Sushentsov, A.K. Valiev, I.S. Stilidy</i> The content of sEMMPRIN/CD147 in the blood serum of patients with bone tumors and its relationship with the clinical and morphological characteristics of the disease	100
<i>E.I. Dzhugashvili, N.V. Yunusova, A.I. Yalovaya, A.E. Grigorieva, E.E. Sereda, L.A. Kolomiets, S.N. Tamkovich</i> Comparative assessment of the exosomal tumor-associated microRNA levels in blood plasma and ascitic fluid in ovarian cancer patients	108
<i>N.E. Arnotskaya, T.I. Kushnir, I.A. Kudryavtsev, A.A. Mitrofanov, A.Kh. Bekyashev, V.E. Shevchenko</i> Identification of predictive markers in the cerebrospinal fluid of patients with glioblastoma	117
<i>A.V. Shestopalov, O.I. Kit, V.V. Davydov, Ya.M. Baizyanova, E.Yu. Zlatnik, I.A. Novikova, A.B. Sagakyants, S.A. Appolonova, N.E. Moskaleva, S.A. Rumyantsev</i> Interrelation between <i>Pseudomonas aeruginosa</i> quinolone signal and the level of immunoglobulins in the blood of patients with lung cancer	126

INFORMATION FOR AUTHORS	132
--------------------------------------	-----

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-8-16



Модельные системы *in vivo* для исследований в онкологии

У.А. Бокова, М.С. Третьякова, А.А. Щеголева, Е.В. Денисов

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

Контакты: Устинья Анатольевна Бокова pushkay@yandex.ru

На сегодняшний день онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности населения. В понимании клеточных и физиологических процессов канцерогенеза и опухолевой прогрессии остаются существенные пробелы, заполнение которых возможно посредством использования моделей *in vivo*. В данном обзоре представлено современное состояние экспериментальных систем *in vivo*, включая сингенные модели, ксенотрансплантаты от клеток опухоли пациентов (patient-derived xenograft, PDX), модели ксенографтов с использованием клеточных культур (cell line derived xenograft, CDX) и различные типы животных – гуманизированные и генно-инженерные (genetically engineered models, GEM). Рассматриваются возможности, которые открывают животные модели: создание аватара пациента, прижизненная визуализация опухолевой миграции и инвазии на организменном уровне и оценка новых терапевтических подходов, нацеленных на первичную опухоль, метастазы и профилактику онкологических заболеваний. Обсуждаются проблемы, с которыми сталкивается исследователь при выборе оптимальной модели, предлагаются возможные пути их решения.

Ключевые слова: модель *in vivo*, аватар пациента, канцерогенез, опухолевая прогрессия

Для цитирования: Бокова У.А., Третьякова М.С., Щеголева А.А., Денисов Е.В. Модельные системы *in vivo* для исследований в онкологии. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):8–16. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-8-16

In vivo models in cancer research

U.A. Bokova, M.S. Tretyakova, A.A. Schegoleva, E.V. Denisov

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

Contacts: Ustinya Anatolyevna Bokova pushkay@yandex.ru

Cancers are one of the leading causes of mortality in the world. Cellular and physiological mechanisms of cancer development remain not well defined. *In vivo* models are an attractive approach for understanding of cancer origin and progression. This review presents current state of experimental *in vivo* systems including syngeneic models, patient-derived xenografts (PDX), cell line-derived xenografts (CDX) and various animals – humanized and genetically engineered models (GEM). These models provide opportunities for developing patients' avatars, lifetime visualization of tumor migration and invasion at the organism level, and the evaluation of new therapeutic methods aimed at primary tumors, metastases, and cancer prevention. We also discuss the problems of choosing the optimal model and potential solutions for their overcoming.

Keywords: *in vivo* model, patient avatar, carcinogenesis, tumor progression

For citation: Bokova U.A., Tretyakova M.S., Schegoleva A.A., Denisov E.V. *In vivo* models in cancer research. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2023;10(2):8–16. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-8-16

ВВЕДЕНИЕ

Рак является одной из основных причин смертности в мире наряду с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Несмотря на значительный прогресс в совре-

менных молекулярных технологиях и полученные результаты, все еще остаются пробелы в понимании механизмов канцерогенеза и опухолевой прогрессии. Соответственно, необходимы дальнейшие исследования

с использованием более эффективных моделей и инструментариев, которые позволили бы пролить свет на молекулярные и клеточные процессы, лежащие в основе формирования и прогрессирования онкологических заболеваний, обнаружить новые мишени и разработать актуальные терапевтические подходы. Одним из важных подходов в исследованиях в данной области является применение моделей *in vivo* [1].

На сегодняшний день экспериментальные модели *in vivo* отражают рост опухоли, метастазирование, взаимодействие опухолевых клеток и их микроокружения и помогают в поиске новых терапевтических мишеней и методов лечения [2]. Существует множество подходов к моделированию опухолевого заболевания на животных, включая доклинические испытания со спонтанным раком, химически или генетически индуцированные модели рака и различные модели ксенографтов. Каждая модель имеет свои достоинства и недостатки, и выбор модели зависит от поставленных задач [3]. Большое количество работ посвящено моделированию опухолевого роста и метастазирования в различные ткани и органы [4, 5]. Несмотря на то что область экспериментальных моделей довольно хорошо проработана, остается множество нерешенных проблем. Остро

стоит вопрос моделирования различных стадий заболевания, так как опухоли у животных растут быстрее, чем у людей [6]. Несовершенство моделей обуславливает высокую долю неудачных решений, разработанных в доклинических исследованиях и на этапе клинических испытаний. Поэтому выбор моделей должен базироваться на понимании их особенностей, достоинств и недостатков и исходить из поставленных задач.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ЖИВОТНЫХ

Экспериментальные системы для изучения биологии опухолей включают клеточные культуры, первичные опухолевые линии, трехмерные модели органоидов, модели *in vivo* с использованием различных животных объектов, включая *Drosophila melanogaster*, куриные эмбрионы, рыбок данио-рерио (*Danio rerio*), мышей, крыс и свиней, а также компьютерные модели. Все это составляет основу для моделирования канцерогенеза и метастазирования и исследования молекулярно-генетических характеристик данных процессов [7].

В последние десятилетия количество линий лабораторных грызунов (мышей и крыс) значительно возросло в связи с развитием генной инженерии (рис. 1).

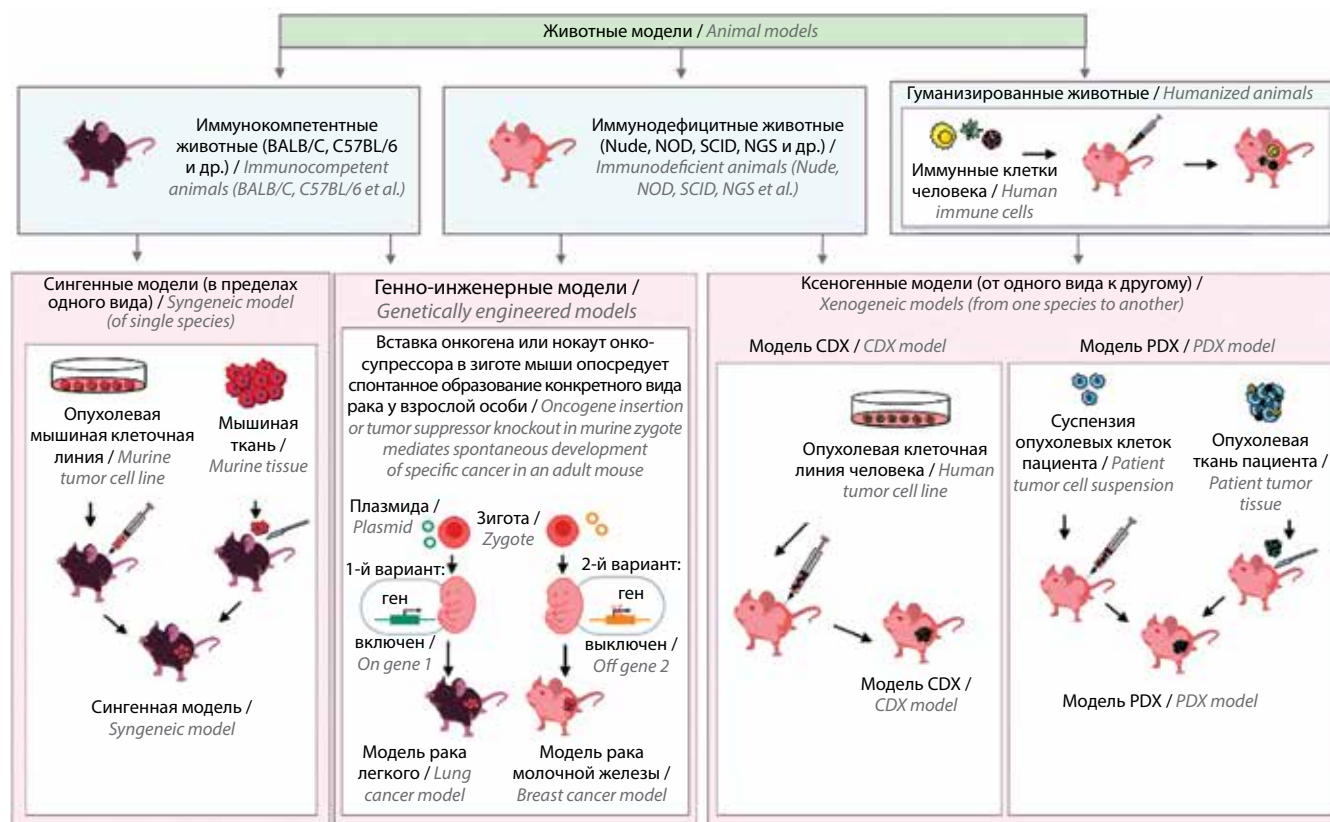


Рис. 1. Модельные системы для исследований в онкологии. Nude — «голые» мыши с отсутствием тимуса; NOD (nonobese diabetic) — мыши с аутоиммунным диабетом; SCID (severe combined immunodeficiency syndrome) — мыши с синдромом тяжелого комбинированного иммунодефицита; NSG (NOD SCID gamma) — мыши с комбинацией характеристик NOD и SCID; CDX (cell line derived xenograft) — модель ксенографта с использованием клеточных культур; PDX (patient-derived xenograft) — ксенотрансплантаты от клеток опухоли пациентов

Fig. 1. Model systems for cancer studies. Nude — nude mice without thymus; NOD (nonobese diabetic) — mice with autoimmune diabetes; SCID (severe combined immunodeficiency syndrome) — mice with severe combined immunodeficiency syndrome; NSG (NOD SCID gamma) — mice with NOD and SCID combination; CDX — cell line-derived xenograft model; PDX — patient-derived xenograft

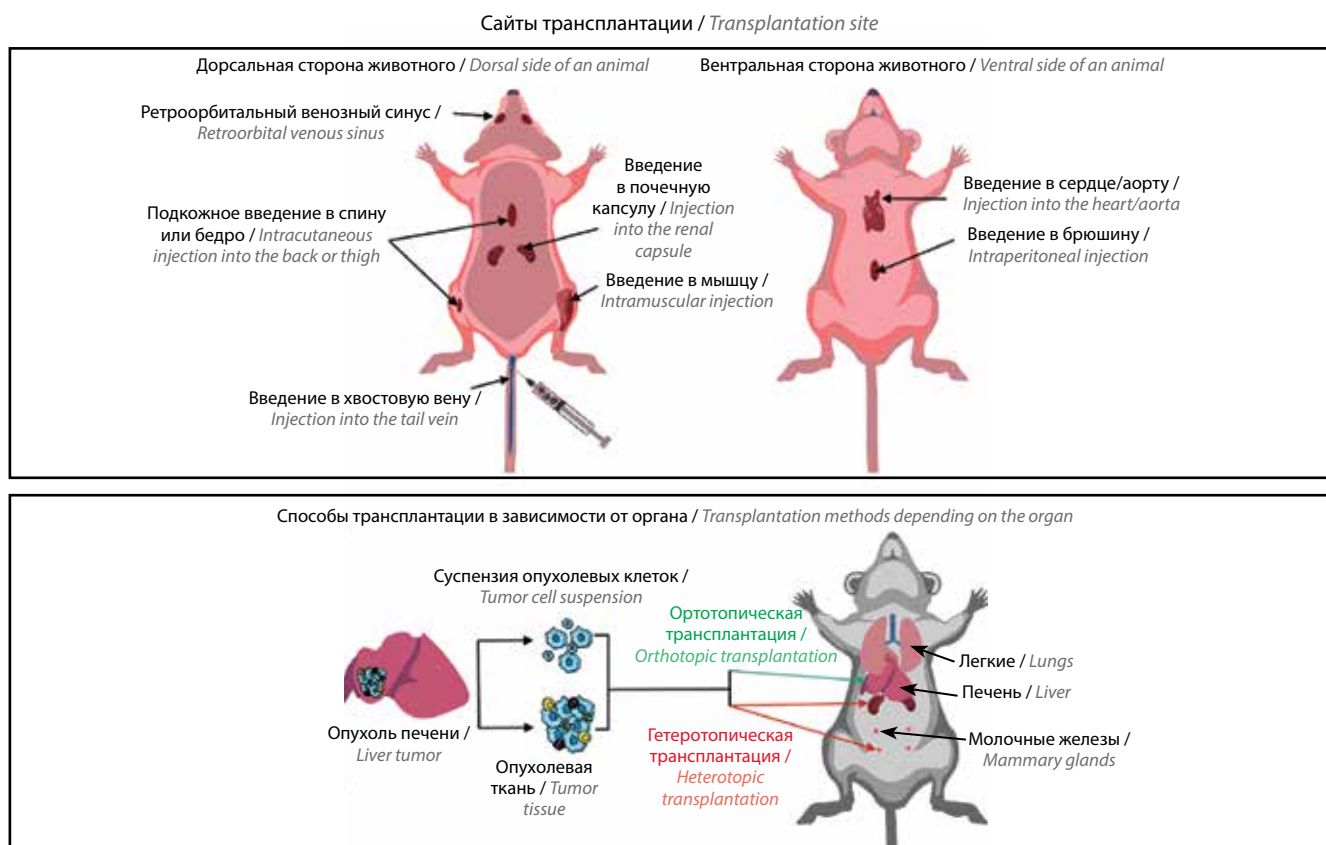


Рис. 2. Схематическое изображение сайтов и способов трансплантации опухолевых клеток
Fig. 2. Overview of tumor cell sites and transplantation methods

Помимо иммунокомпетентных животных, которые используются в моделировании злокачественных новообразований, были созданы животные с различными типами иммунодефицита: отсутствием Т-лимфоцитов (Nude), Т- и В-лимфоцитов и других иммунных клеток, а также с нарушением функции NK-клеток. Иммунодефицитных животных используют для изучения канцерогенеза, метастазирования, оценки эффективности терапии и разработки противоопухолевых препаратов, однако отсутствие иммунных клеток затрудняет исследование взаимодействия опухоли и ее микроокружения, а также влияния иммунного звена на прогрессирование заболевания [8].

Сингенные модели. Сингенные модели подразумевают трансплантацию опухолевых клеток той же инбредной линии, что и линия, из которой была получена исходная опухоль [9]. Например, при использовании мышей линий C57BL/6, BALB/с и FVB были получены клетки спонтанных, индуцированных канцерогеном мышинных опухолей, которые культивировали *in vitro* и затем применяли для дальнейшей инокуляции животным [10]. Такие клеточные линии получают после диссоциации и культивирования исходной опухоли в условиях *in vitro*. Обычно подсадка животным осуществляется местно, чаще используется подкожное введение (эктотопически), поскольку такой способ введения относительно прост и удобен для мониторинга развития и роста опухоли [11] (рис. 2).

Сингенные модели широко применяются для моделирования опухолевого заболевания из-за относительной простоты. Однако их большим недостатком является отсутствие человеческого материала в эксперименте, что усложняет трансляцию результатов в доклинические и клинические исследования [9].

Ксеногенные модели. Ксеногенные модели получают путем прямой имплантации свежих образцов чужеродных клеток, таких как клеточные культуры, клетки первичной опухоли и фрагменты опухолевой ткани, в организм экспериментального животного. Модель ксенографта с использованием клеточных культур (cell line derived xenograft, CDX) считается «золотым стандартом» доклинических исследований при изучении роста опухоли. В этой модели опухолевая культура может имплантироваться животным подкожно. Мониторинг прогрессирования заболевания возможен за счет детекции экспрессии флуоресцентных белков, например люциферазы [12]. Более того, прижизненная визуализация дает представление о взаимодействии опухоли и стромы в первичном и вторичном очагах [13]. Модель CDX имеет несколько общих характеристик с опухолями человека, поскольку представляет собой васкуляризованную трехмерную опухоль, растущую в живом организме, с собственными толерантностью к лекарственным агентам и метаболизмом [14]. К преимуществам использования клеточных линий относятся экономичность, простота,

неограниченный запас материала, воспроизводимость результатов и отсутствие этических проблем, связанных с применением тканей животных и человека [15]. Однако при интерпретации результатов следует помнить, что клеточные линии не всегда воспроизводят молекулярные особенности и фенотип первичных опухолевых клеток [16]. К недостаткам использования модели CDX можно отнести и нарушение фармакокинетики, отсутствие гетерогенности клеток, иммунной системы и микроокружения, характерного для опухолей человека [17].

Ксенотрансплантаты получают также от клеток опухоли пациентов (patient-derived xenograft, PDX) [18]. Данные модели позволяют сохранять естественное микроокружение опухоли и предоставляют возможность для персонализации терапии и трансляции результатов непосредственно на пациента [19]. При создании модели PDX обычно осуществляется ортотопическая/гетеротопическая подсадка фрагмента опухоли или введение опухолевой суспензии непосредственно в орган, что обеспечивает быстрый рост опухоли и высокую вероятность развития метастазирования [20]. Ортотопическая модель подразумевает подсадку опухолевого материала в орган, в котором локализуется первичная опухоль, гетеротопическая модель — подсадку в любой другой орган [21] (см. рис. 2). Вариантом создания моделей PDX является введение опухолевых клеток в сосудистую систему [22]. Чаще всего местом инъекции клеточной суспензии у мышей является боковая хвостовая вена. За счет введения опухолевых клеток в кровеносное русло формируются легочные метастазы, что частично объясняется первым капиллярным руслом, с которым сталкиваются инъецированные клетки, и органотропностью этих клеток [23].

Еще один вариант получения ксенографтов — из циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) — позволяет решить проблему малого количества ЦОК и избежать получения линий этих клеток, что является затруднительным [24]. Данные клетки выделяют из образцов крови онкологических пациентов и инъецируют иммунодефицитным мышам. Такой подход привлекателен, поскольку позволяет проводить молекулярный анализ и служит платформой для доклинических исследований лекарственных препаратов [25].

Гуманизированные модели. При внедрении результатов доклинических исследований в практику часто возникает проблема воспроизводимости эффективности лекарственных препаратов [9]. Значительную роль в ответе на терапию, а также в развитии и прогрессировании заболевания играет микроокружение опухоли. Для его изучения могут быть использованы модели *ex vivo* с органоидами и фрагментами опухоли, но они лишены физиологической сложности, наблюдаемой в живом организме [26]. Решить эту проблему можно с помощью гуманизированных животных с ключевыми компонентами иммунной системы человека [27] —

мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом или с дефектной рекомбинацией генов антител и рецепторов Т-клеток, нарушающих адаптивный и врожденный иммунитет. Таким мышам сначала приживляют компоненты иммунной системы человека путем введения клеток в кровоток и после оценки их жизнеспособности подсаживают ксенотрансплантаты. Возможна также единовременная инокуляция опухолевых и иммунных клеток, например, посредством инъекции суспензии из биопсийного материала и гемопоэтических клеток после их предварительной коинкубации. Данные модели подходят для изучения взаимодействия опухоли и иммунной системы, оценки роли иммунных компонентов в опухолевой прогрессии и анализа эффективности иммунотерапии [28].

Генно-инженерные модели. Генно-инженерные модели (genetically engineered models, GEM) получают на основе генетических изменений на начальных этапах эмбриогенеза с помощью плазмидных конструкций (см. рис. 1). При инициации онкогенеза (*de novo*) в организме экспериментальных животных опухолевые клетки взаимодействуют со стромой, что позволяет моделировать различные этапы канцерогенеза и метастатического каскада и изучать их с учетом влияния иммунной системы и микроокружения опухоли [4, 29]. Генетические изменения включают в себя вставку онкогена под контролем тканеспецифического промотора, например промотора MMTV (специфического для молочной железы), или нокаут опухолевых генов-супрессоров, например *TP53*. Кроме того, с помощью различных препаратов, таких как эстроген, тамоксифен, доксициклин и тетрациклин, можно влиять на уровень экспрессии онкогенов и онкосупрессоров в организме генно-инженерного животного [29]. В последние годы были разработаны GEM для рака молочной, предстательной, поджелудочной желез, легких, толстой кишки, мочевого пузыря и яичников [30].

ПРИМЕНЕНИЕ МОДЕЛЕЙ *IN VIVO* В ТЕРАПИИ

Модельные системы *in vivo* широко применяются при разработке новых методов диагностики, профилактики и лечения пациентов с онкологическими заболеваниями. Их создание является обязательным этапом разработки препаратов. В частности, GEM, сингенные и ксеногенные модели (PDX и CDX) используют для оценки эффективности лучевой, таргетной (синтезированные агенты, природные активные молекулы, моноклональные антитела и др.) терапии, химиотерапии и нанотехнологических разработок (например, наночастиц и гидрогелей) [31–33]. Применение данных моделей позволяет создавать агенты профилактического характера и препараты, нацеленные как на первичную опухоль, так и на метастазы [34–36].

Для создания ксенографтов (PDX и CDX) используют иммунодефицитных животных, что делает невозможным изучение эффективности терапевтических агентов,

нацеленных на компоненты иммунной системы [37–39]. Однако модель PDX, созданная с применением гуманизированных животных, позволяет оценить ответ на иммунотерапию [39–41]. В свою очередь, подходы с применением иммунокомпетентных животных, в частности GEM и сингенных моделей, дают возможность проанализировать эффективность различных иммунотерапевтических методов, таких как блокада иммунных контрольных точек, противоопухолевые вакцины и CAR-T-клеточная терапия (CAR – chimeric antigen receptor, химерный антигенный рецептор) [34, 42].

Известен также более комплексный подход к оценке эффективности препаратов, при котором доклинические исследования на GEM-мышьях идут параллельно с клиническими испытаниями I–II фазы (Co-clinical trial project) [43]. Эксперимент включает сбор, сравнение и интеграцию данных о мутационном профиле, уровнях матричной РНК (мРНК), белков и метаболитов, а также о чувствительности к терапевтическим агентам, полученных в ходе анализа опухолевого материала GEM и пациентов [43]. Окончательные результаты, полученные на GEM, помогают определить молекулярно-генетические признаки, приводящие к развитию лекарственной устойчивости, и стратифицировать пациентов в зависимости от ответа на терапию [43].

Модели PDX помимо использования в разработке новых терапевтических средств нашли широкое применение для создания аватаров пациентов, позволяющих подбирать терапевтический режим индивидуально для каждого больного [31, 35, 36]. Например, модель MiniPDX, полученная на мышьях, способствовала улучшению прогноза у больных раком желчного пузыря и желудка за счет подбора персонализированного режима лечения [44–46]. Применение моделей PDX на рыбках данио-рерио позволило предсказать эффективность терапии немелкоклеточного рака легкого эрлотинибом и паклитакселем, которая совпала с реальным ответом в клинической практике [47]. Важно отметить, что с помощью моделей на этих рыбках была получена информация о вероятности метастазирования в лимфатические узлы [47]. В другом исследовании гуманизированные PDX-модели мышья оказались эффективным инструментом для предсказания эффективности иммунотерапии у пациентов с меланомой [39, 48].

Таким образом, использование животных моделей является полезным и эффективным подходом к оценке эффективности новых терапевтических средств, принятии решений о целесообразности назначения таргетной и иммунотерапии и персонализации лечения [37, 39].

ПРОБЛЕМЫ ПОИСКА ИДЕАЛЬНОЙ МОДЕЛИ

Несмотря на большое количество исследований в области экспериментального моделирования канцерогенеза и метастазирования *in vivo*, идеальной

(универсальной) модели все еще не существует [9]. Это связано с тем, что у каждого варианта есть как достоинства, так и недостатки (см. таблицу). Одной из главных проблем является отсутствие внутриопухолевой гетерогенности, главным образом клонального и фенотипического разнообразия опухолевых клеток, наблюдаемого в реальной клинической практике. Соответственно, моделирование генетического разнообразия опухолей человека в животных моделях позволит более точно предсказывать и определять ответ на терапию. В данной ситуации необходимо правильно выбрать метод, который даст возможность оценить соответствие генотипических и фенотипических характеристик моделей и опухолей человека. Еще одна проблема – невозможность воссоздания сложной структуры и клеточного состава микроокружения опухоли в экспериментальных моделях. Моделирование опухолевого микроокружения необходимо для изучения лекарственной резистентности многих видов рака при использовании различных стратегий. Для решения обозначенной выше проблемы используют гуманизированных мышьях, но существенными недостатками этой модели являются высокая смертность животных на ранних эмбриональных стадиях после генетического редактирования и развитие синдрома «трансплантат против хозяина» [49]. На сегодняшний день механизмы данного синдрома до конца не ясны, но при его наличии обнаруживаются Т-клетки, экспрессирующие CD4 и CD8. Введение антител против CD4 и CD8 защищает мышьях от гибели, но в будущем понадобятся более совершенные модели опухолевой резистентности, которые позволят повысить эффективность ответа на терапию. Также к недостаткам ксеногенных, генно-инженерных и гуманизированных моделей относятся техническая сложность их создания, что требует навыков микрохирургии и генетического редактирования, и высокая стоимость, связанная с трудоемкостью и длительностью реализации этих моделей. Тем не менее, несмотря на многочисленные ограничения, каждая модель уникальна и находит свое применение в экспериментальных исследованиях в онкологии (см. таблицу).

Вероятно, недостатки моделей могут компенсировать персонализированный подход и тщательное планирование проекта с учетом конкретной задачи. Логично использовать несколько моделей, чтобы недостатки одной модели компенсировать достоинствами другой. Однако с учетом гуманного отношения к животным и принципов международной конвенции по отношению к ним этот подход может не найти одобрения в научном сообществе. Поэтому, исходя из минимизации использования животных, необходимо создавать более сложные многокомпонентные модели, решающие сразу несколько экспериментальных задач. К тому же именно разработка многокомпонентной животной модели с иммунной составляющей и генетическими изменениями наиболее точно имитирует онкогенез и опухолевую прогрессию. Еще одним

способом снижения числа животных, включенных в эксперимент, является прижизненный мониторинг заболевания с помощью флуоресцентных белков, который позволяет оценивать в динамике взаимодействие опухоли и стромы в первичных и метастатических очагах [36].

Таким образом, ксенографты являются наиболее универсальной экспериментальной платформой для исследования механизмов формирования, роста и прогрессии опухоли и успешно применяются на этапе доклинического тестирования эффективности лекарственных препаратов. Несмотря на критику экспериментов на животных, особенно при внедрении научных разработок в клиническую практику, в настоящее время без моделей *in vivo* не обойтись, хотя такие попытки предпринимаются посредством создания

органоидов или математических моделей [28]. В частности, подобные модели уже спроектированы для папиллярной карциномы щитовидной железы [50, 51].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модели *in vivo* актуальны и высокоэффективны в онкологии. Тем не менее не существует универсальной модели для выполнения различного рода исследований. Каждая из них разработана под конкретную задачу и имеет как достоинства, так и недостатки, поэтому при выборе модельной системы необходимо руководствоваться рядом критериев, среди которых объем и содержание поставленных задач, риски, стоимость эксперимента, наличие подготовленных специалистов, техническая сложность и длительность создания модели.

Характеристики экспериментальных моделей in vivo

Characteristics of in vivo models

Модели Models	Достоинства Advantages	Недостатки Disadvantages	Применение Application	Источник Source
Сингенные Syngeneic	Доступность и большое количество исходного материала. Availability and large amount of initial material. Простота создания и применения. Simple development and use. Высокий уровень приживаемости клеток. High cell survival. Воспроизводимый и предсказуемый быстрый рост опухолей. Repeatable and predictable fast tumor growth. Низкая стоимость животных Low cost of animals	Отсутствие нативного микроокружения опухоли. Absence of native tumor microenvironment. Относительно небольшое разнообразие трансплантируемых клеточных линий. Relatively small variety of transplanted cell lines. Отсутствие внутриопухолевой гетерогенности. Absence of intratumoral heterogeneity. Невозможность трансляции результатов в клинические исследования Impossible to translate results into clinical trials	Оценка токсичности и эффективности препаратов. Evaluation of drug toxicity and effectiveness. Изучение биологии опухолевых роста и прогрессии Study of biology of tumor growth and progression	[52, 53]
Ксеногенные модели CDX Xenogeneic CDX models	Быстрый рост опухоли. Fast tumor response. Относительная простота создания ксенографта. Relative simplicity of xenograft development. Возможность отслеживания миграции клеток за счет флуоресцентных белков. Opportunity to follow cell migration using fluorescent proteins. Высокая воспроизводимость результатов High repeatability of results	Отсутствие операционного материала в эксперименте. Absence of surgical material in the experiment. Отсутствие взаимодействия опухолевых клеток и стромы. Absence of interactions between tumor and stroma. Отсутствие взаимодействия опухолевых клеток и иммунной системы Absence of interactions between tumor and immune cells	Оценка токсичности и эффективности препаратов. Evaluation of drug toxicity and effectiveness. Изучение биологии опухолевых роста и прогрессии. Study of biology of tumor growth and progression. Разработка и доклинические исследования новых препаратов. Development and preclinical trials of new drugs. Подбор персонализированной терапии (создание аватара пациента) Selection of personalized therapy (development of a patient avatar)	[12, 54]

Окончание таблицы

The end of table

Модели Models	Достоинства Advantages	Недостатки Disadvantages	Применение Application	Источник Source
Ксеногенные модели PDX Xenogeneic PDX model	Отражение гетерогенности опухоли. Reflects tumor heterogeneity. Трансплантация человеческого опухолевого материала. Transplantation of human tumor material. Изучение взаимодействия между опухолевыми и иммунными клетками и микроокружением опухоли Study of interaction between tumor cells and immune cells and tumor microenvironment	Низкая доступность и сложность хранения/транспортировки операционного материала. Сложность создания ксенографта, необходимость навыков микрохирургии. Low availability and complicated storage/transport of surgical materials. Complicated xenograft development, necessity of microsurgical skills	Оценка токсичности и эффективности препаратов. Evaluation of drug toxicity and effectiveness. Изучение биологии опухолевых роста и прогрессии. Study of biology of tumor growth and progression. Разработка и доклинические исследования новых препаратов. Development and preclinical trials of new drugs. Подбор персонализированной терапии (создание аватара пациента) Selection of personalized therapy (development of a patient avatar)	[12, 54]
Генно-инженерные Genetically engineered	Изучение взаимодействия опухоли со стромой. Study of tumor interaction with stroma. Возможность отслеживания поэтапного развития опухоли. Opportunity to follow stages of tumor development. Изучение взаимодействия между опухолевыми и иммунными клетками, микроокружением опухоли Study of interaction between tumor cells and immune cells and tumor microenvironment	Высокая эмбриональная смертность животных при создании модели. High embryonic mortality of animals during model creation. Изменчивость фенотипического проявления встроенных и нокаутированных генов. Variability of phenotypical manifestation of introduced and deactivated genes. Высокая стоимость животного. High cost of animals. Длительность создания и поддержания модели Long time for model creation and maintenance	Исследование роли генов в онкогенезе. Study of gene role in oncogenesis. Изучение биологии опухолевых роста и прогрессии. Study of biology of tumor growth and progression. Разработка новых препаратов. Development of new drugs. Оценка эффективности иммунотерапии Evaluation of immunotherapy effectiveness	[55, 56]
Гуманизированные Humanized	Изучение взаимодействия между опухолевыми и иммунными клетками, микроокружением опухоли. Study of interaction between tumor cells and immune cells and tumor microenvironment. Приближение к физиологии и патологии человека Close to human physiology and pathology	Высокая смертность животных в связи с синдромом «трансплантат против хозяина». High animal mortality due to transplant versus host syndrome. Высокая стоимость животных и создания модели. High cost of animals and model development. Сложность работы и поддержания модели Complicated use and model maintenance	Разработка и доклинические исследования новых препаратов. Development and preclinical study of new drugs. Поиск новых мишеней для терапии. Search for new therapy targets. Изучение биологии опухолевых роста и прогрессии, прогнозирование течения заболевания. Study of biology of tumor growth and progression, prediction of disease progression. Оценка эффективности иммунотерапии Evaluation of immunotherapy effectiveness	[57]

Примечание. CDX — cell line derived xenograft, модель ксенографта с использованием клеточных культур; PDX — patient-derived xenograft, ксенотрансплантаты от клеток опухоли пациентов.

Note. CDX — cell line derived xenograft; PDX — patient-derived xenograft.

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

- Giacobbe A., Abate-Shen C. Modeling metastasis in mice: a closer look. *Trends Cancer* 2021;7(10):916–29. DOI: 10.1016/j.trecan.2021.06.010
- Roarty K., Echeverria G.V. Laboratory models for investigating breast cancer therapy resistance and metastasis. *Front Oncol* 2021;11:645698. DOI: 10.3389/fonc.2021.645698
- Simmons J.K., Hildreth B.E., Supsavhad W. et al. Animal models of bone metastasis. *Vet Pathol* 2015;52(5):827–41. DOI: 10.1177/0300985815586223
- Gómez-Miragaya J., Morán S., Calleja-Cervantes M.E. et al. The altered transcriptome and DNA methylation profiles of docetaxel resistance in breast cancer PDX models. *Mol Cancer Res* 2019;17(10):2063–76. DOI: 10.1158/1541-7786.mcr-19-0040
- Lefley D., Howard F., Arshad F. et al. Development of clinically relevant *in vivo* metastasis models using human bone discs and breast cancer patient-derived xenografts. *Breast Cancer Res* 2019;21(1):130. DOI: 10.1186/s13058-019-1220-2
- Kopetz S., Lemos R., Powis G. The promise of patient-derived xenografts: The best laid plans of mice and men. *Clin Cancer Res* 2012;18(19):5160–2. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-12-2408
- Souto E.P., Dobrolecki L.E., Villanueva H. et al. *In vivo* modeling of human breast cancer using cell line and patient-derived xenografts. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2022;27(2):211–30. DOI: 10.1007/s10911-022-09520-y
- Chen J., Liao S., Xiao Z. et al. The development and improvement of immunodeficient mice and humanized immune system mouse models. *Front Immunol* 2022;13:1007579. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1007579
- Connolly K.A., Fitzgerald B., Damo M. et al. Novel mouse models for cancer immunology. *Ann Rev Cancer Biol* 2022;6(1):269–91. DOI: 10.1146/annurev-cancerbio-070620-105523
- Olson B., Li Y., Lin Y. et al. Mouse models for cancer immunotherapy research. *Cancer Discov* 2018;8(11):1358–65. DOI: 10.1158/2159-8290.cd-18-0044
- Lei Z.-N., Teng Q.-X., Gupta P. et al. Cabozantinib reverses topotecan resistance in human non-small cell lung cancer NCI-H460/TPT10 cell line and tumor xenograft model. *Front Cell Develop Biol* 2021;9:640957. DOI: 10.3389/fcell.2021.640957
- Terracina K.P., Aoyagi T., Huang W.C. et al. Development of a metastatic murine colon cancer model. *J Surg Res* 2015;199(1):106–14. DOI: 10.1016/j.jss.2015.04.030
- Hapach L.A., Mosier J.A., Wang W. et al. Engineered models to parse apart the metastatic cascade. *NPG Precis Oncol* 2019;3(1):20. DOI: 10.1038/s41698-019-0092-3
- Komen J., van Neerven S.M., van den Berg A. et al. Mimicking and surpassing the xenograft model with cancer-on-chip technology. *EBioMedicine* 2021;66:103303. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103303
- Kaur G., Dufour J.M. Cell lines: valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* 2012;2(1):1–5. DOI: 10.4161/spmg.19885
- Kamińska K., Szczylik C., Bielecka Z.F. et al. The role of the cell-cell interactions in cancer progression. *J Cell Mol Med* 2015;19(2):283–96. DOI: 10.1111/jcmm.12408
- Hutchinson L., Kirk R. High drug attrition rates – where are we going wrong? *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8(4):189–90. DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.34
- Strowitzki M.J., Dold S., von Heesen M. et al. The phosphodiesterase 3 inhibitor cilostazol does not stimulate growth of colorectal liver metastases after major hepatectomy. *Clin Exp Metastasis* 2014;31(7):795–803. DOI: 10.1007/s10585-014-9669-y
- Chijiwa T., Kawai K., Noguchi A. et al. Establishment of patient-derived cancer xenografts in immunodeficient NOG mice. *Int J Oncol* 2015;47(1):61–70. DOI: 10.3892/ijo.2015.2997
- Тимофеева Н.Ю., Бубнова Н.В., Стручко Г.Ю. и др. Методы экспериментального моделирования метастазирования. *Биомедицина* 2021;17(4):44–9. DOI: 10.33647/2074-5982-17-4-44-49
- Timofeeva N., Bubnova N., Struchko G. et al. Methods of experimental modeling of metastasis. *Biomedicina = Biomedicine* 2021;17:44–9. (In Russ.). DOI: 10.33647/2074-5982-17-4-44-49
- Santana-Krimskaya S.E., Kawas J.R., Zarate-Triviño D.G. et al. Orthotopic and heterotopic triple negative breast cancer preclinical murine models: a tumor microenvironment comparative. *Res Vet Sci* 2022;152:364–71. DOI: 10.1016/j.rvsc.2022.08.026
- Bocuk D., Wolff A., Krause P. et al. The adaptation of colorectal cancer cells when forming metastases in the liver: expression of associated genes and pathways in a mouse model. *BMC Cancer* 2017;17(1):342. DOI: 10.1186/s12885-017-3342-1
- Khanna C., Hunter K. Modeling metastasis *in vivo*. *Carcinogenesis* 2005;26(3):513–23. DOI: 10.1093/carcin/bgh261
- Risbridger G.P., Toivanen R., Taylor R.A. Preclinical models of prostate cancer: patient-derived xenografts, organoids, and other explant models. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018;8(8):a030536. DOI: 10.1101/cshperspect.a030536
- Liu J., Lian J., Chen Y. et al. Circulating tumor cells (CTCs): a unique model of cancer metastases and non-invasive biomarkers of therapeutic response. *Front Genet* 2021;12:734595. DOI: 10.3389/fgene.2021.734595
- Zanella E.R., Grassi E., Trusolino L. Towards precision oncology with patient-derived xenografts. *Nat Rev Clin Oncol* 2022;19(11):719–32. DOI: 10.1038/s41571-022-00682-6
- Ye W., Chen Q. Potential applications and perspectives of humanized mouse models. *Annu Rev Anim Biosci* 2022;10:395–417. DOI: 10.1146/annurev-animal-020420-033029
- Wang J., Chen C., Wang L. et al. Patient-derived tumor organoids: new progress and opportunities to facilitate precision cancer immunotherapy. *Front Oncol* 2022;12:872531. DOI: 10.3389/fonc.2022.872531
- Gómez-Cuadrado L., Tracey N., Ma R. et al. Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis Model Mech* 2017;10(9):1061–74. DOI: 10.1242/dmm.030403
- Morton J.J., Bird G., Refaeli Y. et al. Humanized mouse xenograft models: narrowing the tumor-microenvironment gap humanized mouse xenograft models. *Cancer Res* 2016;76(21):6153–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1260
- Hegde M., Naliyadhara N., Unnikrishnan J. et al. Nanoparticles in the diagnosis and treatment of cancer metastases: current and future perspectives. *Cancer Lett* 2023;556:216066. DOI: 10.1016/j.canlet.2023.216066
- Hu R., Li Y., Guo Y. et al. BRD4 inhibitor suppresses melanoma metastasis via the SPINK6/EGFR-EphA2 pathway. *Pharmacol Res* 2023;187:106609. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106609
- Liu M., Xie L., Zhang Y. et al. Inhibition of CEMIP potentiates the effect of sorafenib on metastatic hepatocellular carcinoma by reducing the stiffness of lung metastases. *Cell Death Dis* 2023;14(1):25. DOI: 10.1038/s41419-023-05550-4
- Mallya K., Gautam S.K., Aithal A. et al. Modeling pancreatic cancer in mice for experimental therapeutics. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2021;1876(1):188554. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188554
- Xu H., Zheng H., Zhang Q. et al. A multicentre clinical study of sarcoma personalised treatment using patient-derived tumour xenografts. *Clin Oncol* 2023;35(1):e48–59. DOI: 10.1016/j.clon.2022.06.002
- Entenberg D., Oktay M.H., Condeelis J.S. Intravital imaging to study cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2023;23(1):25–42. DOI: 10.1038/s41568-022-00527-5
- Haddad A.F., Young J.S., Amara D. et al. Mouse models of glioblastoma for the evaluation of novel therapeutic strategies. *Neuro-Oncol Adv* 2021;3(1):vdab100. DOI: 10.1093/oaajnl/vdab100
- Bahcecioglu G., Basara G., Ellis B.W. et al. Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment. *Acta Biomaterialia* 2020;106:1–21. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.02.006

39. Abdolahi S., Ghazvinian Z., Muhammadnejad S. et al. Patient-derived xenograft (PDX) models, applications and challenges in cancer research. *J Transl Med* 2022;20(1):206. DOI: 10.1186/s12967-022-03405-8
40. Sobarzo A., Roisman L., Pikovsky O. et al. A36 patient-specific humanized PDX model for overcoming tumor resistance to immune checkpoint inhibitors in NSCLC patients. *J Thoracic Oncol* 2020;15(2):S24. DOI: 10.1016/j.jtho.2019.12.065
41. Helleday T. Using personalized immune-humanized xenograft mouse models to predict immune checkpoint responses in malignant melanoma: potential and hurdles. *Ann Oncol* 2020;31(2):167–8. DOI: 10.1016/j.annonc.2019.11.007
42. Xu T., Karschnia P., Cadilha B.L. et al. *In vivo* dynamics and anti-tumor effects of EpCAM-directed CAR T-cells against brain metastases from lung cancer. *Oncoimmunology* 2023;12(1):2163781. DOI: 10.1080/2162402x.2022.2163781
43. Nardella C., Lunardi A., Patnaik A. et al. The APL paradigm and the “co-clinical trial” project. *Cancer Discov* 2011;1(2):108–16. DOI: 10.1158/2159-8290.cd-11-0061
44. Wang J., Huang J., Wang H. et al. Personalized treatment of advanced gastric cancer guided by the MiniPDX model. *J Oncol* 2022;2022:1987705. DOI: 10.1155/2022/1987705
45. Zhan M., Yang R.-M., Wang H. et al. Guided chemotherapy based on patient-derived mini-xenograft models improves survival of gallbladder carcinoma patients. *Cancer Commun* 2018;38(1):48. DOI: 10.1186/s40880-018-0318-8
46. Zhang F., Wang W., Long Y. et al. Characterization of drug responses of mini patient-derived xenografts in mice for predicting cancer patient clinical therapeutic response. *Cancer Commun* 2018;38(1):60. DOI: 10.1186/s40880-018-0329-5
47. Ali Z., Vildevall M., Rodriguez G.V. et al. Zebrafish patient-derived xenograft models predict lymph node involvement and treatment outcome in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2022;41(1):58. DOI: 10.1186/s13046-022-02280-x
48. Ny L., Rizzo L.Y., Belgrano V. et al. Supporting clinical decision making in advanced melanoma by preclinical testing in personalized immune-humanized xenograft mouse models. *Ann Oncol* 2020;31(2):266–73. DOI: 10.1016/j.annonc.2019.11.002
49. Кит О., Максимов А., Протасова Т. и др. Гуманизированные мыши: методы получения, модели и использование в экспериментальной онкологии (обзор). *Биомедицина* 2019;15(4): 67–81. DOI: 10.33647/2074-5982-15-4-67-81
- Kit O., Maksimov A., Protasova T. et al. Humanized mice: production methods, models and use in experimental oncology (review). *Biomedicina = Biomedicine* 2019;15(4):67–81. (In Russ.).
50. Watabe T., Kaneda-Nakashima K., Liu Y. et al. Enhancement of ²¹¹At uptake via the sodium iodide symporter by the addition of ascorbic acid in targeted α -therapy of thyroid cancer. *J Nucl Med* 2019;60(9):1301–7. DOI: 10.2967/jnumed.118.222638
51. Yonekura Y., Toki H., Watabe T. et al. Mathematical model for evaluation of tumor response in targeted radionuclide therapy with ²¹¹At using implanted mouse tumor. *Int J Mol Sci* 2022;23(24):15966. DOI: 10.3390/ijms232415966
52. Zeng Z., Wong C.J., Yang L. et al. TISMO: syngeneic mouse tumor database to model tumor immunity and immunotherapy response. *Nucl Acids Res* 2022;50(D1):D1391–7. DOI: 10.1093/nar/gkab804
53. Keinan N., Scharff Y.E., Goldstein O. et al. Syngeneic leukemia models using lentiviral transgenics. *Cell Death Dis* 2021;12(2):193. DOI: 10.1038/s41419-021-03477-2
54. Mendonça-Gomes J.M., Valverde T.M., Martins T.M.D.M. et al. Long-term dexamethasone treatment increases the engraftment efficiency of human breast cancer cells in adult zebrafish. *Fish Shellfish Immunol Rep* 2021;2:100007. DOI: 10.1016/j.fsirep.2021.100007
55. Wang Z., Wu V.H., Allevato M.M. et al. Syngeneic animal models of tobacco-associated oral cancer reveal the activity of in situ anti-CTLA-4. *Nat Commun* 2019;10(1):5546. DOI: 10.1038/s41467-019-13471-0
56. Нехаева Т., Чернов А., Торопова Я. и др. Разнообразие опухолевых моделей для тестирования противоопухолевой активности веществ у мышей. *Вопросы онкологии* 2020;66(4):353–63. DOI: 10.37469/0507-3758-2020-66-4-353-363
- Nekhaeva T., Chernov A., Toropova Ya. et al. A variety of tumor models for testing the antitumor activity of substances in mice. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2020;66(4):353–63. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2020-66-4-353-363
57. Tian H., Lyu Y., Yang Y.G. et al. Humanized rodent models for cancer research. *Front Oncol* 2020;10:1696. DOI: 10.3389/fonc.2020.01696.

Вклад авторов

У.А. Бокова: обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи;
 М.С. Третьякова: обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи;
 А.А. Щеголева: обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи, оформление иллюстративного материала;
 Е.В. Денисов: редактирование статьи.

Authors' contribution

U.A. Bokova: literature review on the topic of the article, article writing;
 M.S. Tretyakova: literature review on the topic of the article, article writing;
 A.A. Schegoleva: literature review on the topic of the article, article writing, design of illustrative material;
 E.V. Denisov: article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

У.А. Бокова / U.A. Bokova: <https://orcid.org/0000-0003-2179-5685>
 М.С. Третьякова / M.S. Tretyakova: <https://orcid.org/0000-0002-5040-931X>
 А.А. Щеголева / A.A. Schegoleva: <https://orcid.org/0000-0002-2633-9884>
 Е.В. Денисов / E.V. Denisov: <https://orcid.org/0000-0003-2923-9755>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-75-10060).

Funding. This study was supported by the Russian Science Foundation (project No. 20-75-10060).

Статья поступила: 08.04.2023. **Принята к публикации:** 05.05.2023.

Article submitted: 08.04.2023. **Accepted for publication:** 05.05.2023.

Иммунотерапия гастроинтестинальных стромальных опухолей: состояние вопроса и перспективы

С.В. Бойчук¹⁻³, С.А. Абдураева¹, П.Б. Копнин⁴

¹Кафедра общей патологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 49;

²Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18, корп. 1;

³кафедра радиотерапии и радиологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1;

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Сергей Васильевич Бойчук boichuksergei@mail.ru

Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) происходят от веретенновидных интерстициальных клеток Кахаля и характеризуются наличием мутаций в генах *KIT* и *PDGFRA*, кодирующих одноименные тирозинкиназные рецепторы. Основным принципом лекарственной терапии пациентов с данными новообразованиями (в том числе неоперабельных, рецидивирующих и метастатических форм) является назначение им таргетных препаратов, ингибирующих активность вышеуказанных рецепторных тирозинкиназ. Несмотря на высокую эффективность этих лекарственных средств, в первую очередь иматиниба мезилата (гливек), в лечении ГИСО, у подавляющего большинства пациентов спустя 1,5–2 года после начала таргетной терапии развивается резистентность опухоли к данным препаратам, что диктует необходимость пересмотра тактики лечения и последующего назначения препаратов терапии 2, 3 и 4-й линий. В обзоре рассматриваются основные молекулярно-генетические варианты ГИСО, современные принципы их лечения, а также механизмы первичной и вторичной резистентности данных новообразований к таргетным препаратам. Также описываются механизмы взаимодействия клеток иммунной системы с ГИСО, взаимосвязь мутационного и иммунного профилей опухолей, перспективные подходы к иммунотерапии этих новообразований и приводятся данные о текущих клинических испытаниях, направленных на коррекцию основных звеньев иммунной системы у пациентов с ГИСО.

Ключевые слова: гастроинтестинальные стромальные опухоли, молекулярно-генетический профиль, первичная резистентность, вторичная резистентность, таргетные препараты, иммунное микроокружение, иммунотерапия

Для цитирования: Бойчук С.В., Абдураева С.А., Копнин П.Б. Иммунотерапия гастроинтестинальных стромальных опухолей: состояние вопроса и перспективы. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):17–29. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-17-29

Immunotherapy of gastrointestinal stromal tumors: current view and future directions

S. V. Boichuk¹⁻³, S. A. Abduraeva¹, P. B. Kopnin⁴

¹Department of Pathology of Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 49 Butlerova St., Kazan 420012, Russia;

²“Biomarker” Research Laboratory, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Bld. 1, 18 Kremlevskaya St.; Kazan 420008, Russia;

³Department of Radiotherapy and Radiology of Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 Barricadnaya St., Moscow 125993, Russia;

⁴N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia

Contacts: Sergei Vasilievich Boichuk boichuksergei@mail.ru

Gastrointestinal stromal tumors (GIST) are most common mesenchymal tumors in gastrointestinal tract which originate from interstitial cells of Cajal and characterized by the mutations in the *KIT* or *PDGFRA* tyrosine kinase receptors. Thus,

the common therapeutic approach for GIST therapy (including metastatic, recurrent and non-resectable forms) is based on inhibition of activities of receptor tyrosine kinases indicated above by corresponding receptor tyrosine kinase inhibitors, including first-line therapeutic agent imatinib mesylate – Gleevec. Despite of high efficacy of IM-based therapy, most of GIST patients acquire resistance to this receptor tyrosine kinase inhibitor, which in turn requires second-, third- and fourth-line therapies. The review also describes the common molecular and genetic variants of GIST and the mechanisms of primary and secondary GIST resistance to the targeted-based therapies. In addition, the role of immune microenvironment in GIST and its relationship with tumor's mutational burden are discussed in detail, thereby illustrating the immunotherapy as one of the attractive future directions for GIST therapy. Lastly, the manuscript provides the information about the ongoing clinical trials of GIST immunotherapy.

Keywords: gastrointestinal stromal tumors, molecular and genetic profile, primary resistance, secondary resistance, targeted drugs, immune microenvironment, immunotherapy

For citation: Boichuk S.V., Abduraeva S.A., Kopnin P.B. Immunotherapy of gastrointestinal stromal tumors: current view and future directions. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023; 10(2):17–29. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-17-29

ВВЕДЕНИЕ

Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) представляют собой злокачественные мезенхимальные новообразования желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), происходящие от веретенновидных интерстициальных клеток Кахала, которые выполняют функцию пейсмейкеров, регулирующих перистальтику ЖКТ [1]. В структуре онкологических заболеваний пищеварительного тракта доля ГИСО составляет не более 1–2 %, тем не менее они являются самыми распространенными мезенхимальными опухолями этой локализации (80 % случаев) [2]. Частота встречаемости ГИСО у представителей европеоидной расы в 2 раза ниже, чем у представителей негроидной расы, и в 1,5 раза меньше, чем у представителей других рас. В России данная патология несколько чаще диагностируется у женщин (57,5 %); средний возраст заболевших составляет 54,4 года [3].

Гастроинтестинальные стромальные опухоли могут развиваться в любом отделе пищеварительного тракта, но наиболее часто они локализуются в желудке (50–60 % случаев) и тонкой кишке (25–35 % случаев); гораздо реже данная патология обнаруживается в ободочной кишке (5 % случаев) и прямой кишке (5 % случаев). Экстрагастральные ГИСО крайне редко выявляют в брыжейке, сальнике и пищеводе [3–5]. Наиболее распространенными клиническими симптомами ГИСО являются дискомфорт и боли в животе, тошнота, потеря массы тела, утомляемость, желудочно-кишечные кровотечения. Кровотечения варьируют от хронических скрытых, часто приводящих к анемии, до острых угрожающих жизни эпизодов мелены или кровавой рвоты. Иногда при ГИСО наблюдаются другие неотложные состояния, такие как кишечная непроходимость или разрыв опухоли с гемоперитонеумом. Почти треть этих опухолей выявляют случайно во время хирургических, визуализирующих процедур или эндоскопического скрининга рака желудка. Некоторые ректальные ГИСО обнаруживают при осмотре предстательной железы или в ходе гинекологического осмотра [6].

Большинство выявляемых в настоящее время ГИСО представляют собой локализованные опухоли размером <5 см. В целом эти новообразования тонкой кишки крупнее, а количество метастазирующих опухолей больше по сравнению с ГИСО желудка. Брюшная полость и печень являются типичными местами метастазирования данных опухолей, в то время как костные, кожные и периферические метастазы в мягких тканях встречаются редко. В отличие от других разновидностей сарком злокачественные ГИСО очень редко метастазируют в легкие, даже если они имеют обширные метастазы другой локализации. В то время как при некоторых ГИСО метастазы развиваются в течение 1–2 лет или ранее, метастатическое распространение опухоли обычно происходит после длительного временного интервала [6]. Это обуславливает необходимость длительного наблюдения за пациентами с ГИСО. Чрезвычайная вариабельность клинического течения и прогноза заболевания связана с разной чувствительностью к применяемой в настоящее время таргетной терапии, а также с тем, что ГИСО представляют собой чрезвычайно гетерогенную группу опухолей, различающихся как по гистологическому строению (эпителиоидно-клеточный, веретенноклеточный и смешанный типы), локализации и размеру новообразования, так и по молекулярно-генетическому статусу [7].

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

В настоящее время установлено, что основным патогенетическим фактором ГИСО является наличие в опухолевых клетках активирующих мутаций протоонкогена *KIT* [8]. Гиперэкспрессия *KIT* выявляется в 75–85 % случаев всех ГИСО и обуславливает их интенсивное иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание антителами к антигену CD117, являющееся в настоящее время одним из основных диагностических критериев данной патологии [9, 10]. Паттерн мутаций *KIT* в ГИСО весьма разнообразен и включает в себя

более 300 разновидностей [11]. К наиболее часто встречающимся из них относят мутации в 9-м и 11-м экзонах *KIT*, кодирующих подмембранный и внеклеточный домены рецептора соответственно. Мутации в 11-м экзоне этого гена встречаются наиболее часто (60–70 % случаев ГИСО), к тому же опухоли, в которых обнаруживают делеции в данной области, в большинстве случаев клинически более агрессивны, чем опухоли с однонуклеотидными заменами. В свою очередь, миссенс-мутации в 11-м экзоне *KIT* ассоциированы с более благоприятным прогнозом и встречаются в 20–30 % случаев ГИСО. Аналогичным образом дупликации в 11-м экзоне этого гена — относительно редкие мутации, которые чаще всего наблюдаются в стромальных опухолях желудка и связаны с благоприятным прогнозом [12]. Мутации в 9-м экзоне *KIT* (до 10 % ГИСО) преимущественно встречаются в опухолях тонкой кишки и часто бывают ассоциированы с агрессивным течением заболевания [13]. Гораздо реже (1–2 % ГИСО) обнаруживают первичные мутации в 13-м и 17-м экзонах *KIT*, кодирующих тирозинкиназные домены данного рецептора, при этом основным типом мутаций являются замены (например, K642E и N822K соответственно). Мутации в 13-м и 17-м экзонах *KIT*, кодирующих тирозинкиназные домены рецептора, встречаются преимущественно в опухолях тонкой кишки, так же как и дупликации в 9-м экзоне *KIT*. Большинство таких опухолей имеют высокую степень злокачественности, отличаются низкой чувствительностью к таргетному препарату иматиниба мезилату (ИМ) (гливеку) и неблагоприятным прогнозом заболевания [14].

В 2003 г. было установлено, что помимо активирующих мутаций *KIT* патогенетическим фактором ГИСО (5–7 % случаев) может являться активирующая мутация *PDGFRA*, кодирующего рецептор фактора роста тромбоцитов α [15, 16]. Важно отметить, что мутации в *KIT* и *PDGFRA* являются взаимоисключающими [17]. Паттерн мутаций в *PDGFRA* при ГИСО также весьма разнообразен, при этом в основном мутации обнаруживаются в 18-м экзоне. В литературе описаны около 70 разновидностей мутаций в *PDGFRA*, встречающихся при ГИСО [18]. Мутации в *PDGFRA* чаще всего обнаруживают в эпителиоидно-клеточных стромальных опухолях желудка, а также брыжейки и сальника; около 80 % из них представлены точечной заменой в 18-м экзоне (D842V), что обуславливает устойчивость ГИСО к терапии таргетным препаратом ИМ (см. ниже). Другие разновидности мутаций в *PDGFRA* в ГИСО затрагивают 12-й (например, V561D) или 14-й экзон и встречаются крайне редко (1–2 % ГИСО).

В 10–15 % ГИСО мутации в генах *KIT* и *PDGFRA* выявить не удастся, и в этом случае говорят о ГИСО дикого типа. При молекулярно-генетическом профилировании данных новообразований обнаружено, что они являются разнородной группой, характеризующейся различными активирующими мутациями

в *BRAF* [19], *PIK3CA* [20] и др. Помимо этого, пациенты с ГИСО дикого типа могут иметь наследственные синдромы (нейрофиброматоз 1-го типа, синдром Карнея—Стратакиса или триаду Карнея), при которых обнаруживают герминальные мутации в гене *NF1* или в *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* и *SDHD*, кодирующих субъединицы комплекса сукцинатдегидрогеназы [21–23].

Установлено, что локализация ГИСО и характер мутаций в *KIT* и *PDGFRA* в опухоли коррелируют с показателями общей выживаемости пациентов после хирургического лечения при отсутствии проведения адъювантной терапии, а также могут определять характер ответа опухоли на таргетную терапию. В целом у пациентов с мутациями в *PDGFRA* показатели выживаемости выше, чем у пациентов с мутациями в *KIT* [24, 25]. Точечные мутации и дупликации в 11-м экзоне *KIT* обычно коррелируют с менее агрессивным течением ГИСО по сравнению с делециями в этом же экзоне, в то время как мутации в 9-м экзоне данного гена обычно сочетаются с быстрым прогрессированием заболевания и плохим прогнозом [24, 26].

Детальный анализ взаимосвязи молекулярно-генетического профиля ГИСО и локализации опухоли, ее гистологического типа (эпителиоидно-клеточный, веретенноклеточный и др.), чувствительности к таргетным препаратам не является основной задачей данного обзора. Изучению данного вопроса посвящено большое количество зарубежных и отечественных оригинальных и обзорных статей [27].

ТЕРАПИЯ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

В настоящее время стандартным методом лечения пациентов с ГИСО является радикальная резекция опухоли. Хирургические подходы к терапии данной патологии весьма разнообразны и варьируют в зависимости от размера и расположения опухоли. Малоинвазивные процедуры, такие как лапароскопия, лапароскопическая и эндоскопическая совместная хирургия, могут применяться для лечения пациентов с ГИСО небольших размеров. Опухоли большого размера требуют открытого хирургического вмешательства и проведения обширных резекций, таких как дистальная гастрэктомия при опухолях, поражающих пилорический отдел или области малой кривизны. Тотальная гастрэктомия может потребоваться при больших или множественных и рецидивирующих ГИСО [28].

Внедрение в схему лечения данных больных таргетных препаратов — в первую очередь ИМ (гливека), — используемых в адъювантном режиме, радикальным образом улучшило прогноз заболевания и увеличило продолжительность жизни пациентов с ГИСО с высоким риском развития рецидива, который был стратифицирован путем оценки митотического индекса, локализации и размеров опухоли [29, 30]. Кроме того, ИМ оказался весьма эффективным у больных с неоперабельными, метастатическими и рецидивирующими

формами заболевания. Результаты первого успешного опыта применения данного препарата в качестве монотерапии пациентки с метастатической и рецидивирующей формой ГИСО (400 мг/сут) были опубликованы в 2001 г. [31] и имели революционные последствия для лечения данной патологии. С момента появления научных публикаций в зарубежной литературе [32, 33] и до настоящего времени этот мультикиназный ингибитор эффективно используется в качестве препарата терапии 1-й линии пациентов с данным заболеванием. Тем не менее эффективность ИМ может существенно варьировать; главным фактором, предопределяющим эффективность таргетной терапии ГИСО, является мутационный статус опухоли. В частности, было показано, что ГИСО с мутациями в 11-м экзоне *KIT* наиболее чувствительны к ингибирующему действию данного препарата, в то время как мутации в 13-м или 17-м экзоне этого гена в делают опухоль устойчивой к нему [34]. Аналогичным образом мутация в 18-м экзоне *PDGFRA* (D842V) делает опухоль невосприимчивой к ИМ [35], и с 2020 г. для лечения таких пациентов препаратом выбора является авапритиниб, который будет охарактеризован ниже. Важно отметить, что не только локализация мутации, но и гистологический тип опухоли могут иметь различные предиктивные значения при оценке чувствительности ГИСО к ИМ. Например, опухоли с делециями в 18-м экзоне *PDGFRA* чувствительны к этому препарату [35], в то время как при некоторых мутациях в 11-м экзоне *KIT* (например, L576P) может наблюдаться ослабление эффекта ИМ [36].

Помимо первичной резистентности ГИСО к ИМ в результате молекулярно-генетических особенностей опухоли важным клиническим аспектом в терапии больных ГИСО является формирование вторичной резистентности опухоли к данному препарату. Было показано, что спустя 1,5–2 года после начала лечения у большинства пациентов с неоперабельными и метастатическими формами ГИСО наблюдаются признаки прогрессирования заболевания, обусловленные вторичной резистентностью опухоли к ИМ [37, 38]. Одним из основных молекулярных механизмов такого явления служит формирование в опухолевых клетках вторичных мутаций в *KIT*, чаще всего представляющих собой однонуклеотидные замены, затрагивающие кодоны в кармане связывания аденозинтрифосфата (АТФ) (13-й и 14-й экзоны) и петлю активации киназы (17-й и 18-й экзоны) [39]. Обнаружено, что вторичные мутации значительно чаще встречаются при ГИСО с первичными мутациями в 11-м экзоне *KIT*, чем при мутациях в 9-м экзоне. В опухолях с первичными мутациями в *PDGFRA* вторичные мутации описаны редко [34]. Помимо вторичных активирующих мутаций в *KIT* вторичная резистентность ГИСО к ИМ может являться следствием других механизмов, среди которых следует отметить амплификацию генов тирозинкиназных рецепторов *KIT* или *PDGFRA* [40], рецеп-

тора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R) [41], мутации V600E в гене *BRAF* [19], гиперэкспрессию киназы фокальной адгезии (focal adhesion kinase, FAK) [42], а также «переключение» активационного сигнала с KIT-сигнального пути на другой путь, обеспечивающий высокий уровень пролиферации опухолевых клеток и их резистентность к ИМ [43–46].

Вышеизложенное свидетельствует о многообразии механизмов формирования вторичной резистентности ГИСО к ИМ, что обуславливает необходимость использования дифференцированного подхода при лечении пациентов с метастатическими и неоперабельными ГИСО, прогрессирующими на фоне продолжающейся терапии данным таргетным препаратом.

На сегодняшний день общепризнанным алгоритмом терапии пациентов с ГИСО, прогрессирующими на фоне продолжающегося лечения ИМ, является назначение в качестве препарата терапии 2-й линии мультикиназного ингибитора сунитиниба малата (сутента), ингибирующего активность тирозинкиназных рецепторов KIT, фактора роста тромбоцитов α (*PDGFRA*), а также факторов роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGFR), что способствует подавлению ангиогенеза и пролиферации опухолевых клеток [47]. Следует учитывать, что эффективность данного таргетного препарата также зависит от мутационного статуса опухоли. Например, было показано, что сутент активен при мутациях в 11-м экзоне *KIT*, менее эффективен в случае ГИСО, имеющих вторичную резистентность после ИМ, и более эффективен при лечении ГИСО с мутациями в 9-м экзоне *KIT* или ГИСО дикого типа [48]. Более того, этот препарат проявляет высокую ингибирующую активность в отношении ГИСО с мутациями в АТФ-связывающем сайте тирозинкиназного рецептора KIT (13-й экзон), однако его активность снижается из-за мутаций в области петли активации (17-й и 18-й экзоны) [34].

Препаратом терапии 3-й линии ГИСО является регорафениб (стривага), проявляющий ингибирующую активность в отношении широкого спектра молекулярных мишеней, в том числе VEGFR, PDGFR, KIT, BRAF и RAF, воздействуя тем самым на ангиогенез и микроокружение опухоли. Сообщалось также, что характер мутаций способен оказывать влияние на терапевтический эффект регорафениба, который оказался успешным в терапии пациентов с ГИСО, имеющих мутации в 11-м экзоне *KIT* или дефицит сукцинатдегидрогеназы (SDH) [49].

В 2019 г. в качестве препарата терапии 4-й линии для пациентов с ГИСО, у которых заболевание прогрессировало на фоне терапии ИМ, сунитинибом и регорафенибом, был рекомендован рипретиниб. Это лекарственное средство является эффективным в отношении большинства как первичных, так и вторичных мутаций *KIT* (в 9, 11, 13, 14, 17 и 18-м экзонах) и *PDGFRA* (в 18-м экзоне), включая мутацию D816V в гене *KIT* и мутацию D842V в гене *PDGFR2A*, обуславливающих

резистентность опухолей к ранее использованным таргетным препаратам. Результаты двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования у пациентов с ГИСО, прогрессирующих на фоне терапии препаратами 1–3-й линий, показали значительное увеличение продолжительности периода заболевания без его прогрессирования на фоне терапии рипретинибом по сравнению с контрольной группой [50].

В 2020 г. на основе результатов многоцентрового клинического исследования NAVIGATOR, в ходе которого определялась эффективность лечения пациентов с неоперабельными, метастатическими и рецидивирующими ГИСО с мутациями в 18-м экзоне *PDGFRA* (в том числе D842V), был одобрен авапритиниб, который в настоящее время является препаратом терапии 1-й линии для данной группы больных, ранее не реагировавших на вышеуказанные ингибиторы рецепторных тирозинкиназ [51].

ИММУННОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ: МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Впечатляющие успехи проведения таргетной терапии пациентам с ГИСО на долгое время затмили исследования, направленные на изучение иммунного микроокружения данных опухолей и перспективности иммунотерапии при этих злокачественных новообразованиях. Тем не менее к настоящему времени стало очевидно, что ГИСО являются иммуногенными опухолями и характер их иммунного микроокружения может оказывать существенное влияние как на течение заболевания, так и на его лечение. К основным популяциям иммунокомпетентных клеток, выявляемых практически во всех без исключения ГИСО, относят CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоциты. В значительно меньших количествах (но во всех без исключения ГИСО) обнаруживают регуляторные FoxP3⁺-Т-лимфоциты [52, 53]. Оценка соотношения регуляторных и цитотоксических лимфоцитов, инфильтрирующих опухоли, является важным критерием при оценке состояния иммуносупрессии не только при данном злокачественном новообразовании. Например, изменение в таком соотношении в настоящее время рассматривается как показатель иммуносупрессии и рассматривается в качестве независимого прогностического признака у пациентов с раком шейки матки [54]. Этой же научной группой в дальнейшем были выявлены почти 6-кратные изменения в данном соотношении у больных ГИСО по сравнению с больными раком шейки матки, что может свидетельствовать о еще более выраженной иммуносупрессии в микроокружении ГИСО [53].

Важной составляющей иммунного микроокружения ГИСО является значительное преобладание макрофагов 2-го типа (M2), экспрессирующих специфический маркер CD163 на фоне отсутствия экспрессии

молекулы CD14, характерной для макрофагов 1-го типа (M1) [53]. Примечательно, что количество M2 в первичных ГИСО коррелирует с численностью регуляторных Т-лимфоцитов и значительно выше в областях метастатических поражений по сравнению с первичными ГИСО. Это, в свою очередь, может свидетельствовать о том, что M2 способствуют хемотаксису регуляторных Т-лимфоцитов в опухоль, усиливая тем самым иммуносупрессию в опухолевом микроокружении. Прогностическая значимость подсчета количества M2-макрофагов в опухолях была впервые показана при других злокачественных новообразованиях, например глиобластомах и саркомах [55, 56], что подтверждает точку зрения об иммунном микроокружении опухоли как о факторе, способном оказывать существенное влияние на характер течения онкологических заболеваний и их прогноз. Об этом свидетельствуют также данные об обратной корреляции между размером ГИСО, продолжительностью безрецидивного периода и количеством CD3⁺-лимфоцитов, инфильтрировавших опухоль [57, 58]. В отличие от CD3⁺-лимфоцитов, массивной инфильтрации ГИСО натуральными киллерами (NK) обычно не наблюдается. Тем не менее обнаружена обратная зависимость между данным показателем иммунного микроокружения этих новообразований и вероятностью развития рецидива опухоли и ее пролиферативным индексом [57]. В первичных ГИСО В-лимфоциты обнаруживают в малых количествах, в метастатических местах их количество увеличивается, но не превышает 2 % от общей численности иммунных клеток [58]. Однако роль В-лимфоцитов в микроокружении ГИСО не следует недооценивать в силу способности В-клеток регулировать противоопухолевый гуморальный иммунный ответ посредством активации процессов антителозависимой и комплемент-опосредованной цитотоксичности [57, 59].

О большой роли иммунного микроокружения в патогенезе ГИСО также косвенно свидетельствуют данные о высокой частоте встречаемости этих опухолей у пациентов с аденокарциномой желудка. Примечателен даже не сам факт наличия 2 типов рядом располагающихся злокачественных новообразований, а то, что в большинстве случаев у больных аденокарциномой желудка обнаруживают микро-ГИСО (≤ 2 см в диаметре), имеющие веретенноклеточный гистологический тип и чрезвычайно низкий риск рецидивирования. Более того, размеры ГИСО у данных пациентов находятся в обратной зависимости от их расстояния до аденокарциномы [60].

Еще одним важным фактором, оказывающим непосредственное влияние на иммунное микроокружение ГИСО, является их мутационный статус. Действительно, характер инфильтрации ГИСО иммунокомпетентными клетками может существенным образом варьировать и зависеть в том числе от молекулярно-генетического профиля опухолей. О пользе существования данной взаимосвязи на первый взгляд косвенно сви-

детельствуют результаты клинических наблюдений за пациентами с ГИСО с мутациями в *PDGFRA*. Было показано, что примерно 50 % всех случаев ГИСО с такими мутациями приходится на опухоли, содержащие точечную замену в 18-м экзоне (D842V), что обуславливает резистентность опухоли к ИМ [35]. На этом фоне выглядят парадоксальными лучшие показатели безрецидивной выживаемости у данных пациентов по сравнению с пациентами с ГИСО, в которых были обнаружены мутации в гене *KIT* [61]. Это позволяет сделать предположение о том, что мутационный статус опухоли не только играет большую предиктивную роль в ее ответе на таргетную терапию, но и способен оказывать влияние на иммунное микроокружение опухоли и характер иммунного ответа. Действительно, в периваскулярных зонах ГИСО с мутациями в *PDGFRA* было выявлено значимое повышение количеств CD8- и CD45-положительных клеток, коррелировавшее с уровнем экспрессии их мРНК [62]. Эти количественные различия в субпопуляционном составе лимфоцитов между *KIT*- и *PDGFRA*-мутантными ГИСО могли явиться следствием повышенного уровня экспрессии хемокиновых генов, таких как *CCR4*, *CCR5*, *XCL11*, *CXCR4* и особенно *CXCL14*. Уровень экспрессии *CXCL14* в ГИСО с мутациями в *PDGFRA* был повышен более чем в 10 раз во всех без исключения исследуемых образцах опухолей, что указывает на взаимосвязь уровня экспрессии отдельных хемокинов в опухоли и типа онкогена в ГИСО. С учетом того, что гиперэкспрессия *CXCL14* в опухолях играет большую роль в привлечении NK⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-клеток и регуляторных Т-клеток, а также коррелирует с уменьшением размеров экспериментальных опухолей [63, 64], увеличение уровня экспрессии данного хемокина в *PDGFRA*-мутантных опухолях может также объяснять более благоприятный прогноз при данном молекулярно-генетическом варианте заболевания. Кроме того, в опухолях с мутациями в *PDGFRA* выявлено значимое повышение уровня экспрессии CD96, являющегося мембранным белком из семейства иммуноглобулинов, обеспечивающих инфильтрацию опухоли NK-клетками. Поскольку инфильтрация ГИСО NK-клетками рассматривается в качестве одного из факторов, обуславливающих увеличение общей продолжительности жизни пациентов с ГИСО [65], значимые различия в уровне экспрессии CD96 между *KIT*- и *PDGFRA*-мутантными ГИСО также могут объяснять разницу в течении и прогнозе заболевания, несмотря на наличие мутаций, обеспечивающих невосприимчивость опухоли к ИМ. Помимо CD96 в этом же исследовании в ГИСО с мутациями *PDGFRA* была обнаружена повышенная экспрессия некоторых иммуносупрессивных молекул (иммунных чек-пойнтов), таких как *BTLA* (B- and T-lymphocyte attenuator), *TIGIT* (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains), *TNFRSF9* (tumor necrosis factor receptor superfamily member 9). Это, в свою очередь, может свидетельствовать о том, что

ГИСО с мутациями в *PDGFRA* могут быть более восприимчивы к терапии ингибиторами вышеуказанных иммунных чек-пойнтов, а также PD-1 (programmed cell death 1, рецептор программируемой клеточной гибели 1)/PD-L1 (programmed cell death-ligand 1, лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1) (см. ниже).

Также является очевидным, что уровень антигенной нагрузки в опухоли тем выше, что большее количество мутаций в ней присутствует. Это, в свою очередь, должно накладывать отпечаток на степень выраженности иммунного ответа при злокачественных заболеваниях, а следовательно, определять эффективность проводимой иммунотерапии [66].

Помимо вышеуказанных факторов на характер иммунного микроокружения ГИСО и функциональную активность иммунокомпетентных клеток могут влиять таргетные препараты, используемые в настоящее время в терапии пациентов с данной патологией. Результаты исследований показали способность этих лекарственных средств (в первую очередь ИМ и сунитиниба) оказывать воздействие на иммунное микроокружение ГИСО и функциональную активность иммунных клеток (см. подробнее [67]). Например, было показано, что ИМ усиливает межклеточные взаимодействия дендритных клеток и NK, что приводит к гиперпродукции последними интерферона γ (interferon γ , IFN- γ) [68]. У пациентов с диссеминированными формами ГИСО активация NK-клеток спустя 2 мес после начала таргетной терапии ИМ рассматривалась как благоприятный и независимый прогностический фактор [65].

Введение ИМ трансгенным мышам (Kit V558 Δ /+), у которых спонтанно возникают ГИСО вследствие активирующей мутации в *KIT*, приводило к быстрому уменьшению размеров опухоли, что сопровождалось выраженной инфильтрацией опухоли и мезентериальных лимфатических узлов активированными опухоль-специфичными CD8⁺-лимфоцитами, экспрессировавшими молекулу CD69. Важно отметить, что введение животным нейтрализующих анти-CD8-антител (но не анти-CD4- или NK-антител) практически нивелировало противоопухолевый эффект ИМ. Это свидетельствовало об активации цитотоксического иммунного ответа как фактора, необходимого для обеспечения максимального эффекта для данного таргетного препарата [69]. В то же время введение животным ИМ приводило к апоптозу регуляторных Foxp3⁺-Т-лимфоцитов в опухоли, но не в региональных лимфатических узлах. Это являлось следствием снижения экспрессии в опухоли фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO), оказывающего иммуносупрессивное действие. В результате этого под действием ИМ в ГИСО происходило значимое увеличение соотношения цитотоксических и регуляторных лимфоцитов, что расценивалось как благоприятный иммунологический признак при

злокачественных новообразованиях [70, 71]. Экспериментальные данные были подтверждены и на первичном опухолевом материале: соотношение вышеуказанных субпопуляций лимфоцитов коррелировало с чувствительностью/резистентностью ГИСО к терапии ИМ. Таким образом, было сделано резонное предположение о том, что терапевтический эффект ИМ в отношении ГИСО не ограничивается ингибированием KIT- или PDGFRA-сигнальных путей и может быть обусловлен способностью таргетного препарата стимулировать цитотоксический противоопухолевый иммунный ответ. Подтверждением данного предположения явилось значимое усиление цитотоксического эффекта ИМ в отношении экспериментальных ГИСО при использовании этого препарата в комбинации с блокирующими анти-CTLA-4 АТ, что приводило к увеличению в опухоли количества CD8+-лимфоцитов и гиперпродукции IFN- γ [69].

Вышеизложенное свидетельствует о том, что иммунное микроокружение ГИСО играет далеко не второстепенную роль в патогенезе данного заболевания и, следовательно, может быть перспективной терапевтической мишенью, создавая предпосылки для иммунотерапии.

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИММУНОТЕРАПИИ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Исследования, направленные на изучение стимуляции иммунного ответа у пациентов с ГИСО, развиваются в нескольких направлениях, среди которых следует выделить цитокинотерапию, использование ингибиторов так называемых иммунных контрольных точек (или чек-пойнтов), введение специфических антител (например, анти-KIT), клеточную иммунотерапию (введение генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов, экспрессирующих химерный анти-KIT-рецептор) и др. В настоящее время в зарубежной научной литературе имеется большое количество экспериментальных и клинических исследований, посвященных изучению эффективности иммунотерапии в лечении пациентов с ГИСО. Результаты этих работ были также представлены и обсуждены в обзорных статьях [72–76].

Ниже представлены основные текущие и перспективные направления иммунотерапии пациентов с ГИСО.

Цитокинотерапия. Данная терапия заключается в системном воздействии на иммунную систему, стимулировании Th1-звена этой системы и активации специфического противоопухолевого иммунитета. Например, исследования, в которые были включены 8 пациентов с распространенными и метастатическими формами ГИСО (стадии III и IV), показали, что введение пегилированного INF- α -2b в комбинации с ИМ больным ГИСО приводило к значимому повышению количеств CD4+-, CD8+- и NK-клеток в периферической крови и сопровождалось гиперпродук-

цией IFN- γ . Кроме того, на фоне лечения у пациентов наблюдалась массивная инфильтрация опухоли лимфоцитами, активно продуцирующими IFN- γ , что свидетельствовало о стимулировании Th1-звена иммунной системы. В результате проведенной комбинированной терапии у большинства пациентов зарегистрирован полный или частичный ответ и отмечено увеличение продолжительности периода заболевания без прогрессирования, вплоть до 3,5 лет. В ходе лечения наиболее часто наблюдались такие побочные эффекты, как субфебрилитет и гриппоподобные симптомы, в то время как серьезных осложнений выявлено не было [77].

Ингибиторы контрольных иммунных точек. Несмотря на то что экспрессия PD-L1 в опухоли обуславливает формирование иммуносупрессии в ее микроокружении, согласно некоторым данным, повышенный уровень экспрессии данного маркера ассоциируется с более благоприятным прогнозом у пациентов с ГИСО [78]. Объяснение данному парадоксальному факту может быть связано с реакциями опухолевых клеток на развитие противоопухолевого иммунного ответа у больных ГИСО. Об этом свидетельствует то, что уровень экспрессии PD-1 в CD4+- и CD8+-лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, был значительно выше по сравнению с лимфоцитами периферической крови. Также данное предположение подтверждается результатами исследований *in vitro*, показавшими способность IFN- γ индуцировать экспрессию PD-L1 во многих клеточных линиях ГИСО (например, GIST-T1, GIST-882 и др.) [79]. Следовательно, если формирование иммуносупрессивного ответа со стороны опухолевых клеток посредством гиперэкспрессии PD-L1 является вторичным событием, воздействие на него должно расцениваться как перспективный терапевтический подход в лечении ГИСО. Об этом свидетельствуют результаты исследований о значимом повышении эффективности ИМ в отношении ксенографтных ГИСО на фоне введения животным блокирующих анти-PD-1- или анти-PD-L1-антител. В этом же исследовании не было обнаружено зависимости между уровнем экспрессии молекулы PD-1 и мутационным статусом опухоли, ее локализацией, размером и митотическим индексом, что позволяет говорить об экспрессии PD-1 как о независимом прогностическом маркере при ГИСО [79].

Вышеизложенное также свидетельствует о перспективности использования ингибиторов иммунных чек-пойнтов в терапии пациентов с ГИСО. Потенциальными молекулярными мишенями при применении данных препаратов являются белок PD-1 и его лиганды (PDL-1/PDL-2), CTLA-4, Т-клеточный иммуноглобулин, муциновый белок 3 (Tim³) и его лиганд галектин-9 [69, 80, 81]. В настоящее время эффективность ингибиторов иммунных контрольных точек в терапии пациентов с ГИСО является предметом клинических исследований, большинство из которых направлено

на оценку эффективности использования данных препаратов в комбинации друг с другом или одного из них в комбинации с ингибиторами рецепторных тирозинкиназ. Например, в настоящее время проводится клиническое испытание по изучению эффективности применения ипилимумаба в комбинации с ИМ. На момент подготовки данной публикации к печати стабилизация опухолевого процесса была достигнута лишь у 1 из 35 пациентов с ГИСО [82]. Примечательно, что у данного больного обнаружен дикий тип ГИСО [83]. Исследование продолжается, окончательные результаты будут представлены в 2024 г. Аналогичные данные были получены при оценке эффективности использования ипилимумаба с мультикиназным ингибитором дазатинибом. У 3 из 20 пациентов с метастатическими и неоперабельными ГИСО с мутациями в *KIT* или *PDGFRA*, обуславливающими резистентность опухоли к ИМ, наблюдались признаки стабилизации опухолевого процесса на фоне комбинированной терапии. Наилучший ответ отмечен у пациента с мутацией в 18-м экзоне *PDGFRA* (D842V). У 7 больных наблюдался частичный ответ на комбинированное лечение [84, 85].

В 2017 г. начато исследование II фазы клинических испытаний по изучению результатов использования комбинации препаратов эпикадостата (ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы) и пембролизумаба (моноклональные антитела (мАТ), направленные против PD-1) у пациентов с резистентными к ИМ формами ГИСО. Однако оно было досрочно прекращено из-за недостаточности доказательств клинической эффективности комбинированной терапии по сравнению с монотерапией пембролизумабом [86]. Следует отметить, что, несмотря на многообещающие прогнозы эффективности ингибиторов индоламин-2,3-диоксигеназы в отношении иммуногенных опухолей, в настоящее время не получено ни одного доказательства их клинической эффективности. При этом наиболее неутешительными оказались результаты III фазы клинических испытаний ECHO-301/KEYNOTE-252, показавшие отсутствие преимуществ использования комбинации вышеуказанных препаратов по сравнению с монотерапией пембролизумабом при достижении контрольной точки исследования (улучшения показателя выживаемости без прогрессирования). В данном исследовании участвовали более 700 пациентов с неоперабельной или метастатической меланомой III–IV стадии, не получавшие ранее системного лечения [87].

В настоящее время проходят несколько клинических исследований по изучению эффективности ингибиторов рецепторных тирозинкиназ (в первую очередь ИМ), используемых в сочетании с ингибиторами контрольных иммунных точек. Например, продолжается II фаза клинических испытаний, направленных на изучение эффективности ИМ, используемого в комбинации с партализумабом (мАТ к молекуле PD-1)

у больных с метастатическими формами ГИСО, резистентными к препаратам 1, 2 и 3-й линий терапии (ИМ, сунитинибу и регорафенибу соответственно) [88]. Помимо молекулы PD-1 привлекательной мишенью для клинических исследований также является PD-L1. В 2021 г. было начато многоцентровое рандомизированное исследование ATEZOGIST, направленное на определение преимуществ применения ИМ в комбинации с атезолизумабом (мАТ к PD-L1) по сравнению с монотерапией ИМ у пациентов с метастатическими и нерезектабельными ГИСО, рефрактерными к препаратам 1-й и 2-й линий терапии [89]. Также продолжается II фаза клинического испытания REGOMUNE по изучению эффективности авелумаба (мАТ к молекуле PD-L1), используемого в комбинации с регорафенибом у пациентов с солидными новообразованиями, в том числе ГИСО [90]. Данное мАТ также включено в клиническое испытание AXAGIST для изучения его эффективности в отношении пациентов с ГИСО, у которых наблюдалось прогрессирование заболевания на фоне терапии препаратами 1-й и 3-й линий (т.е. сунитинибом и регорафенибом соответственно). Эффективность данного таргетного препарата оценивается в комбинации с акситинибом, являющимся селективным ингибитором тирозинкиназы всех 3 типов рецепторов фактора VEGF (VEGFR 1–3) [91].

Помимо эффективности использования комбинации ингибиторов рецепторных тирозинкиназ и контрольных иммунных точек также изучается эффективность применения ингибиторов контрольных иммунных точек в виде монотерапии и в комбинации друг с другом. Например, в 2016 г. было проведено рандомизированное исследование в рамках II фазы клинического испытания [92], в ходе которого сравнивалась эффективность применения ниволумаба (мАТ, связывающее антиген PD-1) в качестве монотерапии и данного препарата в комбинации с ипилимумабом (мАТ, комплементарно связывающее антиген CTLA-4). В исследование вошли пациенты с метастатическими или неоперабельными ГИСО, ранее в течение продолжительного времени получавшие таргетную терапию ИМ и имеющие признаки прогрессирования заболевания, что свидетельствовало о развившейся вторичной резистентности ГИСО к данному препарату. Важным результатом данных испытаний явилось достижение полного или частичного ответа на лечение у большинства пациентов, что сопровождалось увеличением продолжительности периода заболевания без признаков прогрессирования на 8 и 9 нед соответственно. Кроме того, отмечена стабилизация опухолевого процесса почти у 46,7 % пациентов, получавших монотерапию ниволумабом. На этом фоне комбинированное лечение не только не давало дополнительных преимуществ, но и приводило к снижению числа больных со стабилизацией опухолевого процесса до 16,7 %. Тем не менее именно у этих пациентов с мутациями в 17-м экзоне *KIT* наблюдалось значительное (до 70 %) у

уменьшение размеров первичной опухоли. В ходе проведенных исследований не было отмечено серьезных побочных эффектов. Среди нежелательных явлений отмечены диарея, утомляемость, сыпь и гипергликемия [93].

Моноклональные антитела. Первым экспериментальным доказательством перспективности применения анти-KIT-МАТ в отношении ГИСО явились опубликованные в 2013 г. результаты исследований, проведенных в лаборатории Дж. Флетчера. Была обнаружена активность анти-KIT-МАТ (SR1) в отношении как чувствительных к ИМ, так и резистентных к этому препарату ГИСО *in vitro*. Это проявлялось в значительном уменьшении уровня экспрессии данного рецептора в опухолевых клетках и (как следствие данного события) приводило к снижению скорости их пролиферации. Данные результаты нашли подтверждение на ксенографтных моделях ГИСО, размер которых существенно сокращался после введения лабораторным животным вышеуказанных МАТ. Также было обнаружено, что противоопухолевый эффект анти-KIT-МАТ мог быть обусловлен усилением антителозависимого фагоцитоза опухолевых клеток макрофагами [94]. В дополнение к этим результатам многообещающе выглядят данные, полученные в ходе доклинических исследований, показавших высокую антипролиферативную активность химиопрепарата майстантин, дестабилизирующего микротрубочки веретена деления, конъюгированного с анти-KIT-МАТ. Активность антител была выявлена в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих KIT, в том числе ГИСО, резистентных к ИМ. Последующие исследования, проведенные на приматах, показали хорошую переносимость данного конъюгата [95].

Кроме KIT другой привлекательной терапевтической мишенью для МАТ в ГИСО являются рецепторы соматостатина (SSR). Обнаружено, что помимо нейроэндокринных опухолей данный тип рецепторов также довольно широко представлен в ГИСО (до 87 % всех случаев). Более того, высокий уровень его экспрессии в ГИСО обычно ассоциирован с плохим прогнозом заболевания [96]. В связи с этим весьма привлекательным выглядит анонсированное в 2018 г. клиническое испытание I фазы биспецифических МАТ к молекулам CD3 и SSR для пациентов с нейроэндокринными опухолями и ГИСО [97]. Ожидается, что результаты данного исследования будут опубликованы в 2023 г.

Противоопухолевые генетически модифицированные Т-лимфоциты. Получены экспериментальные доказательства того, что CAR-T-лимфоциты с анти-KIT-рецептором проявляли противоопухолевое действие *in vitro* и *in vivo*, в том числе в отношении опухолевых клеток, резистентных к ИМ [98].

Помимо рецептора KIT другой перспективной терапевтической мишенью для CAR-T-клеток может стать протеогликан CSPG4, гиперэкспрессированный в некоторых опухолях и играющий большую роль как в их фенотипических характеристиках, так и их иммунном микроокружении [99]. Действительно, были обнаружены значительные различия в данном показателе между опухолями с высоким и низким уровнями экспрессии CSPG4. Гиперэкспрессия CSPG4 в опухолях сопровождалась выраженной инфильтрацией опухолей иммунными клетками, в том числе дендритными, а также NK- и цитотоксическими CD8+-лимфоцитами с более высокой цитолитической активностью [100]. Поэтому Т-клеточная терапия на основе созданных CSPG4-специфических химерных рецепторов (CSPG4-CAR, CIKs) может рассматриваться в качестве альтернативной разновидности иммунотерапии некоторых солидных опухолей, в том числе сарком мягких тканей и ГИСО [101].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты экспериментальных и клинических исследований по изучению иммунного микроокружения ГИСО указывают на иммуногенность данных злокачественных новообразований, что подтверждается инфильтрацией опухолей различными типами иммунных клеток, в первую очередь цитотоксическими CD8-лимфоцитами, дендритными и NK-клетками. Несмотря на это, опухолевые клетки ускользают от иммунного надзора, используя многочисленные иммуносупрессивные механизмы, включающие продукцию опухолевыми клетками индоламин-2,3-диоксигеназы, экспрессию на их поверхности молекул контрольных иммунных точек, потерю экспрессии молекул гистосовместимости I типа, а также инфильтрацию опухоли регуляторными Т-клетками и M2 с выраженными иммуносупрессивными свойствами. Все это наглядно демонстрирует безусловную перспективность терапевтического вмешательства в вышеуказанные механизмы. Также заслуживает внимания способность таргетного препарата ИМ модулировать цитотоксическую активность CD8-лимфоцитов в ГИСО, что объясняет правомочность проведения клинических испытаний по оценке эффективности иммунотерапии в комбинации с ИМ у пациентов с ГИСО, рефрактерных к препаратам 1, 2 и 3-й линий терапии. Несмотря на отсутствие впечатляющих результатов ряда уже завершенных клинических испытаний на момент написания данного обзора, большинство из них находится в активной фазе, а некоторые инициированы в 2021 и 2022 гг., что указывает на перспективность данного подхода в терапии пациентов с метастатическими, рецидивирующими и нерезектабельными ГИСО при наличии резистентности опухоли к используемым в настоящее время таргетным препаратам.

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

- 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.
- Steigen S.E., Eide T.J. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a review. *APMIS* 2009;117(2):73–86. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2008.00020.x
- 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 peculiarities and prognosis criteria of gastrointestinal stromal tumors. *Arkhiv patologii = Pathology Archive* 2011;73(6):37–42. (In Russ.).
- Снигур П.В., Анурова О.А., Петровичев Н.Н., Сельчук В.Ю. Клинико-морфологические особенности стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта. *Вопросы онкологии* 2003;49(6):705–10. Snigur P.V., Anurova O.A., Petrovichev N.N., Selchuk V.Yu. Clinical and morphological peculiarities of gastrointestinal stromal tumors. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2003;49(6):705–10. (In Russ.).
- Стилиди И.С., Архири П.П., Анурова О.А., Мазуренко Н.Н. Стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта: клинико-морфологические особенности, патогенез и современные подходы к лечению. *Вестник Российской академии медицинских наук* 2010;2:46–52. Stilidi I.S., Arkhiri P.P., Anurova O.A., Mazurenko N.N. Gastrointestinal stromal tumors: clinical and morphological peculiarities, pathogenesis, and modern approaches to treatment. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Herald of the Russian Academy of Medical Sciences* 2010;2:46–52. (In Russ.).
- Miettinen M., Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterol Clin North Am* 2013;42(2):399–415. DOI: 10.1016/j.gtc.2013.01.001
- Халиков Д.Д., Ахметзянов Ф.Ш., Петров С.В. Клинико-морфологическая характеристика гастроинтестинальных стромальных опухолей. *Архив патологии* 2017;79(4):48–55. DOI: 10.17116/patol201779448-55. Khalikov D.D., Akhmetzyanov F.Sh., Petrov S.V. Clinical and morphological characteristics of gastrointestinal stromal tumors. *Arkhiv Patologii = Pathology Archive* 2017;79(4):48–55. (In Russ.). DOI: 10.17116/patol201779448-55
- 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
- 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.
- Hasegawa T., Matsuno Y., Shimoda T., Hirohashi S. Gastrointestinal stromal tumor: consistent CD117 immunostaining for diagnosis, and prognostic classification based on tumor size and MIB-1 grade. *Hum Pathol* 2002;33(6):669–76. DOI: 10.1053/hupa.2002.124116
- 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
- Miettinen M., Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130(10):1466–78. DOI: 10.5858/2006-130-1466-GSTROM
- Brčić I., Argyropoulos A., Liegl-Atzwanger B. Update on molecular genetics of gastrointestinal stromal tumors. *Diagnostics (Basel)* 2021;11(2):194. DOI: 10.3390/diagnostics11020194
- Niinuma T., Suzuki H., Sugai T. Molecular characterization and pathogenesis of gastrointestinal stromal tumor. *Transl Gastroenterol Hepatol* 2018;3:2. DOI: 10.21037/tgh.2018.01
- 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
- Hirota S., Ohashi A., Nishida T. et al. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 2003;125(3):660–7. DOI: 10.1016/s0016-5085(03)01046-1
- Lasota J., Miettinen M. KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Semin Diagn Pathol* 2006;23(2):91–102. DOI: 10.1053/j.semdp.2006.08.006
- Künstlinger H., Binot E., Merkelbach-Bruse S. et al. High-resolution melting analysis is a sensitive diagnostic tool to detect imatinib-resistant and imatinib-sensitive PDGFRA exon 18 mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 2014;45(3):573–82. DOI: 10.1016/j.humpath.2013.10.025
- Agaram N.P., Wong G.C., Guo T. et al. V600E BRAF mutations in imatinib-naïve and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47(10):853–9. DOI: 10.1002/gcc.20589
- Daniels M., Lurkin I., Pauli R. et al. Spectrum of KIT/PDGFRA/BRAF mutations and phosphatidylinositol-3-kinase pathway gene alterations in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Cancer Lett* 2011;312(1):43–54. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.07.029
- 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
- Mussi C., Schildhaus H.U., Gronchi A. et al. Therapeutic consequences from molecular biology for gastrointestinal stromal tumor patients affected by neurofibromatosis type 1. *Clin Cancer Res* 2008;14(14):4550–5. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0086
- Pasini B., McWhinney S.R., Bei T. et al. Clinical and molecular genetics of patients with the Carney–Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC, and SDHD. *Eur J Hum Genet* 2008;16(1):79–88. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201904
- 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 ConticaGIST. *Clin Cancer Res* 2014;20(23):6105–16. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1677
- Цыганова И.В., Беляков И.С., Анурова О.А., Мазуренко Н.Н. Прогностическое значение мутаций KIT и PDGFRA в гастроинтестинальных стромальных опухолях. *Молекулярная медицина* 2015;2:64–70. Tsyganova I.V., Belyakov I.S., Anurova O.A., Mazurenko N.N. Prognostic significance of the KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine* 2015;2:64–70. (In Russ.).
- Беляков И.С., Анурова О.А., Снигур П.В. и др. Мутации генов c-KIT и PDGFRA и клинико-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. Mutations of the c-KIT and PDGFRA genes and clinical and morphological peculiarities of gastrointestinal stromal tumors. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2007;53(6):677–81. (In Russ.).
- Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В. Молекулярно-генетические особенности и маркеры гастроинтестинальных стромальных опухолей. *Успехи молекулярной онкологии* 2015;2(2):29–40. DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.2.29-40. Mazurenko N.N., Tsyganova I.V. Molecular features and genetic markers of gastrointestinal stromal tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2015;2(2):29–40. (In Russ.).

28. Sugiyama Y., Sasaki M., Kouyama M. et al. Current treatment strategies and future perspectives for gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2022;13(1):15–33. DOI: 10.4291/wjgp.v13.i1.15
29. 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
30. Gold J.S., Gönen M., Gutiérrez A. et al. Development and validation of a prognostic nomogram for recurrence-free survival after complete surgical resection of localised primary gastrointestinal stromal tumour: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2009;10(11):1045–52. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70242-6
31. Joensuu H., Roberts P., 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
32. Tuveson D.A., Willis N.A., Jacks T. et al. STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene* 2001;20(36):5054–8. DOI: 10.1038/sj.onc.1204704
33. Demetri G.D., von Mehren M., Blanke C.D. et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002;347(7):472–80. DOI: 10.1056/NEJMoa020461
34. Heinrich M.C., Maki R.G., Corless C.L. et al. Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2008;26(33):5352–9. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.7461
35. 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
36. Pierotti M.A., Tamborini E., Negr T. et al. Targeted therapy in GIST: in silico modeling for prediction of resistance. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8(3):161–70. DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.3
37. Verweij J., Casali P.G., Zalcberg J. et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumors with high-dose imatinib: randomized trial. *Lancet* 2004;364(9440):1127–34. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)17098-0
38. Gramza A.W., Corless C.L., Heinrich M.C. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2009;15(24):7510–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0190
39. Napolitano A., Vincenzi B. Secondary KIT mutations: the GIST of drug resistance and sensitivity. *Br J Cancer* 2019;120(6):577–8. DOI: 10.1038/s41416-019-0388-7
40. Liegl B., Kepten I., Le C. et al. Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *J Pathol* 2008;216(1):64–74. DOI: 10.1002/path.2382
41. Tarn C., Rink L., Merkel E. et al. Insulin-like growth factor 1 receptor is a potential therapeutic target for gastrointestinal stromal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(24):8387–92. DOI: 10.1073/pnas.0803383105
42. Sakurama K., Noma K., Takaoka M. et al. Inhibition of focal adhesion kinase as a potential therapeutic strategy for imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Mol Cancer Ther* 2009;8(1):127–34. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0884
43. Mahadevan D., Cooke L., Riley C. et al. A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 2007;26(27):3909–19. DOI: 10.1038/sj.onc.1210173
44. Javidi-Sharifi N., Traer E., Martinez J. et al. Crosstalk between KIT and FGFR3 promotes gastrointestinal stromal tumor cell growth and drug resistance. *Cancer Res* 2015;75(5):880–91. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0573
45. Li F., Huynh H., Li X. et al. FGFR-mediated reactivation of MAPK signaling attenuates antitumor effects of imatinib in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Discov* 2015;5(4):438–51. DOI: 10.1158/2159-8290.cd-14-0763
46. Boichuk S.V., Galembikova A., Dunaev P. et al. A novel receptor tyrosine kinase switch promotes gastrointestinal stromal tumor drug resistance. *Molecules* 2017;22(12):2152. DOI: 10.3390/molecules22122152
47. Rock E.P., Goodman V., Jiang J.X. et al. Food and Drug Administration drug approval summary: sunitinib malate for the treatment of gastrointestinal stromal tumor and advanced renal cell carcinoma. *Oncologist* 2007;12(1):107–13. DOI: 10.1634/theoncologist.12-1-107
48. Sugiyama Y., Sasaki M., Kouyama M. et al. Current treatment strategies and future perspectives for gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2022;13(1):15–33. DOI: 10.4291/wjgp.v13.i1.15
49. Ben-Ami E., Barysaukas C.M., von Mehren M. et al. Long-term follow-up results of the multicenter phase II trial of regorafenib in patients with metastatic and/or unresectable GI stromal tumor after failure of standard tyrosine kinase inhibitor therapy. *Ann Oncol* 2016;27:1794–9. DOI: 10.1093/annonc/mdw228
50. Blay J.Y., Serrano C., Heinrich M.C. et al. Ripretinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours (INVICTUS): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2020;21(7):923–34. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30168-6
51. Heinrich M.C., Jones R.L., von Mehren M. et al. Avapritinib in advanced PDGFRA D842V-mutant gastrointestinal stromal tumour (NAVIGATOR): a multicentre, open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol* 2020;21(7):935–46. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30269-2
52. Cameron S., Haller F., Dudas J. et al. Immune cells in primary gastrointestinal stromal tumors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20(4):327–34. DOI: 10.1097/MEG.0b013e3282f3a403
53. Van Dongen M., Savage N.D., Jordanova E.S. et al. Anti-inflammatory M2 type macrophages characterize metastasized and tyrosine kinase inhibitor-treated gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* 2010;127(4):899–909. DOI: 10.1002/ijc.25113
54. Jordanova E.S., Gorter A., Ayachi O. et al. Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8+/regulatory T-cell ratio: which variable determines survival of cervical cancer patients? *Clin Cancer Res* 2008;14(7):2028–35. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4554
55. Lee C.H., Espinosa I., Vrijaldenhoven S. et al. Prognostic significance of macrophage infiltration in leiomyosarcomas. *Clin Cancer Res* 2008;14(5):1423–30. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1712
56. Komohara Y., Ohnishi K., Kuratsu J. et al. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol* 2008;216(1):15–24. DOI: 10.1002/path.2370
57. Rusakiewicz S., Semeraro M., Sarabi M. et al. Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2013;73(12):3499–510. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0371
58. Cameron S., Gieselmann M., Blaschke M., et al. Immune cells in primary and metastatic gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(7):3563–79.
59. Pantaleo M.A., Tarantino G., Agostinelli C. et al. Immune microenvironment profiling of gastrointestinal stromal tumors (GIST) shows gene expression patterns associated to immune checkpoint inhibitors response. *Oncoimmunology* 2019;8(9):e1617588. DOI: 10.1080/2162402X.2019.1617588
60. Kocsmár É., Kocsmár I., Szalai L. et al. Crosstesting of major molecular markers indicates distinct pathways of tumorigenesis in gastric adenocarcinomas and synchronous gastrointestinal stromal tumors. *Sci Rep* 2020;10:22212.
61. 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

62. Vitiello G.A., Bowler T.G., Liu M. et al. Differential immune profiles distinguish the mutational subtypes of gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Invest* 2019;129(5):1863–77. DOI: 10.1172/JCI124108
63. Cicchini L., Westrich J.A., Xu T. et al. Suppression of antitumor immune responses by human papillomavirus through epigenetic downregulation of CXCL14. *mBio* 2016;7(3):e00270–16. DOI: 10.1128/mBio.00270-16
64. Lee H.T., Liu S.P., Lin C.H. et al. A crucial role of CXCL14 for promoting regulatory T cells activation in stroke. *Theranostics* 2017;7(4):855–75. DOI: 10.7150/thno.17558
65. Ménard C., Blay J.Y., Borg C. et al. Natural killer cell IFN- γ levels predict long-term survival with imatinib mesylate therapy in gastrointestinal stromal tumor-bearing patients. *Cancer Res* 2009;69(8):3563–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3807
66. Goodman A.M., Kato S., Bazhenova L. et al. Tumor mutational burden as an independent predictor of response to immunotherapy in diverse cancers. *Mol Cancer Ther* 2017;16(11):2598–608. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0386
67. Zitvogel L., Rusakiewicz S., Routy B. et al. Immunological off-target effects of imatinib. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13(7):431–46. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.41
68. Borg C., Terme M., Taieb J. et al. Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. *J Clin Invest* 2004;114(3):379–88. DOI: 10.1172/JCI21102
69. Balachandran V.P., Cavnar M.J., Zeng S. et al. Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of IdO. *Nat Med* 2011;17(9):1094–100. DOI: 10.1038/nm.2438
70. Sato E., Olson S.H., Ahn J. et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(51):18538–43. DOI: 10.1073/pnas.0509182102
71. Asano Y., Kashiwagi S., Goto W. et al. Tumour infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer. *Br J Surg* 2016;103(7):845–54. DOI: 10.1002/bjs.10127
72. Arshad J., Costa P.A., Barreto-Coelho P. et al. Immunotherapy strategies for gastrointestinal stromal tumor. *Cancers (Basel)* 2021;13(14):3525. DOI: 10.3390/cancers13143525
73. Dimino A., Brando C., Algeri L. et al. Exploring the dynamic crosstalk between the immune system and genetics in gastrointestinal stromal tumors. *Cancers (Basel)* 2022;15(1):216. DOI: 10.3390/cancers15010216
74. Siozopoulou V., Domen A., Zwaenepoel K. et al. Immune checkpoint inhibitory therapy in sarcomas: is there light at the end of the tunnel? *Cancers (Basel)* 2021;13(2):360. DOI: 10.3390/cancers13020360
75. Vallilas C., Sarantis P., Kyriazoglou A. et al. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): novel therapeutic strategies with immunotherapy and small molecules. *Int J Mol Sci* 2021;22(2):493. DOI: 10.3390/ijms22020493
76. Roulleaux Dugage M., Jones R.L., Trent J. et al. Beyond the driver mutation: immunotherapies in gastrointestinal stromal tumors. *Front Immunol* 2021;12:715727. DOI: 10.3389/fimmu.2021.715727
77. Chen L.L., Chen X., Choi H. et al. Exploiting antitumor immunity to overcome relapse and improve remission duration. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61(7):1113–24. DOI: 10.1007/s00262-011-1185-1
78. Bertucci F., Finetti P., Mamessier E. et al. PDL1 expression is an independent prognostic factor in localized GIST. *Oncoimmunology* 2015;4(5):e1002729. DOI: 10.1080/2162402X.2014.1002729
79. Seifert A.M., Zeng S., Zhang J.Q. et al. PD-1/PD-L1 blockade enhances T-cell activity and antitumor efficacy of imatinib in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2017;23(2):454–65. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-16-1163
80. Zhao R., Song Y., Wang Y. et al. PD-1/PD-L1 blockade rescue exhausted CD8+ T cells in gastrointestinal stromal tumours via the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *Cell Prolif* 2019;52(3):e12571. DOI: 10.1111/cpr.12571
81. Martin-Broto J., Moura D.S. New drugs in gastrointestinal stromal tumors. *Curr Opin Oncol* 2020;32(4):314–20. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000642
82. A phase I trial of ipilimumab (Immunotherapy) and imatinib mesylate (c-Kit inhibitor) in patients with advanced malignancies. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01738139>
83. Reilley M.J., Bailey A., Subbiah V. et al. Phase I clinical trial of combination imatinib and ipilimumab in patients with advanced malignancies. *J Immunother Cancer* 2017;5:35. DOI: 10.1186/s40425-017-0238-1
84. Phase I study of dasatinib in combination with ipilimumab for patients with advanced gastrointestinal stromal tumor and other sarcomas. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01643278>
85. D'Angelo S.P., Shoushtari A.N., Keohan M.L. et al. Combined kit and CTLA-4 blockade in patients with refractory GIST and other advanced sarcomas: a phase Ib study of dasatinib plus ipilimumab. *Clin Cancer Res* 2017;23(12):2972–80. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2349
86. Epacadostat and pembrolizumab in patients with GIST. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03291054>
87. A phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled study of pembrolizumab (MK-3475) in combination with epacadostat or placebo in subjects with unresectable or metastatic melanoma (Keynote-252/ECHO-301). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02752074>
88. PDR001 plus imatinib for metastatic or unresectable GIST. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03609424>
89. A prospective, randomized, multicenter, comparative study of the efficacy of imatinib resumption combined with atezolizumab versus imatinib resumption alone in patients with unresectable advanced gastrointestinal stromal tumors (GIST) after failure of standard treatments (ATEZOGIST). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05152472>
90. A phase I/II study of regorafenib plus avelumab in solid tumors. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT03475953>
91. A phase II, single arm study of avelumab in combination with axitinib in patients with unresectable/metastatic gastrointestinal stromal tumor after failure of standard therapy – AXAGIST. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04258956>
92. A randomized phase 2 study of nivolumab monotherapy versus nivolumab combined with ipilimumab in patients with metastatic or unresectable gastrointestinal stromal tumor (GIST). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02880020>
93. Singh A.S., Chmielowski B., Hecht J.R. et al. A randomized phase II study of nivolumab monotherapy versus nivolumab combined with ipilimumab in advanced gastrointestinal stromal tumor (GIST). *J Clin Oncol* 2019;37:11017. DOI: 10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.11017
94. Edris B., Willingham S.B., Weiskopf K. et al. Anti-KIT monoclonal antibody inhibits imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(9):3501–6. DOI: 10.1073/pnas.1222893110
95. Abrams T.J., Connor A., Fanton C.P. et al. Preclinical antitumor activity of a novel anti-c-KIT antibody-drug conjugate against mutant and wild-type c-KIT-positive solid tumors. *Clin Cancer Res* 2018;24(17):4297–308. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3795
96. Zhao W.Y., Zhuang C., Xu J. et al. Somatostatin re-ceptors in gastrointestinal stromal tumors: new prognostic biomarker and potential therapeutic strategy. *Am J Transl Res* 2014;6(6):831–40.
97. A study of XmAb®18087 in subjects with NET and GIST. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03411915>
98. Katz S.C., Burga R.A., Naheed S. et al. Anti-KIT designer T cells for the treatment of gastrointestinal stromal tumor. *J Transl Med* 2013;11:46. DOI: 10.1186/1479-5876-11-46

99. Ilieva K.M., Cheung A., Mele S. et al. Chondroitin sulfate proteoglycan 4 and its potential as an antibody immunotherapy target across different tumor types. *Front Immunol* 2018;8:1911. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01911
100. De Nonneville A., Finetti P., Picard M. et al. CSPG4 expression in GIST is associated with better prognosis and strong cytotoxic immune response. *Cancers (Basel)* 2022;14(5):1306. DOI: 10.3390/cancers14051306
101. Leuci V., Donini C., Grignani G. et al. CSPG4-Specific CAR.CIK lymphocytes as a novel therapy for the treatment of multiple soft-tissue sarcoma histotypes. *Clin Cancer Res* 2020;26(23):6321–34. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0357

Вклад авторов

С.В. Бойчук, С.А. Абдураева, П.Б. Копнин: анализ данных, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contributions

S.V. Boichuk, S.A. Abduraeva, P.B. Kopnin: data analysis, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.В. Бойчук / S.V. Boichuk: <https://orcid.org/0000-0003-2415-1084>

П.Б. Копнин / P.B. Kopnin: <https://orcid.org/0000-0002-2078-4274>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (Грант № 20-15-00001) за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Funding. The study was carried out with the support of the Russian Science Foundation (Grant No. 20-15-00001) and has been supported by the Kazan Federal University of Ministry of Health of Russia Strategic Academic Leadership Program (PRIORITY-2030).

Статья поступила: 19.05.2023. **Принята к публикации:** 29.05.2023.

Article submitted: 19.05.2023. **Accepted for publication:** 29.05.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-30-41



Механизмы действия растительных полифенолов на инициацию канцерогенеза

А.В. Любительев¹, А.Л. Сивкина¹, О.А. Власова², Г.А. Белицкий², В.М. Студитский^{1,3}

¹Кафедра биоинженерии ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

³Fox Chase Cancer Center; 333 Cottman Ave, Philadelphia 19111, Pennsylvania, USA

Контакты: Александр Викторович Любительев varanus.storri@gmail.com

Генетический аппарат клеток человеческого организма находится под постоянным воздействием большого спектра генотоксичных и негенотоксичных агентов, как экзогенных, так и эндогенных. Возникающие в результате таких воздействий генетические и эпигенетические нарушения являются звеньями молекулярного патогенеза злокачественных новообразований. Для профилактики развития таких нарушений предложены несколько различных подходов, включая подавление генотоксичного воздействия с помощью химических соединений. Благодаря способности оказывать влияние на активацию проканцерогенов и регуляцию окислительного стресса, растительные полифенольные соединения являются одними из перспективных кандидатов на роль химиопрофилактических антиканцерогенных препаратов. В обзоре рассмотрены структура и классификация полифенольных соединений и механизмы их взаимодействия с биологическими макромолекулами, а также молекулярные механизмы их влияния на ферменты, участвующие в 1-й фазе активации ксенобиотиков и регуляции окислительного стресса. Также проведен анализ эффектов природных полифенолов на микрофлору человека.

Ключевые слова: растительные полифенолы, регуляция метаболизма ксенобиотиков, окислительный стресс, кишечная микрофлора

Для цитирования: Любительев А.В., Сивкина А.Л., Власова О.А. и др. Механизмы действия растительных полифенолов на инициацию канцерогенеза. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):30–41. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-30-41

Mechanisms of action of plant polyphenols on the initiation of carcinogenesis

A.V. Lyubitelev¹, A.L. Sivkina¹, O.A. Vlasova², G.A. Belitsky², V.M. Studitsky^{1,3}

¹Department of Bioengineering of Lomonosov Moscow State University; Bld. 12, 1 Leninskie Gory, Moscow 119234, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

³Fox Chase Cancer Center; 333 Cottman Ave, Philadelphia 19111, Pennsylvania, USA

Contacts: Alexander Viktorovich Lyubitelev varanus.storri@gmail.com

Genetic apparatus of human cells is constantly affected by a broad spectrum of mutagenic factors, both exogenous and endogenous. Genetic and epigenetic disorders, which emerge as a result of this influence, become the main cause of the majority of malignant neoplasias. Several different approaches were proposed to prevent these disorders, including the suppression of the activity of mutagenic factors by treatment with certain chemical compounds. Plant polyphenols are promising candidates for the development of chemopreventive drugs, as they exert the ability to regulate the metabolic activation of procarcinogens and modulate the cellular oxidative stress. In the present review, classification of plant phenolic compounds and their interactions with biological macromolecules are described, along with the molecular mechanisms of their influence on the enzymes and regulatory pathways of phase I xenobiotic metabolism, and the prevention of oxidative stress. Interactions between natural polyphenols and patient's microbiota is also described.

Keywords: plant polyphenols, regulation of xenobiotic metabolism, oxidative stress, gut microbiota

For citation: Lyubitelev A.V., Sivkina A.L., Vlasova O.A. et al. Mechanisms of action of plant polyphenols on the initiation of carcinogenesis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(2):30–41. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-30-41

ВВЕДЕНИЕ

Патогенез большинства злокачественных новообразований (ЗНО) связывают с генетическими и эпигенетическими нарушениями, в результате которых клетка приобретает определенные фенотипические характеристики. Ключевыми среди них являются:

- повышенная пролиферативная активность;
- автономный рост;
- генетическая нестабильность;
- подавление апоптоза;
- отсутствие репликативного старения;
- особенности метаболизма, включая эффект Варбурга;
- способность к инвазии и метастазированию;
- способность к стимулированию ангиогенеза;
- уход от иммунного надзора и др.;
- активация воспаления [1].

К этиологическим факторам ЗНО, обуславливающим появление соответствующих мутаций и нарушений эпигенетической регуляции экспрессии генов, относят канцерогенные химические соединения [2], физические воздействия [3], а также онкогенные вирусы [4]. Наиболее распространенными канцерогенными агентами являются химические соединения. Химические канцерогены бывают экзогенными и эндогенными. Кроме того, мутации могут возникать в результате ошибок ДНК-полимераз в процессе репликативного и репаративного синтеза биополимера [5]. Репликативная полимераз человека допускает около 3 ошибок на клетку при каждом удвоении генома перед делением [5]. Наследственные особенности [6] и ошибки, возникающие при репликации ДНК, невозможно устранить проведением каких-либо профилактических мероприятий, тогда как интенсивность экспозиции организма к различным видам излучений и канцерогенным веществам может быть снижена за счет применения специальных средств защиты и введения контролируемых норм, регламентирующих канцерогеноопасные загрязнения. Осуществляемая таким образом профилактика рака считается перспективным подходом к снижению смертности от ЗНО. Согласно результатам исследований эпидемиологов, эффективные профилактические мероприятия могут позволить снизить частоту развития ЗНО более чем на 45 % [7]. Ограничение или предотвращение экспозиции к канцерогенным веществам и излучениям является самым прямым и очевидным подходом к профилактике рака. Однако этот способ не всегда применим, поскольку значительная часть синтезируемых соединений не изучена на предмет канцерогенности [8]. Данный подход нельзя использовать и в отношении эндогенных химических соединений, также повреждающих ДНК.

Поскольку генотоксическое действие канцерогенных соединений связано с образованием высокореакционноспособных промежуточных метаболитов, эффекты которых можно снизить с помощью приема

антиоксидантов, а ключевые изменения в гомеостазе опухолевых клеток — модулировать биологически активными соединениями, актуальным направлением современной профилактики рака становится химиопрофилактика. Злокачественная трансформация и метастазирование происходят в течение продолжительного интервала времени, поэтому для нивелирования действия канцерогенных агентов необходимо использовать соединения, не вызывающие побочных эффектов в организме при их длительном приеме. Это определяет требования, выдвигаемые в отношении соединений, рассматриваемых в качестве химиопрофилактических [9].

За последние 50 лет в ходе эпидемиологических исследований онкологов была выявлена зависимость частоты возникновения различных форм ЗНО от диеты. В частности, было показано, что у людей, регулярно употребляющих в пищу много продуктов растительного происхождения, вероятность развития ЗНО снижена. Одной из возможных причин, объясняющих такую зависимость, является насыщенность диеты растительными полифенолами — соединениями, относящимися к обширной группе вторичных метаболитов растений. Для этих соединений характерно наличие одного или нескольких ароматических колец с различными гидроксильными группами, обуславливающими их химические свойства и биологические эффекты. Исследования влияния этих соединений показали, что они способны вызывать гибель опухолевых клеток и препятствовать формированию их клонов и опухолевой прогрессии. При этом токсичные дозы соединений как для условно нормальных клеток, культивируемых *in vitro*, так и для организма в целом значительно превышают необходимые для проявления антиканцерогенного действия.

В данном обзоре представлен анализ современных данных о влиянии растительных полифенолов, обладающих антиканцерогенным действием, на инициацию процесса канцерогенеза, а именно на ферменты метаболической активации проканцерогенов, способность проявлять антиоксидантные свойства и на микробиоту, также участвующую в метаболических превращениях проканцерогенов.

СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ

Одной из наиболее значительных особенностей биохимии растений, практически не характерной для представителей царства животных, является способность синтезировать огромное количество различных малых органических молекул разнообразного химического строения, известных под собирательным названием вторичных метаболитов [10]. На сегодняшний день обнаружены более 200 тыс. представителей этой обширной группы соединений [11]. Вторичные метаболиты растений выполняют различные функции, среди которых защита от ультрафиолетового

излучения, регуляция физиологических процессов, обеспечение устойчивости к физическим воздействиям и различных способов взаимодействия с животными [12].

Растительные полифенолы являются одной из наиболее многочисленных групп вторичных метаболитов: к ней относится более 8000 химических веществ различной структуры [13]. Соединения этого типа могут существенно различаться по химическому строению и молекулярной массе, но всегда имеют в своем составе по меньшей мере одно ароматическое кольцо и гидроксильную группу [14]. Существуют несколько вариантов классификации полифенолов, среди которых одной из наиболее распространенных является деление на флавоноидные и нефлавоноидные соединения [15]. Флавоноиды представляют собой производные ароматических аминокислот и имеют трициклическую структуру вида C6-C3-C6 [16]. К ним относят флавонолы, флавоны, изофлавоны, флаваноны, флаванолы, гликозилированные антоцианины и их агликоны антоцианидины [17]. Группа нефлавоноидных соединений включает фенолокислоты, ксантоны, стильбены, танины и лигнаны (рис. 1) [18].

Полифенольные соединения в изобилии встречаются в плодах, листьях и других органах растений, употребляемых человеком в пищу [19]. Полифенолами богаты фрукты, ягоды, бобы и некоторые другие про-

дукты растительного происхождения [20], такие как чай, вино, оливковое масло и приправы. Еще одним источником полифенолов являются лекарственные растения [21]. В разных регионах планеты среднее количество содержащих полифенольные соединения растительных продуктов, используемых людьми, существенно различается [22]. Было отмечено, что длительное употребление большого количества богатых этими соединениями продуктов снижает вероятность развития целого ряда тяжелых хронических заболеваний, в число которых входят не только ЗНО [23], но и метаболический синдром, сахарный диабет 2-го типа, нейродегенеративные амилоидозы, сердечно-сосудистые и некоторые другие заболевания [24].

Ряд исследований, в том числе клинические и предклинические испытания, позволил подтвердить наличие у полифенольных соединений противоопухолевой и антиканцерогенной активности [25, 26]. Так, при использовании культивируемых *in vitro* опухолевых клеток, полученных от пациентов с различными ЗНО, было установлено, что полифенолы могут проявлять проапоптотическую, антиангиогенную и антипролиферативную активность, а также способны ингибировать прохождение клеточного цикла [27]. Это также было продемонстрировано в отношении клеток линии рака молочной железы MCF-7 [28] и нескольких линий рака предстательной железы [29].

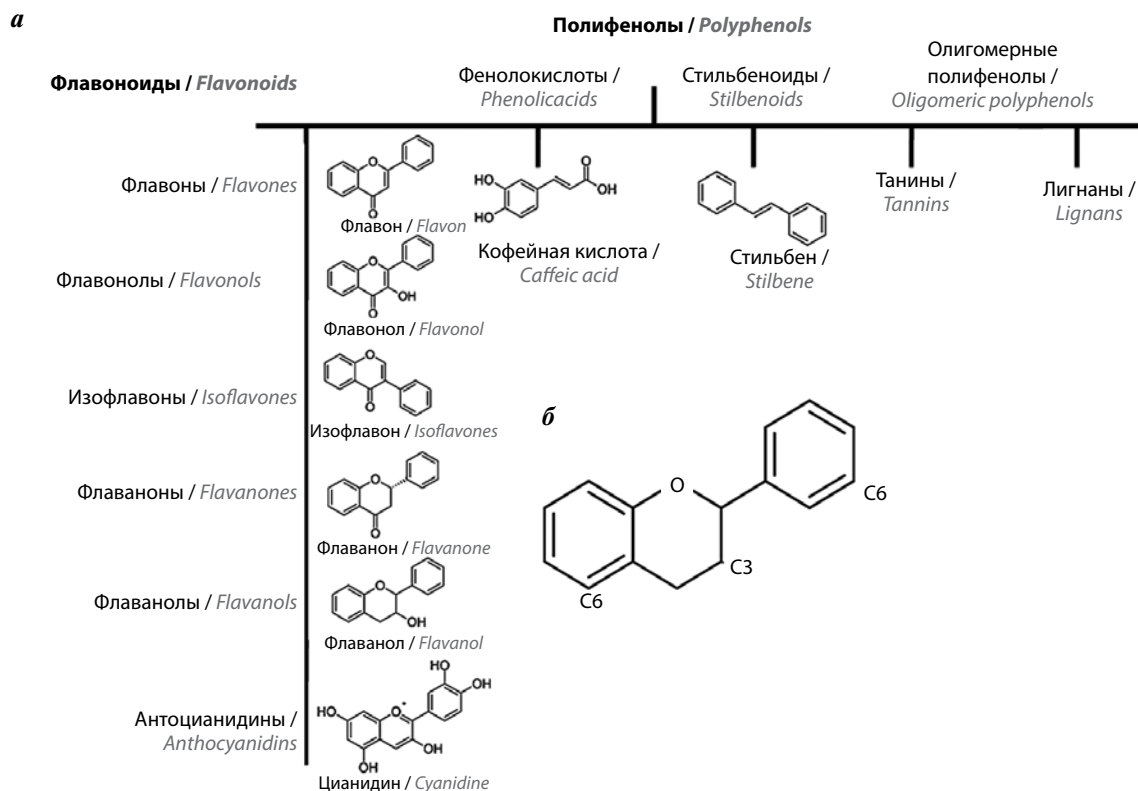


Рис. 1. Структура и классификация растительных полифенолов: а — структуры представителей основных классов полифенольных соединений; б — структура C6-C3-C6 (общая для всех флавоноидных соединений)
Fig. 1. Structure and classification of plant polyphenols: а — structures of the representatives of the main classes of natural polyphenolic compounds; б — C6-C3-C6 structure (common for all flavonoids)

Антиангиогенная активность полифенольных соединений была выявлена на культурах нормальных и опухолевых клеток мышей [30] и человека [31]. Антисканцерогенная активность растительных полифенолов была показана в экспериментах *in vivo* с использованием моделей индуцированного канцерогенеза, а химиотерапевтическая — на опухолевых ксенографтах [32]. Наконец, эффективность полифенолов в качестве потенциальных противоопухолевых и антисканцерогенных препаратов была изучена в ряде доклинических и клинических исследований [33]. Полифенольные соединения и их синтетические аналоги проявляли соответствующую активность как сами по себе, так и в комбинации с другими препаратами [34]. Вместе с тем в отдельных клинических испытаниях выявленные положительные изменения не были статистически значимыми. В частности, в группе пациентов с аденокарциномой предстательной железы, получавших в течение 3–6 нед до операции эпигаллокатехин галлат (ЭГКГ), доля больных со снижением баллов по шкале Глисона между биоптатами и операционными образцами оказалась больше, чем в группе пациентов, получавших плацебо, но эти различия не были статистически значимыми [35]. Препарату, содержащему данный полифенол, не удалось продемонстрировать значимых антисканцерогенных свойств у пациентов с интраэпителиальной неоплазией предстательной железы высокой степени (HG-PIN) [36]. Однако авторы обоих исследований по терапии и профилактике рака предстательной железы связывают полученный результат с небольшой продолжительностью наблюдений. Авторы химиопрофилактического исследования также указывают на недостаточное количество пациентов в анализируемых выборках, поскольку протокол испытания был основан на предыдущих не совсем точных опубликованных данных о вероятности малигнизации предраковых изменений предстательной железы. По-видимому, более эффективным может быть действие комплекса растительных флавоноидов. Так, диета, богатая полифенолами граната, зеленого чая, брокколи и куркумы, тормозила повышение уровня простатического специфического антигена (ПСА) у больных раком простаты. В группе полифенолов за время наблюдения оно составило 14,7 %, а в группе плацебо — 78,5 % [36].

Подтвержденная противоопухолевая и антисканцерогенная активность полифенолов стала основой для выявления конкретных молекулярных механизмов их действия. В отличие от многих других применяемых в медицинской практике вторичных метаболитов растений, взаимодействующих с одной или несколькими конкретными мишенями, полифенольные соединения способны взаимодействовать с макромолекулами разных классов [37]. Так, продемонстрировано, что противоопухолевая активность полифенолов может быть обусловлена их специфическим взаимодействием с белками [38] и неспецифической шаперонной актив-

ностью [39]. Показана способность полифенолов селективно накапливаться в липидных рафтах клеточных мембран, что приводит к изменению экспрессии поверхностных рецепторных белков [40]. Еще одной мишенью этих соединений являются нуклеиновые кислоты. Полифенолы способны взаимодействовать с двуцепочечной ДНК, выступая при этом в качестве как интеркаляторов, так и лигандов большой и малой бороздок [41]. Кроме того, они могут взаимодействовать с различными вторичными структурами нуклеиновых кислот, таких как гуаниновые квадруплексы [42]. Таким образом, современная информация относительно антисканцерогенной активности растительных полифенольных соединений позволяет рассматривать их в качестве перспективной основы для разработки химиопрофилактических препаратов.

ПОЛИФЕНОЛЫ И МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ ПРОКАНЦЕРОГЕНОВ

Метаболизм канцерогенов, как и многих других ксенобиотиков, включает стадии: 1) метаболической активации и 2) детоксикации и последующего выведения из организма [43]. Ключевую роль в регуляции метаболизма ксенобиотиков играет цитоплазматический рецептор ароматических углеводов AhR, запускающий экспрессию ферментов метаболизма ксенобиотиков [44]. После взаимодействия с лигандом комплекс AhR с белками-шаперонами, включая p23 и Hsp90, перемещается в ядро и в результате конформационных изменений диссоциирует с высвобождением AhR. В ядре рецептор формирует активный гетеродимер с белком Arnt, который взаимодействует с соответствующими респонсивными элементами XRE (xenobiotic response elements) генов ферментов метаболизма ксенобиотиков. Основными лигандами AhR являются соединения с несколькими ароматическими кольцами, к которым относятся и многие растительные полифенолы [45]. Взаимодействие с растительными полифенолами способно изменять активность AhR в клетке по нескольким различным механизмам, самым изученным из которых является прямое конкурентное ингибирование. Так, продемонстрировано, что препятствовать активации AhR полициклическими органическими соединениями в клеточных экстрактах способны куркумин [46], кверцитин [47], ресвератрол [48], а также флавоны, апигенин, лютеолин и галангин (рис. 2) [49]. Диапазон концентраций полифенолов в этих экспериментах составлял от 0,019 до 50 мМ. Подавлять вызванную диоксином активацию регулируемого AhR гена цитохрома CYP1A1 в культуре клеток карциномы толстой кишки человека Caco2 оказались способны кемпферол, лютеолин, апигенин и физетин. При этом обработка данной культуры клеток кверцитином, робинетином, морином и таксифолином как в отдельности, так и в комбинации с диоксином не только не снижала экспрессии регулируемых AhR генов, но и значительно усиливала

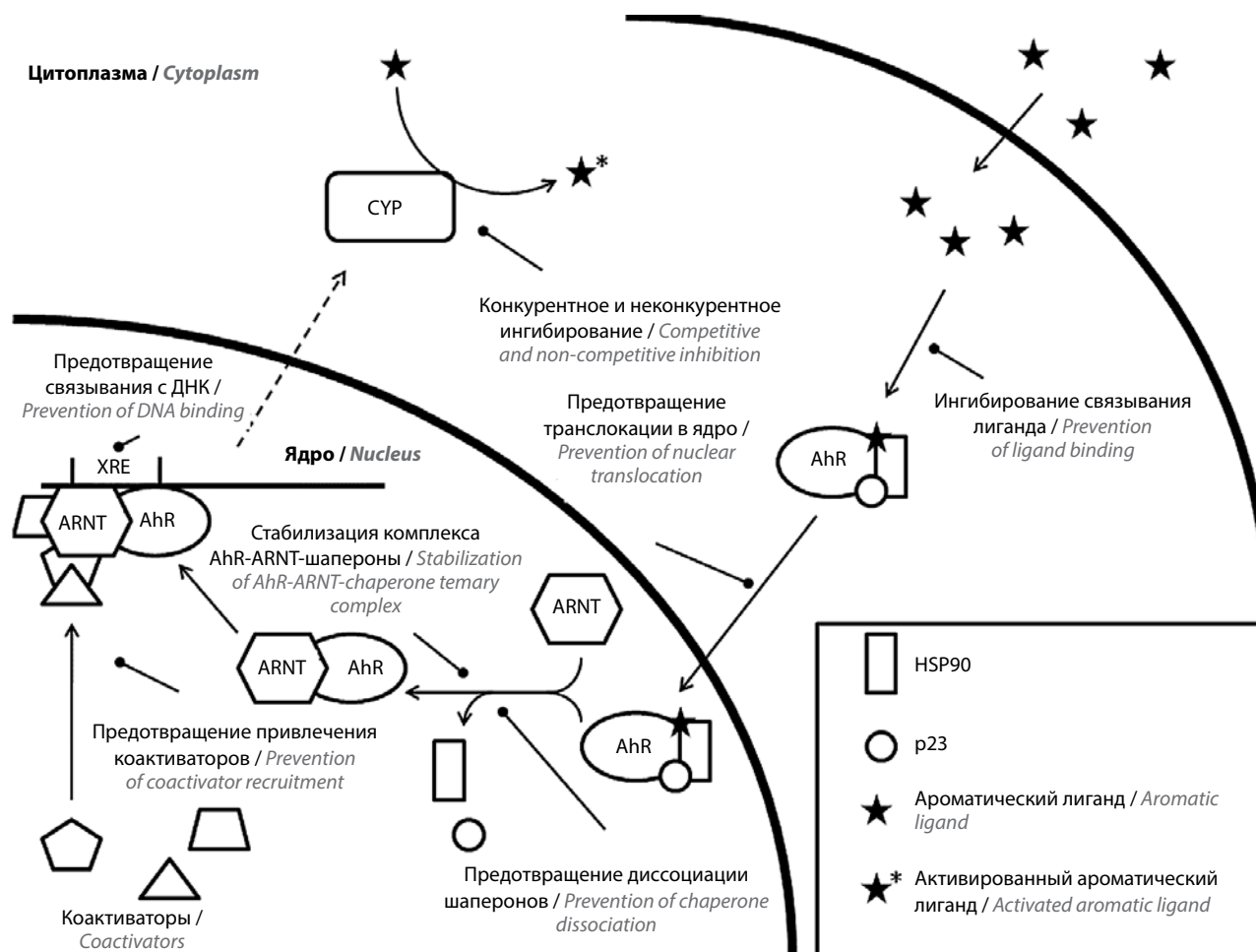


Рис. 2. Взаимодействие растительных полифенолов с механизмами метаболической активации ксенобиотиков

Fig. 2. Interactions between plant polyphenols and mechanisms of metabolic activation of xenobiotics

ее [50]. Активация AhR была продемонстрирована на трансгенной культуре клеток мыши H1L6.1c2 с помощью репортерного люциферазного анализа для кверцитина, нарингина, гесперидина и гесперитина [51]. Авторы отмечают, что агонистами AhR оказались только флавоноиды с 5 гидроксильными остатками, тогда как соединения с большим или меньшим числом этих заместителей действовали как антагонисты или вообще не проявляли активности в отношении AhR-рецептора. Анализ полученных в ходе многолетних исследований данных о зависимости закономерностей взаимодействия растительных полифенолов с рецептором AhR от их структурных характеристик позволил разработать молекулярные модели, с высокой точностью предсказывающие способность полифенольных соединений быть агонистами рецептора в системах *in vitro* [52]. Тем не менее общие механизмы действия и закономерности влияния растительных полифенолов на функционирование AhR в настоящий момент не могут быть однозначно сформулированы [53]. Помимо огромного разнообразия полифенолов ситуация осложняется еще и тем, что в разных экспериментальных условиях одни и те же соединения могут демон-

стрировать в отношении этого рецептора разнонаправленные эффекты.

Влияние данных соединений на активность AhR, однако, не исчерпывается прямым конкурентным ингибированием или активацией. Полифенолы способны влиять на несколько стадий передачи сигнала этим рецептором. Так, продемонстрировано, что в культурах клеток MCF-7 и Hера-1c1c7 галангин, апигенин, лютеолин, флаван, кемпферол [54], куркумин [55] и ресвератрол [48] в концентрациях от 5 до 50 μM препятствуют транслокации активированного AhR в ядро. Установлено также, что обработка клеток полифенолами может мешать формированию активного комплекса AhR и Arnt. В клетках Hера-1c1c7 подобную активность проявляют галангин [56], нарингенин, кемпферол, апигенин [54] и ЭГКГ [54, 57]. При этом галангин и ЭГКГ препятствовали димеризации AhR и Arnt, блокируя диссоциацию комплексов шаперонов и AhR, а апигенин и кемпферол стабилизировали трехсоставный комплекс AhR, Arnt и шаперона. Нарингенин, кемпферол, апигенин и ЭГКГ мешали фосфорилированию Arnt, что необходимо для димеризации рецептора. Активный гетеродимер AhR-Arnt

также является мишенью для нескольких полифенолов, препятствующих его взаимодействию с ответными элементами промоторов таргетных для AhR генов. В культурах опухолевых клеток мешать связыванию димера с ДНК способны ресвератрол [58], куркумин [55], кверцетин, кемпферол [47] и галангин [56]. Препятствовать активации транскрипции с регулируемых AhR генов полифенолы могут и путем взаимодействия с корегуляторами, такими как рецептор эстрогена α (ER α), что продемонстрировано для ресвератрола [48] и генистеина [59]. Кемпферол [60] оказался способен предотвращать привлечение к связавшемуся с ДНК комплексу AhR-Arnt таких коактиваторов, как CREB-связывающий белок и коактиватор ядерных рецепторов 3 (nuclear receptor co-activator 3, NCoA3), однако степень влияния вызываемых полифенолами изменений во взаимодействии корегуляторов с AhR на эффективность транскрипции остается неясной. Необходимо отметить, что в некоторых случаях обработка полифенолами не подавляла, а усиливала ту или иную стадию передачи сигнала рецептором AhR. Так, обработка клеток Нера-1c1c7 куркумином способствовала транслокации рецептора, связавшего лиганд, в ядро [55]. Вместе с тем куркумин эффективно ингибирует стадии активации AhR, в частности образование гетеродимера с Arnt.

Активация рецептора AhR усиливает экспрессию генов ряда ферментов, важнейшими из которых являются белки семейства цитохрома P450. У человека известны 57 генов и 59 псевдогенов белков этого семейства, а сами эти белки вовлечены в большое количество разнообразных окислительно-восстановительных реакций, необходимых не только для метаболизма ксенобиотиков, но и для биосинтеза желчных кислот и холестерина, окисления ненасыщенных жирных кислот, метаболизма стероидных гормонов и витаминов [61]. Реакции метаболической активации низкомолекулярных органических веществ, приводящие в том числе к активации проканцерогенов, осуществляют ферменты, принадлежащие к семействам цитохромов 1, 2 и 3, важнейшими из которых являются CYP1A1, A2, A6, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C9 и CYP3A4 [62]. Следует отметить, что полифенолы не только способны влиять на профиль и интенсивность экспрессии генов цитохромов P450, но и в результате непосредственного взаимодействия могут ингибировать активность белков этого семейства. Так, с помощью спектрофотометрии и молекулярного моделирования было установлено, что целый ряд природных флавоноидов и их производных способен взаимодействовать с активными центрами цитохромов CYP1A1, 1A2, 1B1, 2C9 и 3A4 [63]. Для двух последних изоформ было также установлено, что ингибирование их активности флавоноидами проходит как по конкурентному, так и по неконкурентному механизмам [64]. Важно отметить, что для некоторых флавоноидов, таких как амен-тофлаван, апигенин и галангин, измеренная в ходе

соответствующих исследований концентрация полумаксимального ингибирования оказалась существенно ниже их зарегистрированной ранее концентрации в плазме крови человека, что указывает на физиологическую значимость влияния полифенолов на ферментативную активность цитохромов.

ПОЛИФЕНОЛЫ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

Эндогенным источником повреждений ДНК являются активные формы кислорода (АФК), постоянно образуемые в организме в ходе окислительно-восстановительных реакций метаболизма, оксид азота (NO), продуцируемый NO-синтазами и участвующий в регуляции гомеостаза целого ряда жизненно важных систем организма, высокореакционноспособные промежуточные метаболиты холестерина, желчных кислот, триптофана, тирозина и некоторых других органических соединений [65]. Источниками свободных радикалов в клетках человека являются не только окислительно-восстановительные реакции метаболизма, но и воздействие различных видов электромагнитного излучения. Они образуются также в ходе реакций, катализируемых ионами переходных металлов, таких как железо и медь [66]. Уровень их содержания влияет не только на стабильность ДНК, но и на метаболическую активацию экзогенных проканцерогенов [67]. Помимо ДНК, свободные радикалы способны повреждать и клеточные белки, вызывая утрату ими своих функций [68]. Поскольку эндогенные источники свободных радикалов принципиально неустранимы, существование живых организмов невозможно без развития систем их нейтрализации, состоящих из окислительно-восстановительных ферментов и их кофакторов, каталитически реагирующих со свободными радикалами и таким образом нейтрализующих их [69]. Растительные полифенолы, имея многочисленные гидроксильные группы и некоторые другие фрагменты структуры, могут взаимодействовать со свободными радикалами [70]. Известны 4 различных типа подобных реакций, 3 из которых представляют собой перенос протона или электрона с полифенола на радикал по различным механизмам; 4-й тип — это формирование аддукта полифенола с радикалом [71].

В экспериментах *in vitro* показано, что катехины и их производные обладают антиоксидантной активностью [72] как в виде чистых соединений, так и в составе экстрактов из растительного сырья. Эпигаллокатехин галлат демонстрировал антиоксидантную активность и существенно снижал эффект индукции неорганических радикалов фторидом натрия в экспериментах на животных [73]. Галловая кислота предотвращала развитие инициируемой диметилгидразином карциномы толстой кишки у крыс за счет уменьшения вызываемого этим канцерогеном окислительного стресса [74]. Кверцетин проявил похожую активность, снижая интенсивность окислительного стресса и предотвращая развитие индуцируемой высокими дозами

тестостерона карциномы предстательной железы у крыс [75]. Фенольные соединения в составе экстрактов листьев зеленого чая оказались способны повышать антиоксидантные свойства плазмы крови здоровых добровольцев [76]. По данным целого ряда клинических исследований, употребление антоцианинов как в чистом виде, так и в составе сложных смесей и продуктов питания снижало концентрацию биомаркеров окислительного стресса, таких как малоновый диальдегид и окисленные липопротеины низкой плотности [77]. При этом было отмечено, что активность глутатионпероксидазы и супероксиддисмутаза увеличивается наряду с повышением общей антиоксидантной активности и что у пациентов с различными заболеваниями прием антоцианинов оказывал более выраженное влияние на окислительно-восстановительное равновесие, чем у здоровых испытуемых.

Растительные полифенолы предотвращают окислительный стресс, не только нейтрализуя уже существующие свободные радикалы, но и препятствуя их образованию. Так, установлено, что фенольные соединения способны выступать в качестве хелаторов ионов металлов и снижать таким образом интенсивность катализируемых ими реакций, продуцирующих свободные радикалы. Подобная активность была выявлена как для флавоноидов [78], так и для нефлавоноидных полифенолов, в числе которых оказались фенолоксалаты, структура которых включает только одно ароматическое кольцо [79].

Несмотря на то что в экспериментах *in vitro* и некоторых исследованиях с использованием культур клеток и подопытных животных полифенолы демонстрировали антиоксидантную активность, позднее было установлено, что их влияние на окислительно-восстановительный статус клетки может быть и более сложным; в ряде случаев они оказались прооксидантами [80]. Эти соединения проявляют прооксидантные свойства при высоких концентрациях, значениях pH или в присутствии ионов некоторых переходных металлов [81]. Парадоксально, но такая активность полифенолов также в конечном счете может способствовать усилению защиты клетки от окислительного стресса: количества образующихся под влиянием физиологических концентраций полифенолов АФК недостаточно для индукции генетических нарушений, однако это приводит к активации многочисленных сигнальных путей, участвующих в регуляции уровня этих форм кислорода [82].

Примечательно, что одним из прооксидантных полифенолов оказался ЭГКГ, ранее рассматриваемый как сильный антиоксидант. Также было установлено, что в силу многочисленных изменений в регуляции сигнальных путей в опухолевых клетках их обработка полифенолами вместо снижения окислительного стресса и уменьшения концентрации свободных радикалов приводила к увеличению этих параметров и последующему снижению интенсивности пролиферации и индукции апоптоза [81].

Помимо прямого взаимодействия со свободными радикалами, полифенолы способны влиять на их содержание в клетках путем изменения интенсивности различных клеточных метаболических процессов, как генерирующих свободные радикалы, так и нейтрализующих их. Одним из ключевых регуляторных белков, отвечающих за активацию транскрипции генов, кодирующих факторы ответа на окислительный стресс, является транскрипционный фактор Nrf2. Окислительный стресс вызывает диссоциацию связанного с этим белком репрессора Keap1, убиквитинилирование которого в норме индуцирует протеасомную деградацию всего комплекса, что ведет к накоплению активного Nrf2 в ядре и активации регулируемых им генов [83]. Установлено, что кверцетин может препятствовать убиквитинилированию Keap1, содействуя сохранению и активации Nrf2 [84]. Эпигаллокатехин галлат оказался способен усиливать активность Nrf2 в легочной ткани крыс, что вызывало снижение окислительного стресса, индуцируемого ионами фтора [73]. Согласно данным молекулярного докинга, этот эффект может быть обусловлен взаимодействием ЭГКГ с Keap1, что мешает формированию комплекса данного белка с Nrf2 и таким образом предотвращает протеасомную деградацию последнего. Аналогичные данные были получены в отношении галловой кислоты, которая делала невозможным индуцируемый трет-бутилгидропероксидом окислительный стресс в культуре клеток печени человека L02 за счет нарушения комплексообразования между Nrf2 и Keap1 [85]. Способность повышать концентрацию Nrf2 в клетке, снижая таким образом вызванный диетой с высоким содержанием фруктозы окислительный стресс у мышей, продемонстрирована и для апигенина [86]. Как и в двух предыдущих исследованиях, данные молекулярного моделирования свидетельствуют о способности апигенина взаимодействовать с Keap1.

Помимо комплекса Nrf2/Keap1, растительные полифенолы способны влиять и на другие белки, участвующие в регуляции окислительно-восстановительного баланса клетки. Так, смесь полифенолов зеленого чая ингибировала экспрессию субъединиц НАДФ-Н-оксидазы, снижая таким образом продукцию АФК. Продемонстрирована способность ЭГКГ и теафлавин-3,3'-дигаллата ингибировать стимулируемую липополисахаридами экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) [87, 88]. При рассмотрении антиоксидантной активности полифенолов в качестве противоопухолевой и химиопрофилактической мер необходимо учитывать, что АФК и NO не только являются объектами строгой регуляции, но и вовлечены в регуляцию множества клеточных процессов [89]. Существуют также обоснованные сомнения относительно корректности прямой экстраполяции антиоксидантной активности различных веществ *in vitro* на их биологические эффекты *in vivo* [90]. Эти обстоятельства заставляют относиться с осторожностью к применению

высоких доз полифенолов с антиоксидантной активностью в качестве противоопухолевых препаратов [91], особенно в комбинации с другими лекарственными и физиотерапевтическими подходами, некоторые из которых основаны на индукции образования больших количеств реакционноспособных радикалов, вызывающих гибель злокачественных клеток [92, 93]. Таким образом, при использовании полифенолов в качестве противоопухолевых или химиопрофилактических препаратов следует учитывать их антиоксидантную активность [94].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С МИКРОФЛОРОЙ ПАЦИЕНТОВ

При рассмотрении возможности применения препаратов полифенолов для химиопрофилактики канцерогенеза необходимо учитывать их взаимодействие с микрофлорой. Большую часть микрофлоры человеческого организма составляет микробиота кишечника, именно она оказывает самое значимое влияние на метаболизм и физиологическое действие поступающих в организм полифенолов. Известно, что продукты бактериального метаболизма фенольных соединений могут проявлять активность, отличающуюся от таковой у исходного вещества [95]. Наиболее известными примерами таких метаболитов являются эквол [96] и уролитины [97], синтезируемые кишечной микробиотой из даидзеина и эллагитаннинов соответственно. Ряд исследований указывает на их противоопухолевую и антиканцерогенную активность.

Продemonстрировано, что обработка экволом клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 подавляет рост культуры и индуцирует апоптоз за счет стимуляции экспрессии микроРНК miR-10a-5p и последующего ингибирования сигнального пути PI3K (фосфоинозитид-3-киназа)/АКТ (протеинкиназа В) [98]. В культуре клеток аденокарциномы толстой кишки НСТ-15 эквол оказался способен усиливать экспрессию фактора Nrf2, подавляя тем самым пролиферативную активность этой культуры [99]. Эквол проявлял также антиканцерогенную активность: диета с высоким содержанием данного фенольного соединения снижала эффективность индукции злокачественных опухолей молочных желез диметилбензантраценом у крыс [100]. В случае индукции ЗНО легких уретаном у мышей аналогичная диета также снижала интенсивность канцерогенеза, одновременно повышая концентрацию сывороточной супероксиддисмутазы и уменьшая концентрацию маркеров окислительного стресса [101].

Противоопухолевая активность обнаружена также и для уролитинов: обработка уролитином А культур клеток карцином предстательной железы 22RV1 и LNCaP индуцировала апоптоз и повышала экспрессию цитохрома p53 [102]. Сходное влияние уролитинов на экспрессию p53 было показано и для культур клеток ЗНО толстой кишки [103]. Обработка уролитином этих культур также вызывала остановку клеточного цикла,

индуцировала апоптоз и повышала выработку активных форм кислорода. Примечательно, что в культурах нормальных фибробластов человека обработка этим соединением оказывала на содержание АФК обратный эффект [104]. Зависимость направленности модуляции окислительного стресса уролитоинами от типа клеточной культуры была продемонстрирована многократно; ее причины носят комплексный характер и включают в себя как состояние антиоксидантных механизмов клетки, так и тип индуцирующего окислительный стресс воздействия [105]. Проапоптотический и антипролиферативный эффекты уролитинов обусловлены не только упомянутыми механизмами: эти вещества способны влиять на передачу сигнала через пути PI3K/АКТ, NF-κB (nuclear factor κB, транскрипционный ядерный фактор κB) и WNT/β-катенин [106].

Немаловажное значение для профилактики канцерогенеза имеет поддержание благоприятного состава кишечной микробиоты человека. Хорошо известно, что присутствие в ее составе определенных видов и штаммов микроорганизмов, таких как *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) или продуцирующие колибактин представители семейства *Enterobacteriaceae*, ассоциировано с повышенным риском возникновения злокачественных опухолей [107]. Полифенолы обладают подтвержденными антибактериальными свойствами [108], благодаря которым способны модулировать состав кишечной микрофлоры. Так, силибинин может подавлять рост *H. pylori* в культуре, вызывая изменения в морфологии клеток и ингибируя их деление [109]. Байкалин и байкалеин продемонстрировали антибактериальную активность в отношении этого микроорганизма не только *in vitro*, но и *in vivo*, уменьшая бактериальную нагрузку инфицированных мышей за счет снижения адгезивности и инвазивности бактериальных клеток [110]. В отношении *Enterobacteriaceae* была показана способность генистеина предотвращать увеличение присутствия этой группы микроорганизмов в микрофлоре потомства самок крыс при диете с высоким содержанием жиров, что сочеталось со снижением риска развития рецидива ЗНО молочной железы [111].

Высокая интенсивность химической модификации полифенолов кишечной микробиотой наряду с низкой растворимостью обуславливает существенное препятствие на пути терапевтического применения этих веществ — их низкую биодоступность. Это относится к фенольным соединениям как в составе продуктов питания и растительных экстрактов, так и в виде препаратов, содержащих чистые вещества. В некоторых случаях не удавалось добиться значимого повышения концентрации полифенолов в плазме крови испытуемых даже после приема большого количества этих соединений [112]. С целью преодоления данной проблемы ведутся разработки новых лекарственных форм для растительных фенольных соединений, таких как различные наночастицы или липосомы [113].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растительные полифенолы обладают антиканцерогенной и противоопухолевой активностью. Они способны влиять на метаболическую активацию проканцерогенов и снижать содержание реакционноспособных соединений в клетках, предотвращая тем самым повреждение клеточных макромолекул. В связи с этим полифенолы могут рассматриваться в качестве потенциальных средств профилактики рака, направленных на ингибирование метаболической активации проканцерогенов или детоксикацию путем образования нейтральных комплексов с последующей экскрецией. В то же время в определенных условиях полифенольные соединения способны оказывать прямо противоположное действие на процесс канцерогенеза.

В частности, они могут быть не только антагонистами AhR и подавлять регулируемую им экспрессию ферментов I фазы метаболизма ксенобиотиков, но и активировать этот рецептор. Аналогично их влияние и на окислительный стресс. Результат действия полифенолов зависит от их химической структуры, типа опухолей, в отношении которых требуется проведение профилактических мероприятий, состояния микробиоты организма и других факторов. В связи с этим механизмы действия данных соединений и условия их применения требуют дальнейшего изучения. Одним из перспективных путей достижения названной цели является использование высокопроизводительных омиксных подходов, позволяющих проводить интегральную оценку эффекта ксенобиотика [114].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov* 2022;12(1):31–46. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059
- Barnes J.L., Zubair M., John K. et al. Carcinogens and DNA damage. *Biochem Soc Trans* 2018;46(5):1213–24. DOI: 10.1042/BST20180519
- Santivasi W.L., Xia F. Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxid Redox Signal* 2014;21:251–9. DOI: 10.1089/ars.2013.5668
- Smith A.J., Smith L.A. Viral carcinogenesis. In: *Progress in molecular biology and translational science*. Elsevier, 2016. Pp. 121–168.
- Tomasetti C., Li L., Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* 2017;355(6331):1330–4. DOI: 10.1126/science.aaf9011
- Mucci L.A., Hjelmborg J.B., Harris J.R. et al. Familial risk and heritability of cancer among twins in nordic countries. *JAMA* 2016;315(1):68–76. DOI: 10.1001/jama.2015.17703
- Song M., Vogelstein B., Giovannucci E.L. et al. Cancer prevention: molecular and epidemiologic consensus. *Science* 2018;361(6409):1317–8. DOI: 10.1126/science.aau3830
- Maksimova V., Shalginskikh N., Vlasova O. et al. HeLa TI cell-based assay as a new approach to screen for chemicals able to reactivate the expression of epigenetically silenced genes. *PLoS One* 2021;16(6):e0252504. DOI: 10.1371/journal.pone.0252504
- Kirsanov K., Fetisov T., Lesovaya E.A. et al. Prevention of colorectal carcinogenesis by DNA-binding small-molecule curaxin CBL0137 involves suppression of wnt signaling. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* 2020;13(1):53–64. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-19-0198
- Erb M., Kliebenstein D.J. Plant Secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. *Plant Physiol* 2020;184(1):39–52. DOI: 10.1104/pp.20.00433
- Valdés-Jiménez A., Peña-Varas C., Borrego-Muñoz P. et al. PSC-db: a structured and searchable 3d-database for plant secondary compounds. *Molecules* 2021;26(4):1124. DOI: 10.3390/molecules26041124
- War A.R., Paulraj M.G., Ahmad T. et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav* 2012;7(10):1306–20. DOI: 10.4161/psb.21663
- Cheyrier V., Comte G., Davies K.M. et al. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol Biochem PPB* 2013;72:1–20. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.05.009
- El Gharras H. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review: nutraceutical polyphenols. *Int J Food Sci Technol* 2009;44:2512–8. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x
- Fruit and vegetable phytochemicals. Ed. by L.A. De la Rosa, E. Alvarez-Parrilla, G.A. Gonzalez-Aguilar. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2009.
- Khoddami A., Wilkes M., Roberts T. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 2013;18(2):2328–75. DOI: 10.3390/molecules18022328
- Singla R.K., Dubey A.K., Garg A. et al. Natural polyphenols: chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *J AOAC Int* 2019;102(5):1397–400. DOI: 10.5740/jaoacint.19-0133
- Soto-Vaca A., Gutierrez A., Losso J.N. et al. Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. *J Agric Food Chem* 2012;60(27):6658–77. DOI: 10.1021/jf300861c
- Corcoran M.P., McKay D.L., Blumberg J.B. Flavonoid basics: chemistry, sources, mechanisms of action, and safety. *J Nutr Gerontol Geriatr* 2012;31(3):176–89. DOI: 10.1080/21551197.2012.698219
- Pérez-Jiménez J., Neveu V., Vos F., Scalbert A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *Eur J Clin Nutr* 2010;64:S112–20. DOI: 10.1038/ejcn.2010.221
- Van Wyk B.-E., Wink M. Medicinal plants of the world: an illustrated scientific guide to important medicinal plants and their uses. 1st edn. Timber Press, Portland, 2004.
- Pallauf K., Giller K., Huebbe P., Rimbach G. Nutrition and healthy ageing: calorie restriction or polyphenol-rich “Mediterranean” diet? *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:707421. DOI: 10.1155/2013/707421
- Grosso G., Godos J., Lamuela-Raventos R. et al. A comprehensive meta-analysis on dietary flavonoid and lignan intake and cancer risk: level of evidence and limitations. *Mol Nutr Food Res* 2017;61(4). DOI: 10.1002/mnfr.201600930
- Leri M., Scuto M., Ontario M.L. et al. Healthy effects of plant polyphenols: molecular mechanisms. *Int J Mol Sci* 2020;21(4):1250. DOI: 10.3390/ijms21041250
- Кирсанов К.И., Власова О.А., Фетисов Т.И. и др. Влияние ДНК-тропных антиканцерогенных соединений на механизмы регуляции экспрессии генов. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(4):41–63. DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-41-63
- Kirsanov K.I., Vlasova O.A., Fetisov T.I. et al. Influence of DNA-binding compounds with cancer preventive activity on the mechanisms of gene expression regulation. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):41–63. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-41-63

26. Patra S., Pradhan B., Nayak R. et al. Dietary polyphenols in chemoprevention and synergistic effect in cancer: clinical evidences and molecular mechanisms of action. *Phytomedicine* 2021;90:153554. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153554
27. Hazafa A., Rehman K.-U., Jahan N., Jabeen Z. The role of polyphenol (flavonoids) compounds in the treatment of cancer cells. *Nutr Cancer* 2020;72(3):386–97. DOI: 10.1080/01635581.2019.1637006
28. Duo J., Ying G.-G., Wang G.-W., Zhang L. Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Mol Med Rep* 2012;5(6):1453–6. DOI: 10.3892/mmr.2012.845
29. Adhami V.M., Malik A., Zaman N. et al. Combined inhibitory effects of green tea polyphenols and selective cyclooxygenase-2 inhibitors on the growth of human prostate cancer cells both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2007;13(5):1611–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2269
30. Chua C.C., Hamdy R.C., Chua B.H. Mechanism of transforming growth factor-beta1-induced expression of vascular endothelial growth factor in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochim Biophys Acta* 2000;1497(1):69–76. DOI: 10.1016/S0167-4889(00)00040-9
31. Chadalapaka G., Jutooru I., Chintharlapalli S. et al. Curcumin decreases specificity protein expression in bladder cancer cells. *Cancer Res* 2008;68(13):5345–54. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6805
32. Zhou Y., Zheng J., Li Y. et al. Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients* 2016;8(8):515. DOI: 10.3390/nu8080515
33. Choudhari A.S., Mandave P.C., Deshpande M. et al. Phytochemicals in cancer treatment: from preclinical studies to clinical practice. *Front Pharmacol* 2019;10:1614. DOI: 10.3389/fphar.2019.01614
34. Bisol Á., Campos P.S., Lamers M.L. Flavonoids as anticancer therapies: a systematic review of clinical trials. *Phytother Res* 2020;34(3):568–82. DOI: 10.1002/ptr.6551
35. Nguyen M.M., Ahmann F.R., Nagle R.B. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of polyphenon E in prostate cancer patients before prostatectomy: evaluation of potential chemopreventive activities. *Cancer Prev Res Phila Pa* 2012;5(2):290–8. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0306
36. Thomas R., Williams M., Sharma H. et al. A double-blind, placebo-controlled randomised trial evaluating the effect of a polyphenol-rich whole food supplement on PSA progression in men with prostate cancer – the UK NCRN Pomi-T study. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2014;7(2):180–6. DOI: 10.1038/pcan.2014.6
37. Wink M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines* 2015;2(3):251–86. DOI: 10.3390/medicines2030251
38. Tachibana H., Koga K., Fujimura Y., Yamada K. A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11(4):380–1. DOI: 10.1038/nsmb743
39. Kuzuhara T., Suganuma M., Fujiki H. Green tea catechin as a chemical chaperone in cancer prevention. *Cancer Lett* 2008;261(1):12–20. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.10.037
40. Fujimura Y., Tachibana H., Yamada K. Lipid raft-associated catechin suppresses the FcεRI expression by inhibiting phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase1/2. *FEBS Lett* 2004;556(1–3):204–10. DOI: 10.1016/S0014-5793(03)01432-7
41. N'soukpoé-Kossi C.N., Bourassa P., Mandeville J.S. et al. Structural modeling for DNA binding to antioxidants resveratrol, genistein and curcumin. *J Photochem Photobiol B* 2015;151:69–75. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2015.07.007
42. Zenkov R.G., Kirsanov K.I., Ogloblina A.M. et al. Effects of G-Quadruplex-binding plant secondary metabolites on c-MYC expression. *Int J Mol Sci* 2022;23(16):9209. DOI: 10.3390/ijms23169209
43. Omiecinski C.J., Vanden Heuvel J.P., Perdew G.H., Peters J.M. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol Sci* 2011;120(Suppl.1):S49–75. DOI: 10.1093/toxsci/kfq338
44. Denison M.S., Soshilov A.A., He G. et al. Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol Sci* 2011;124(1):1–22. DOI: 10.1093/toxsci/kfr218
45. Xue Z., Li D., Yu W. et al. Mechanisms and therapeutic prospects of polyphenols as modulators of the aryl hydrocarbon receptor. *Food Funct* 2017;8(4):1414–37. DOI: 10.1039/C6FO01810F
46. Ciolino H.P., Daschner P.J., Wang T.T.Y., Yeh G.C. Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 1998;56(2):197–206. DOI: 10.1016/S0006-2952(98)00143-9
47. Ciolino H.P., Daschner P.J., Yeh G.C. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem J* 1999;340(Pt. 3):715–22.
48. Perdew G.H., Hollingshead B.D., Dinatale B.C. et al. Estrogen receptor expression is required for low-dose resveratrol-mediated repression of aryl hydrocarbon receptor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;335(2):273–83. DOI: 10.1124/jpet.110.170654
49. Fukuda I., Mukai R., Kawase M. et al. Interaction between the aryl hydrocarbon receptor and its antagonists, flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;359(3):822–7. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.05.199
50. Jin U.-H., Park H., Li X. et al. Structure-dependent modulation of aryl hydrocarbon receptor-mediated activities by flavonoids. *Toxicol Sci* 2018;164(1):205–17. DOI: 10.1093/toxsci/kfy075
51. Kaur M., Badhan R.K.S. Phytochemical mediated-modulation of the expression and transporter function of breast cancer resistance protein at the blood-brain barrier: an in-vitro study. *Brain Res* 2017;1654(Pt. A):9–23. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.10.020
52. Goya-Jorge E., Giner R.M., Sylla-Iyarreta Veitia M. et al. Predictive modeling of aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonism. *Chemosphere* 2020;256:127068. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127068
53. Goya-Jorge E., Jorge Rodríguez M.E., Veitia M.S.-I., Giner R.M. Plant occurring flavonoids as modulators of the aryl hydrocarbon receptor. *Molecules* 2021;26(8):2315. DOI: 10.3390/molecules26082315
54. Mukai R., Shirai Y., Saito N. et al. Suppression mechanisms of flavonoids on aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Arch Biochem Biophys* 2010;501(1):134–41. DOI: 10.1016/j.abb.2010.05.002
55. Nishiumi S., Yoshida K.-I., Ashida H. Curcumin suppresses the transformation of an aryl hydrocarbon receptor through its phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* 2007;466(2):267–73. DOI: 10.1016/j.abb.2007.08.007
56. Quadri S.A., Qadri A.N., Hahn M.E. et al. The bioflavonoid galangin blocks aryl hydrocarbon receptor activation and polycyclic aromatic hydrocarbon-induced pre-B cell apoptosis. *Mol Pharmacol* 2000;58(3):515–25. DOI: 10.1124/mol.58.3.515
57. Palermo C.M., Westlake C.A., Gasiewicz T.A. Epigallocatechin gallate inhibits aryl hydrocarbon receptor gene transcription through an indirect mechanism involving binding to a 90 kDa heat shock protein. *Biochemistry* 2005;44(13):5041–52. DOI: 10.1021/bi047433p
58. Ciolino H.P., Daschner P.J., Yeh G.C. Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 in vitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res* 1998;58(24):5707–12.
59. Froyen E.B., Steinberg F.M. Genistein decreases basal hepatic cytochrome P450 1A1 protein expression and activity in Swiss Webster mice. *Nutr Res* 2016;36(5):430–9. DOI: 10.1016/j.nutres.2016.01.001
60. Macpherson L., Matthews J. Inhibition of aryl hydrocarbon receptor-dependent transcription by resveratrol or kaempferol is

- independent of estrogen receptor α expression in human breast cancer cells. *Cancer Lett* 2010;299(2):119–29. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.08.010
61. Manikandan P., Nagini S. Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review. *Curr Drug Targets* 2018;19(1):38–54. DOI: 10.2174/1389450118666170125144557
 62. Wahlang B., Falkner K.C., Cave M.C., Prough R.A. Role of cytochrome P450 monooxygenase in carcinogen and chemotherapeutic drug metabolism. In: *Advances in Pharmacology*. Elsevier, 2015. Pp. 1–33.
 63. Shimada T., Tanaka K., Takenaka S. et al. Structure-function relationships of inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, 1B1, 2C9, and 3A4 by 33 flavonoid derivatives. *Chem Res Toxicol* 2010;23(12):1921–35. DOI: 10.1021/tx100286d
 64. Kimura Y., Ito H., Ohnishi R., Hatano T. Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food Chem Toxicol* 2020;48(1):429–35. DOI: 10.1016/j.fct.2009.10.041
 65. De Bont R. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 2004;19(3):169–85. DOI: 10.1093/mutage/geh025
 66. Jomova K., Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011;283(2–3):65–87. DOI: 10.1016/j.tox.2011.03.001
 67. Pereira C., Grácio D., Teixeira J.P., Magro F. Oxidative stress and DNA damage: implications in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21(10):2403–17. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000506
 68. Gebicki J.M. Oxidative stress, free radicals and protein peroxides. *Arch Biochem Biophys* 2016;595:33–9. DOI: 10.1016/j.abb.2015.10.021
 69. Paulsen C.E., Carroll K.S. Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem Rev* 2013;113(7):4633–79. DOI: 10.1021/cr300163e
 70. Chen J.-W., Zhu Z.-Q., Hu T.-X., Zhu D.-Y. Structure-activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radical-scavenging effects. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23(7):667–72.
 71. Olszowy M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiol Biochem* 2019;144:135–43. DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.09.039
 72. Nakagawa T., Yokozawa T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem Toxicol* 2002;40(12):1745–50. DOI: 10.1016/S0278-6915(02)00169-2
 73. Shanmugam T., Selvaraj M., Poomalai S. Epigallocatechin gallate potentially abrogates fluoride induced lung oxidative stress, inflammation via Nrf2/Keap1 signaling pathway in rats: an *in-vivo* and *in-silico* study. *Int Immunopharmacol* 2016;39:128–39. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.07.022
 74. Giftson J.S., Jayanthi S., Nalini N. Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Invest New Drugs* 2010;28:251–259. DOI: 10.1007/s10637-009-9241-9
 75. Sharmila G., Athirai T., Kiruthiga B. et al. Chemopreventive effect of quercetin in MNU and testosterone induced prostate cancer of sprague-dawley rats. *Nutr Cancer* 2014;66:38–46. DOI: 10.1080/01635581.2014.847967
 76. Henning S.M., Niu Y., Lee N.H. et al. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *Am J Clin Nutr* 2004;80(6):1558–64. DOI: 10.1093/ajcn/80.6.1558
 77. Fallah A.A., Sarmast E., Jafari T. Effect of dietary anthocyanins on biomarkers of oxidative stress and antioxidative capacity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Funct Foods* 2020;68:103912. DOI: 10.1016/j.jff.2020.103912
 78. Mira L., Fernandez M.T., Santos M. et al. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* 2002;36:199–208. DOI: 10.1080/1071576021000016463
 79. Adjimani J.P., Asare P. Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicol Rep* 2015;2:721–8. DOI: 10.1016/j.toxrep.2015.04.005
 80. McCubrey J.A., Lertpiriyapong K., Steelman L.S. et al. Effects of resveratrol, curcumin, berberine and other nutraceuticals on aging, cancer development, cancer stem cells and microRNAs. *Aging* 2017;9(6):1477–536. DOI: 10.18632/aging.101250
 81. León-González A.J., Auger C., Schini-Kerth V.B. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem Pharmacol* 2015;98(3):371–80. DOI: 10.1016/j.bcp.2015.07.017
 82. Kim H.-S., Quon M.J., Kim J. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol* 2014;2:187–95. DOI: 10.1016/j.redox.2013.12.022
 83. He F., Antonucci L., Karin M. NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer. *Carcinogenesis* 2020;41(4):405–16. DOI: 10.1093/carcin/bgaa039
 84. Tanigawa S., Fujii M., Hou D. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radic Biol Med* 2007;42(11):1690–703. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.017
 85. Feng R.-B., Wang Y., He C. et al. Gallic acid, a natural polyphenol, protects against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity by activating ERK-Nrf2-Keap1-mediated antioxidative response. *Food Chem Toxicol* 2018;119:479–88. DOI: 10.1016/j.fct.2017.10.033
 86. Yang M., Jiang Z., Li C. et al. Apigenin prevents metabolic syndrome in high-fructose diet-fed mice by Keap1-Nrf2 pathway. *Biomed Pharmacother* 2018;105:1283–90. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.06.108
 87. Lin Y.-L., Tsai S.-H., Lin-Shiau S.-Y. et al. Theaflavin-3,3'-digallate from black tea blocks the nitric oxide synthase by down-regulating the activation of NF- κ B in macrophages. *Eur J Pharmacol* 1999;367(2–3):379–88. DOI: 10.1016/S0014-2999(98)00953-4
 88. Lin Y.-L., Lin J.-K. (–)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- κ B. *Mol Pharmacol* 1997;52(3):465–72. DOI: 10.1124/mol.52.3.465
 89. Ursini F., Maiorino M., Forman H.J. Redox homeostasis: the Golden Mean of healthy living. *Redox Biol* 2016;8:205–15. DOI: 10.1016/j.redox.2016.01.010
 90. Forman H.J., Davies K.J.A., Ursini F. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radic Biol Med* 2014;66:24–35. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.045
 91. Watson J. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biol* 2013;3(1):120144. DOI: 10.1098/rsob.120144
 92. Wang J., Yi J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther* 2008;7(12):1875–84. DOI: 10.4161/cbt.7.12.7067
 93. Trachootham D., Alexandre J., Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 2009;8(7):579–91. DOI: 10.1038/nrd2803
 94. Russo G.L., Tedesco I., Spagnuolo C., Russo M. Antioxidant polyphenols in cancer treatment: friend, foe or foil? *Semin Cancer Biol* 2017;46:1–13. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.05.005
 95. Mohos V., Fliszár-Nyúl E., Lemli B. et al. Testing the pharmacokinetic interactions of 24 colonic flavonoid metabolites with human serum albumin and cytochrome P450 enzymes. *Biomolecules* 2020;10(3):409. DOI: 10.3390/biom10030409
 96. Fatima A., Khan M.S., Ahmad Md.W. Therapeutic potential of equol: a comprehensive review. *Curr Pharm Des* 2020;26(45):5837–43. DOI: 10.2174/1381612826999201117122915
 97. Rogovskii V.S. The therapeutic potential of urolithin A for cancer treatment and prevention. *Curr Cancer Drug Targets* 2022;22(9):717–24. DOI: 10.2174/1568009622666220602125343
 98. Zhang J., Ren L., Yu M. et al. S-equol inhibits proliferation and promotes apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells via regulating miR-10a-5p and PI3K/AKT pathway. *Arch Biochem Biophys* 2019;672:108064. DOI: 10.1016/j.abb.2019.108064

99. Zou Y., Wang Y., Cai Y., Ma D. Effects of equol on proliferation of colorectal cancer HCT-15 cell. *Wei Sheng Yan Jiu* 2019;48(5):803–6. (In Chinese).
100. Brown N.M., Belles C.A., Lindley S.L. et al. The chemopreventive action of equol enantiomers in a chemically induced animal model of breast cancer. *Carcinogenesis* 2010;31(5):886–93. DOI: 10.1093/carcin/bgq025
101. Yu X., Zou Y.Q., Wang Y. et al. Equol and its enantiomers inhibited urethane-induced lung cancer in mice. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2022;54(2):244–8. (In Chinese).
102. Mohammed Saleem Y.I., Albassam H., Selim M. Urolithin A induces prostate cancer cell death in p53-dependent and in p53-independent manner. *Eur J Nutr* 2020;59(4):1607–18. DOI: 10.1007/s00394-019-02016-2
103. El-Wetidy M.S., Ahmad R., Rady I. et al. Urolithin A induces cell cycle arrest and apoptosis by inhibiting Bcl-2, increasing p53-p21 proteins and reactive oxygen species production in colorectal cancer cells. *Cell Stress Chaperones* 2021;26(3):473–93. DOI: 10.1007/s12192-020-01189-8
104. Liu C.-F., Li X.-L., Zhang Z.-L. et al. Antiaging effects of Urolithin A on replicative senescent human skin fibroblasts. *Rejuvenation Res* 2019;22(3):191–200. DOI: 10.1089/rej.2018.2066
105. Djedjibegovic J., Marjanovic A., Panieri E., Saso L. Ellagic acid-derived urolithins as modulators of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* 2020;2020:5194508. DOI: 10.1155/2020/5194508
106. Al-Harbi S.A., Abdulrahman A.O., Zamzami M.A., Khan M.I. Urolithins: the Gut based polyphenol metabolites of ellagitannins in cancer prevention, a review. *Front Nutr* 2021;8:647582. DOI: 10.3389/fnut.2021.647582
107. Dey P., Ray Chaudhuri S. Cancer-associated microbiota: from mechanisms of disease causation to microbiota-centric anti-cancer approaches. *Biology* 2022;11(5):757. DOI: 10.3390/biology11050757
108. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol* 2012;23(2):174–81. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.08.007
109. Bittencourt M.L.F., Rodrigues R.P., Kitagawa R.R., Gonçalves R.C.R. The gastroprotective potential of silibinin against *Helicobacter pylori* infection and gastric tumor cells. *Life Sci* 2020;256:117977. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117977
110. Chen M., Su C., Yang J. et al. Baicalin, baicalein, and *Lactobacillus rhamnosus* JB3 alleviated *Helicobacter pylori* infections *in vitro* and *in vivo*. *J Food Sci* 2020;83(12):3118–25. DOI: 10.1111/1750-3841.14372
111. Andrade F.O., Liu F., Zhang X. et al. Genistein reduces the risk of local mammary cancer recurrence and ameliorates alterations in the gut microbiota in the offspring of obese dams. *Nutrients* 2021;13(1):201. DOI: 10.3390/nu13010201
112. Di Lorenzo C., Colombo F., Biella S. et al. Polyphenols and human health: the role of bioavailability. *Nutrients* 2021;13(1):273. DOI: 10.3390/nu13010273
113. Yang B., Dong Y., Wang F., Zhang Y. Nanoformulations to enhance the bioavailability and physiological functions of polyphenols. *Molecules* 2020;25(20):4613. DOI: 10.3390/molecules25204613
114. Si W., Zhang Y., Li X. et al. Understanding the functional activity of polyphenols using omics-based approaches. *Nutrients* 2021;13(11):3953. DOI: 10.3390/nu13113953

Вклад авторов

А.В. Любительев: анализ литературы по теме статьи, написание текста статьи;
 А.Л. Сивкина: анализ литературы по теме статьи;
 О.А. Власова, Г.А. Белицкий: написание текста статьи;
 В.М. Студитский: определение структуры обзора и обобщение данных.

Authors' contribution

A.V. Lyubitelev: analysis of the literature on the topic of the article, article writing;
 A.L. Sivkina: analysis of the literature on the topic of the article;
 O.A. Vlasova, G.A. Belitsky: article writing;
 V.M. Studitsky: definition of the structure of the review and generalization of data.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.В. Любительев / A.V. Lyubitelev: <https://orcid.org/0000-0003-0768-9309>
 А.Л. Сивкина / A.L. Sivkina: <https://orcid.org/0000-0002-4681-0178>
 О.А. Власова / O.A. Vlasova: <https://orcid.org/0000-0002-1498-849X>
 Г.А. Белицкий / G.A. Belitsky: <https://orcid.org/0000-0002-3167-7204>
 В.М. Студитский / V.M. Studitsky: <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>

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 № 21-74-20018).
Funding. The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (Grant No. 21-74-20018).

Статья поступила: 23.11.2022. **Принята к публикации:** 18.05.2023.
Article submitted: 23.11.2022. **Accepted for publication:** 18.05.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-42-57



Молекулярно-генетические аспекты аденокортикального рака

Д.П. Яшина^{1,2}, З.А. Афанасьева^{1,2}

¹Кафедра онкологии, радиологии и паллиативной медицины Казанской государственной медицинской академии — филиала ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, Республика Татарстан, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 36;

²ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Республики Татарстан; Россия, Республика Татарстан, 420029 Казань, ул. Сибирский тракт, 29

Контакты: Дарья Петровна Яшина darya.nikulina.94@list.ru

Аденокортикальный рак – редко встречаемая опухоль, происходящая из кортикальных клеток надпочечников, характеризующаяся агрессивным потенциалом, быстро прогрессирующим течением и неблагоприятным прогнозом. Сложность ранней диагностики заболевания обусловлена несколькими факторами: вариабельностью клинических проявлений, связанной с изначальным мультирегуляторным влиянием стероидных гормонов на гомеостаз организма, а также редкостью опухоли и, как следствие, малоизученностью молекулярных механизмов ее канцерогенеза. Возросший за последние годы интерес онкологов и эндокринологов к пониманию фундаментальных и клинических аспектов аденокортикального рака и поиск потенциальных мишеней для новых лекарственных препаратов привели к детальному изучению клеточных и молекулярно-генетических механизмов, участвующих в нормальном онтогенезе надпочечников, и их роли в опухолевой трансформации. В данном обзоре представлены известные на настоящий момент молекулярно-генетические процессы и опосредующие их ауто-, пара- и эндокринные факторы, задействованные в нормальном надпочечниковом онтогенезе и канцерогенезе. В работе проанализированы результаты исследований, опубликованных в зарубежных и отечественных журналах по молекулярной онкологии и эндокринологии, представленных в базах данных PubMed, CyberLeninka, Web of Science, Science Direct и eLIBRARY.

Ключевые слова: аденокортикальный рак, онтогенез надпочечников, опухолевая трансформация, сигнальные пути, стероидный фактор 1, Sonic Hedgehog, сигнальный путь Wnt/ β -катенин, сигнальный путь SMAD, факторы роста, инсулиноподобный фактор роста 2, трансформирующий фактор роста β , miRNA

Для цитирования: Яшина Д.П., Афанасьева З.А. Молекулярно-генетические аспекты аденокортикального рака. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):42–57. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-42-57

Molecular genetic aspects of adrenocortical cancer

D.P. Yashina^{1,2}, Z.A. Afanasyeva^{1,2}

¹Department of Oncology, Radiology and Palliative Medicine, Kazan State Medical Academy — branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; 36 Butlerova St., Kazan 420012, Republic of Tatarstan, Russia;

²Republican Clinical Oncological Dispansary, Ministry of Health of Republic of Tatarstan; 29 Sibirskii Tract, Kazan 420029, Republic of Tatarstan, Russia

Contacts: Darya Petrovna Yashina darya.nikulina.94@list.ru

Adrenocortical cancer is a rare tumor originating from cortical adrenal cells, endowed with aggressive potential, a rapidly progressing course and an unfavorable prognosis. The complexity of early diagnosis of the disease is due to several factors: the variability of clinical manifestations associated with the initial multiregulatory influence of steroid hormones on the body's homeostasis, the rare occurrence of the tumor and, as a result, the lack of understanding of the molecular mechanisms of its carcinogenesis.

The increased interest in recent years among oncologists and endocrinologists in understanding the fundamental and clinical aspects of adrenocortical cancer and the search for potential targets for new drugs has led to a detailed study of the cellular and molecular genetic mechanisms involved in normal adrenal ontogenesis and their role in tumor transformation. This review presents the currently known molecular genetic processes and their mediating auto-, para-, endocrine factors involved in normal adrenal ontogenesis and carcinogenesis. The paper analyzes results of trials published in international and Russian journals on molecular oncology and endocrinology indexed in the PubMed, CyberLeninka, Web of Science, Science Direct and eLIBRARY databases.

Keywords: adrenocortical cancer, adrenal ontogenesis, tumor transformation, signaling pathways, steroidogenic factor 1, Sonic Hedgehog, signaling pathways Wnt/ β -catenin, signaling pathway SMAD, growth factors, insulin-like growth factor 2, transforming growth factor β , miRNA

For citation: Yashina D.P., Afanasyeva Z.A. Molecular genetic aspects of adrenocortical cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(2):42–57. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-42-57

ВВЕДЕНИЕ

Адренокортикальный рак (АКР) — редкая опухоль (0,5–2 случая на 1 млн населения в год), происходящая из клеток коркового слоя надпочечников и характеризующаяся агрессивным и быстро прогрессирующим течением и неблагоприятным прогнозом [1, 2]. Заболевание встречается в 2 вариантах: АКР, ассоциированный с опухолями других локализаций, с формированием наследственных синдромов (превалирует в педиатрической практике), спорадический случай, наиболее распространенный среди взрослых. Это, по-видимому, объясняет бимодальный характер возрастного распределения заболевания, первый пик которого наблюдается в детской популяции в возрасте от 3 до 5 лет, а второй приходится на 4–5-е десятилетия жизни [2, 3].

В стратегии лечения пациентов с АКР, включающей хирургический и химиотерапевтический методы, наибольшее значение имеет хирургическое удаление опухоли [1, 4, 5]. Однако из-за трудностей ранней диагностики, связанных с вариабельностью клинических проявлений, мультирегуляторным влиянием стероидных гормонов на гомеостаз организма, редкой встречаемостью опухоли заболевание обнаруживается на поздних стадиях [5, 6]. В связи с этим АКР зачастую нерезектабелен, пациенты неоперабельны. Вышесказанное обуславливает актуальность поиска биомаркеров ранней диагностики и прогноза, а также молекулярных мишеней для эффективных лекарственных препаратов, для чего необходимо детальное изучение молекулярно-генетических процессов, опосредующих нормальное развитие коры надпочечника и ее опухолевую трансформацию.

НОРМАЛЬНЫЙ ОНТОГЕНЕЗ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Надпочечники — это парная эндокринная железа, представленная 2 разными гистогенетическими и функциональными слоями [5–7]. Их развитие опосредовано последовательными процессами пролиферации, морфофункциональной дифференцировки и миграции клеток, направление которых модулируется как локально экспрессируемыми сигнальными молекулами, так и эндокринными факторами. Физиологический и биологический смысл данных процессов изменяется в зависимости от периода онтогенеза. Так, в эмбриональном периоде итогом последовательной перестройки стволовых клеток становятся образование эмбрионального надпочечника и последующее его развитие с формированием тканевого субстрата для бу-

дущего «взрослого надпочечника». После рождения за счет аналогичных процессов происходит только обновление клеточной популяции, лежащей в основе поддержания тканевого надпочечникового гомеостаза [8–10].

В эмбриональном периоде образование надпочечника имеет 2 критических порога, определяющих судьбу клеток адренокортикальной линии. Формирование надпочечника начинается с образования адреногенитального зачатка (AGP) к 3–4-й неделям гестации. Он представлен смешанной популяцией клеток-предшественников адренокортикальной ткани и гонад, происходящей из целомического эпителия уrogenитального тракта промежуточной мезодермы. Последующее «расслаивание» AGP с образованием 2 самостоятельных зачатков (адренокортикального и гонадного) зависит от экспрессии клетками стероидного фактора 1 (SF-1) [7, 8–10]. И это становится первым критическим моментом адренокортикальной судьбы. Стероидный фактор 1 представляет собой транскрипционный фактор ядерного рецептора (ген *NR5A1*) с мультинаправленной регуляторной способностью в отношении транскрипции генов, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза стероидных гормонов, а также клеточный цикл, апоптоз и адгезию клеток к внеклеточному матриксу, т. е. опосредует пролиферацию, морфофункциональную дифференцировку и выживаемость стероидогенных клеток. Пролиферация пула клеток адренокортикального зачатка, положительно зависящая от SF-1, приводит к образованию зоны плода (FZ) [8–13]. Свой стероидогенный потенциал клетки FZ реализуют посредством экспрессии фермента цитохрома P450 *CYP17 α* , совмещающего в себе активность *CYP11A* (20,22-десмолаза) и *CYP17* (17 α -гидроксилаза) и способствующего превращению холестерина в дегидроэпиандростерон (DHEA) и дегидроэпиандростерон-сульфат (DHEA-S), метаболизируемые плацентой в эстрогены, которые поддерживают гестацию [9, 10].

Одновременно с формированием FZ происходят 2 значимых процесса: миграция в центр FZ клеток-предшественников хромоаффинной ткани (мозговое вещество), происходящих из нервного гребня, и появление дефинитивной зоны (DZ), представленной активно пролиферирующими, положительными в отношении экспрессии SF-1 клетками [11–13].

В итоге такой последовательной перестройки и миграции клеток промежуточной мезодермы (корковое вещество) и нервного гребня (мозговое вещество) к 8-й неделе гестации образуется инкапсулированный (эмбриональный) надпочечник [8, 9].

Еще одной сигнальной молекулой, важной для развития аденокортикальной ткани и секретируемой в раннем эмбриогенезе, является Wnt. Лиганд Wnt, используя в качестве трансдукции канонический сигнальный путь Wnt/ β -catenin, активирует пролиферацию недифференцированных/стволовых клеток эмбрионального надпочечника, т. е. поддерживает выживаемость эмбриональных клеток [8, 9, 14, 15].

По мере увеличения срока гестации наблюдается рост эмбрионального надпочечника, преимущественно за счет расширения DZ. Клетки DZ активно пролиферируют и приобретают стероидогенный потенциал, реализуемый возможностью синтезировать и секретировать кортизол. Индуцируют рост DZ факторы роста – инсулиноподобный фактор роста 2 (insulin-like growth factor 2, IGF-2), трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor β , TGF- β) – и аденокортикотропный гормон гипофиза (АКТГ).

Клеточный ответ на действие АКТГ реализуется после его связывания с трансмембранным специфическим рецептором меланокортина 2 (MC2R) на клетках DZ с последующей активацией цАМФ-зависимой (цАМФ – циклический аденозинмонофосфат) протеинкиназы А (сАМФ/РКА). Результатом передачи сигнала становится активация генов, кодирующих ключевые ферменты синтеза кортизола, и коэкспрессия SF-1. Еще один путь АКТГ-индуцированного роста DZ опосредован его костимулирующим влиянием на экспрессию IGF-2 [8–17]. Схема пренатального аденокортикального онтогенеза представлена на рис. 1.

После рождения эмбриональный надпочечник подвергается значительному ремоделированию, включающему регрессию FZ (апоптоз клеток) и трехуровневое зональное «расслаивание» DZ в зависимости от морфологической и функциональной принадлежности клеток на корковую/гломерулозную (ZG), пучковую/фасцикулярную (ZF), сетчатую/ретикулярную (ZR) зоны, окончательно формирующиеся в пубертатном периоде. Далее, на протяжении всей жизни, зональное распределение поддерживается за счет непрерывного обновления аденокортикальной клеточной популяции в зависимости от физиологической потребности организма в стероидных гормонах. Такой принцип лежит в основе тканевого кортикального гомеостаза [8–10, 16, 18].

Обновление аденокортикальных клеток и их зонирование подчиняются центростремительной модели развития, предполагающей перемещение от капсулы (через все слои коры) до кортико-медуллярной границы с последующим апоптозом старых клеток. Точкой приложения для модулированного сигнальными молекулами запуска самообновления служит ниша стволовых/прогениторных клеток, образованных субпопуляциями капсульных и субкапсульных клеток. Они представлены недифференцированными клетками, наделенными свойством мультипотентности и пролиферативным потенциалом, но ограничены в биосинтезе стероидов [16, 18]. Между субпопуляциями стволовых клеток имеются сложные взаиморегуляторные отношения. Так, клетки субкапсулы экспрессируют

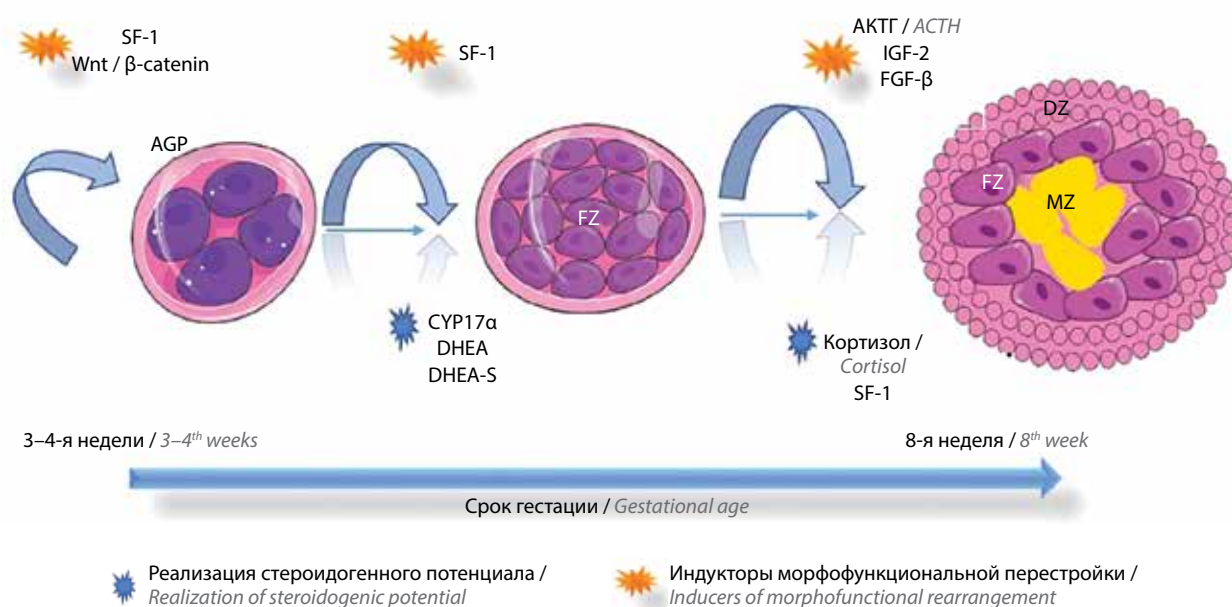


Рис. 1. Схема пренатального аденокортикального онтогенеза. SF-1 – стероидный фактор; АКТГ – аденокортикотропный гормон; IGF-2 – инсулиноподобный фактор роста 2; TGF- β – трансформирующий фактор роста β ; AGP – аденогенитальный зачаток; FZ – зона плода; MZ – зона хромаффинных клеток; CYP17 α – фермент цитохрома P450; DHEA – дегидроэпиандростерон; DHEA-S – дегидроэпиандростерон-сульфат
 Fig. 1. Scheme of prenatal adrenocortical ontogenesis. SF-1 – steroid factor; ATHC – adrenocorticotrophic hormone; IGF-2 – insulin-like growth factor 2; FGF- β – transforming growth factor β ; AGP – adrenogonadal primordium; FZ – fetal zone; MZ – zone of chromaffin cells; CYP17 α – cytochrome P450 enzyme; DHEA – dehydroepiandrosterone; DHEA-S – dehydroepiandrosterone sulfate

гликопротеин Sonic Hedgehog (SHH), паракринно стимулирующий пролиферацию капсульных стволовых клеток. В некоторых источниках описывается также коэкспрессирующее влияние сигнального лиганда на экспрессию SF-1. Важно отметить, что пролиферирующие клетки теряют чувствительность к действию SHH, а его экспрессия строго ограничена субкапсулой. Последующее «расслаивание» морфологически зрелых, но лишенных стероидогенной функции клеток модулируется АКТГ и ангиотензином II. Функциональная принадлежность клеток каждой зоны определяется наличием специфичных внутриклеточных ферментов биосинтеза соответствующих стероидов. Так, например, фермент конечного этапа синтеза альдостерона, альдостеронсинтаза, экспрессируется строго в клубочковой зоне. Принцип центростремительной модели клеточного обновления соблюдается за счет конверсии клеток ZG в клетки ZF. Это возможно за счет антагонистичности в отношении друг друга сигнальных путей эндокринных факторов, поддерживающих функциональную дифференцировку [8, 9, 19, 20]. «Взрослый» надпочечник представлен на рис. 2. Действие паракринных и эндокринных факторов на адренокортикальные клетки детально описано в тексте, а также представлено на рис. 3.

Гормон ангиотензин II посредством сигнальной молекулы Wnt и ее канонического сигнального Wnt/ β -catenin запускает транскрипцию гена, кодирующего фермент альдостеронсинтазу. Формирование пучковой зоны регулируется АКТГ-сигналингом, который реализуется тем же путем, что и в эмбриональном надпочечнике. Время действия гормона ограничено петлей обратной связи, подчиняющейся канонической схеме

гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. Интересно, что «молекулярная связка» Wnt/ β -catenin поддерживает выживаемость гломерулярных клеток, при этом ингибируя передачу сигнала пути cAMP/PKA, используемого АКТГ. Аналогичным путем ингибируется путь Wnt/ β -catenin при активировании сигнального каскада cAMP/PKA [8, 9, 17, 20]. В физиологическом смысле такой принцип необходим для обеспечения равномерной зональной дифференцировки и адренокортикальной архитектоники (см. рис. 3).

Таким образом, онтогенез надпочечников складывается из эмбрионального органогенеза и постнатального гомеостаза.

АДРЕНОКОРТИКАЛЬНЫЙ КАНЦЕРОГЕНЕЗ

Понимание молекулярно-генетических механизмов, поддерживающих нормальное адренокортикальное развитие и тканевой гомеостаз на протяжении жизни, позволяет предположить пути опухолевой трансформации адренокортикальных клеток, механизмы их выживания, инвазии и метастазирования, выявить биомаркеры ранней диагностики и рецидива, определить потенциальные терапевтические мишени, а также прогностическую ценность. Наиболее значимые в адренокортикальной судьбе сигнальные молекулы и ростовые факторы детально описаны ниже. На рис. 4 наглядно представлены сигнальные пути передачи регуляторных молекул и факторов.

СТЕРОИДНЫЙ ФАКТОР 1

В АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Стероидный фактор 1 представляет собой критически важный фактор, регулирующий развитие

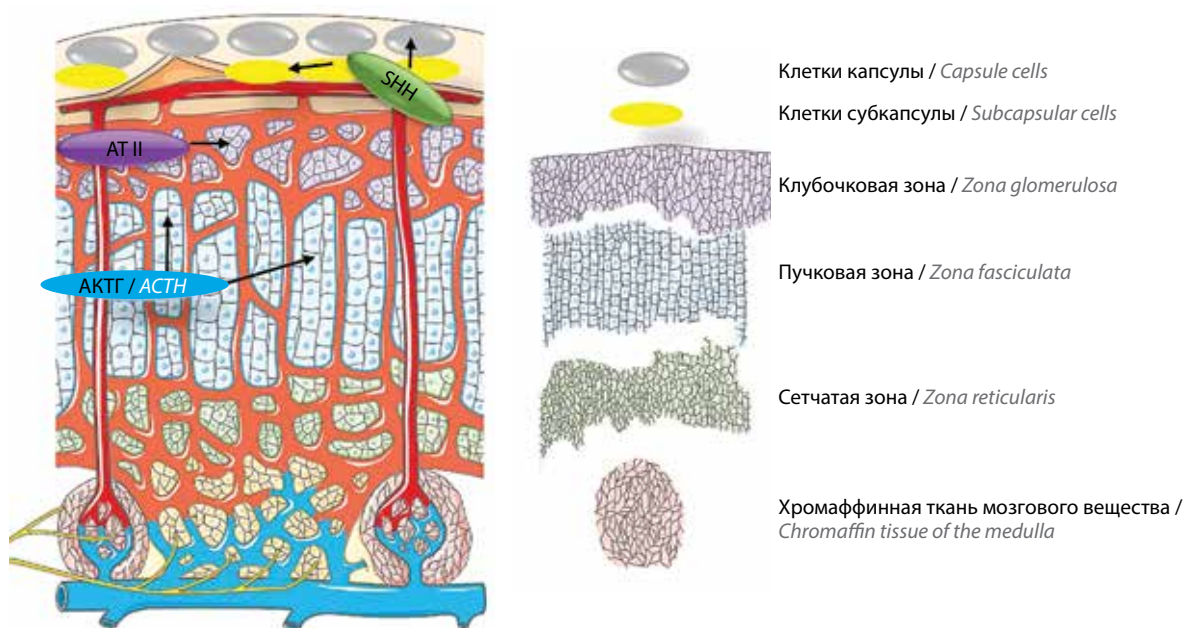


Рис. 2. Строение «взрослого» надпочечника. SHH – Sonic Hedgehog; АКТГ – адренокортикотропный гормон; АТ II – ангиотензин II
Fig. 2. The structure of the «adult» adrenal gland. SHH – Sonic Hedgehog; ACTH – adrenocorticotrophic hormone; AT II – angiotensin II

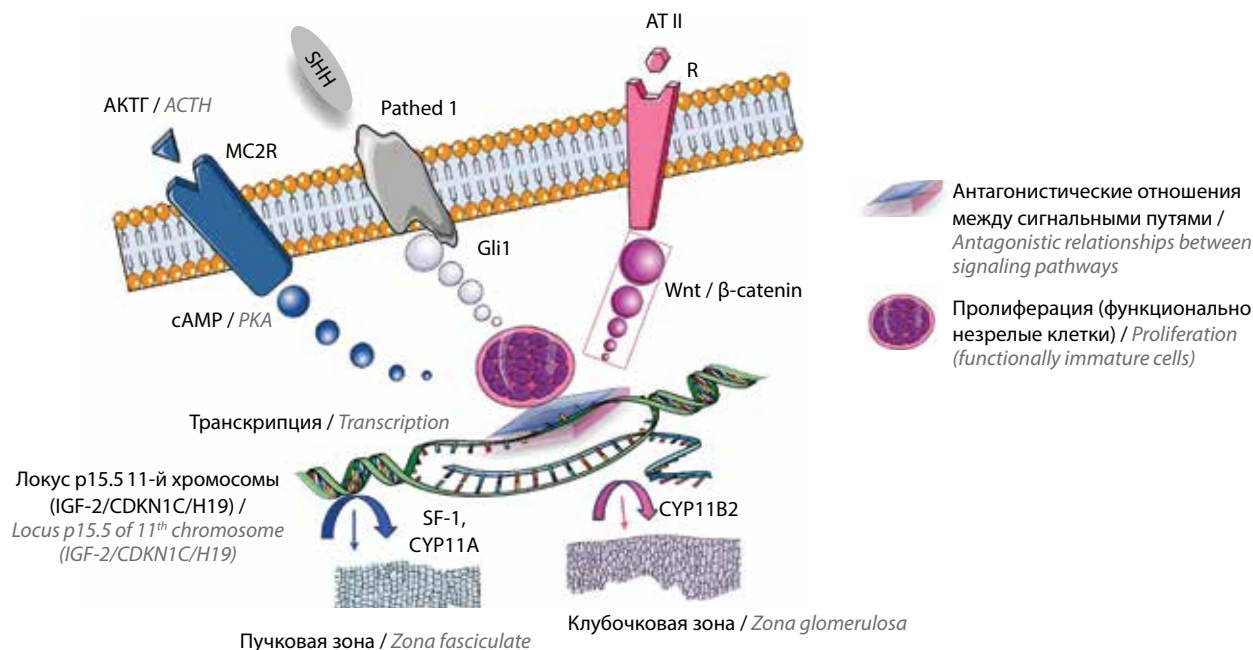


Рис. 3. Сигнальные пути эндокринных факторов. Конверсия клеток. АКТГ — аденокортикотропный гормон; MC2R — рецептор меланокортина 2; cAMP/PKA — цАМФ-зависимая протеинкиназа A; SHH — Sonic Hedgehog; Pathed 1 — рецептор SHH; Gli1 — транскрипционный фактор сигнального пути SHH; AT II — ангиотензин II; R — рецептор ангиотензина II; SF-1 — стероидный фактор 1; CYP11A — фермент биосинтеза стероидов; CYP11B2 — альдостеронсинтаза; IGF-2 — инсулиноподобный фактор роста 2; CDKN1C — циклинзависимый ингибитор киназы IC
Fig. 3. Signaling pathways of endocrine factors. Cell conversion. ACTH — adrenocorticotrophic hormone; MC2R — melanocortin receptor 2; cAMP/PKA — cAMP-dependent protein kinase A; SHH — Sonic Hedgehog; Pathed 1 — receptor of SHH; Gli1 — SHH signaling pathway transcription factor; AT II — angiotensin II; R — angiotensin II receptor; SF-1 — steroid factor 1; CYP11A — enzyme of steroid biosynthesis; CYP11B2 — aldosterone synthase; IGF-2 — insulin-like growth factor 2; CDKN1C — cyclin-dependent kinase 1C inhibitor

аденокортикальной ткани на всех этапах ее онтогенеза. В раннем эмбриогенезе «расслаивание» клеток аденогонадного зачатка строго ограничено экспрессией SF-1 и становится критическим моментом, определяющим возможность дальнейшего аденокортикального онтогенеза. В ряде экспериментов было показано, что в случае потери SF-1 в эмбриональном периоде наблюдается агенезия коры надпочечников и половых желез, а при повышенной экспрессии SF-1 — избыточная пролиферация и, как результат, увеличение аденокортекса за счет пучковой зоны [8, 9, 20, 21].

Регуляция экспрессии SF-1 имеет сложный, многоэлементный механизм и включает энхансер плода FAdE, белки транскрипционного комплекса, состоящего из гомеобоксного белка PKNOX1 (Prep1), гомеобоксного гена 9b (*Hox9b*) и фактора транскрипции пре-В-клеточной лейкемии 1 (PBX1). Однако стоит отметить, что активаторы транскрипции SF-1 имеют строго зонозависимую ограниченность. Так, энхансер FAdE-опосредованная экспрессия SF-1 локализована в FZ и имеет ауторегуляторный активирующий механизм. В клетках DZ, по-видимому, присутствует иной механизм экспрессии фактора, остающийся на данный момент неизвестным. Кроме того, в ряде экспериментов была подтверждена связь между SF-1-положительными эмбриональными клетками DZ и капсульными стволовыми клетками, которые, вероятно, являются их потомками [20, 21].

Естественным ингибитором транскрипционных последствий SF-1 является бесхозный ядерный рецептор DAX-1. Механизм его репрессорного действия связан с блокированием SF-1-опосредованной транскрипции генов. Экспрессия DAX-1 находится под контролем самого SF-1, что формирует обратный регуляторный контур Wnt/β-catenin-сигналинга и ингибина [11, 21].

Среди нарушений, вызывающих повышенную экспрессию SF-1, наблюдаются амплификация и мутация кодирующего гена, а также нарушение регуляторных взаимоотношений между SF-1 и DAX-1. Итогом такой сверхэкспрессии становятся усиленная пролиферация и функциональная дифференцировка аденокортикальных клеток, а также угнетение апоптоза. Наиболее часто данный механизм кортикальной неоплазии с развитием аденом и карцином надпочечника наблюдается в педиатрической практике и коррелирует с плохим прогнозом [21–24].

Также предполагается роль SF-1 как предиктора ответа на системную терапию аденолитиком митотаном; определение его экспрессии в опухолевых клетках может прогнозировать ответ на терапию при метастатическом варианте АКР [25].

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ АДЕНОКОРТИКАЛЬНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Sonic Hedgehog. Sonic Hedgehog представляет собой гликопротеин из семейства Hedgehog, представители

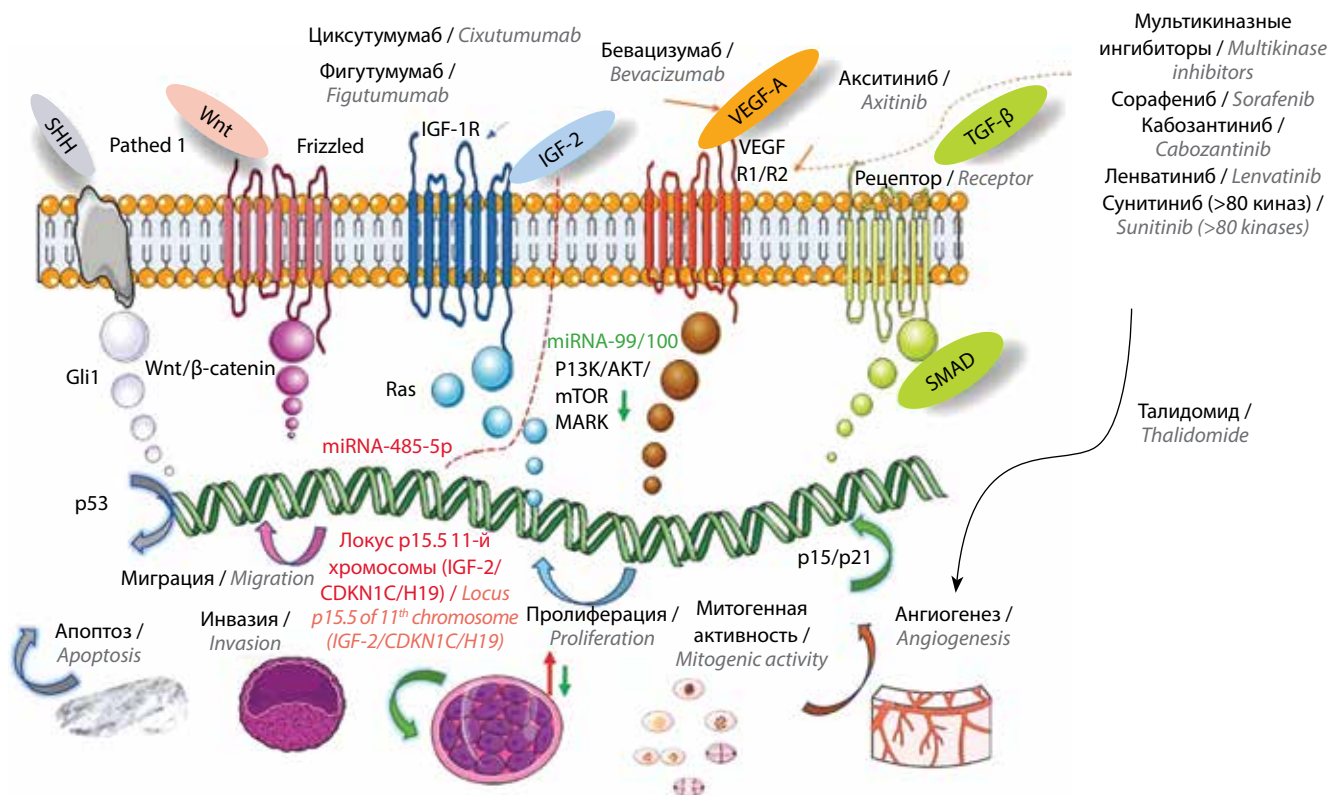


Рис. 4. Сигнальные пути в клетках аденокортикальной карциномы. Дисфункциональные молекулярные пути при аденокортикальном канцерогенезе описаны в тексте. Цветом обозначены передача сигнала от регуляторного фактора до его ядерной реализации и клеточный ответ. Стрелки указывают на соответствующие изменения эффектов в зависимости от сверхэкспрессии каждого фактора. Эпигенетическая регуляция представлена miRNA-485-5p (онкогенный эффект) и miRNA-99/100 (онкосупрессивный эффект). P13K/AKT/mTOR – фосфоинозитид-3-киназа/протеинкиназа В/мишень рапамицина млекопитающих; MARK – митоген-активируемая протеинкиназа; SHH – Sonic Hedgehog; IGF-1R – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1; IGF-2 – инсулиноподобный фактор роста 2; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; VEGF-A – фактор роста эндотелия сосудов А; R1/R2 – рецепторы фактора роста эндотелия сосудов; TGF-β – трансформирующий фактор роста β; Pathed 1 – рецептор SHH; Gli1 – транскрипционный фактор сигнального пути SHH

Fig. 4. Signaling pathways in adrenocortical carcinoma cells. Dysfunctional molecular pathways in adrenocortical carcinogenesis are described in the text. The color scheme depicts signal transduction from the regulatory factor to its nuclear implementation and cellular response. The direction of the arrows indicates the corresponding changes in effects depending on the overexpression of each factor. Epigenetic regulation is represented by miRNA-485-5p (oncogenic effect) and miRNA-99/100 (oncosuppressive effect). P13K/AKT/mTOR – phosphoinositide 3-kinases/protein kinase B/mammalian target of rapamycin; MARK – mitogen-activated protein kinase; SHH – Sonic Hedgehog; IGF-1R – insulin-like growth factor 1 receptor; IGF-2 – insulin-like growth factor 2; VEGF – vascular endothelial growth factor; VEGF-A – vascular endothelial growth factor A; R1/R2 – vascular endothelial growth factor receptors; TGF-β – transforming growth factor β; Pathed 1 – receptor of SHH; Gli1 – SHH signaling pathway transcription factor

которого вовлечены в развитие и поддержание клеточных популяций многих тканей организма, в том числе аденокортикальной. Он экспрессируется субкапсульными стволовыми клетками и паракринным путем активирует пролиферацию капсульных клеток. Для своей трансдукции данный гликопротеин использует одноименный сигнальный путь. Полипептидная молекула SHH связывается с трансмембранным рецептором Pathed 1 (PTCH) с образованием лиганд-рецепторного комплекса, снимая «блок» с цитоплазматического транскрипционного фактора Gli1. Разблокированный транскрипционный фактор транслируется в ядро клетки, где активирует экспрессию многих генов, в том числе ответственных за пролиферацию недифференцированных стволовых клеток капсулы, и угнетает транскрипцию гена *p53*, ответственного за апоптоз. Проллиферирующие клетки выступают морфологическим субстратом для последующей конверсии в клетки ZG. Это

и составляет основу анатомической и функциональной регенерации коркового вещества [8–10, 26].

Изменение активирующего влияния SHH на стволовые клетки с образованием клеток ZG может наблюдаться в 2 случаях: при блокировании основного транскрипционного фактора, транслокации Gli1 или изменении экспрессии самого гликопротеина. Увеличение экспрессии SHH субкапсульными клетками может наблюдаться при органическом повреждении надпочечника или его функциональном истощении. Например, матриксные металлопротеазы 2,9, продуцируемые клетками в очаге воспаления, могут послужить стимулом для активации синтеза этого гликопротеина [26].

На способность транслокации транскрипционного фактора Gli1 влияет ряд других сигнальных путей. Положительное влияние оказывают белок Ras, сигнальные пути SMAD, PI3K (фосфоинозитид-3-киназа)/

АКТ (протеинкиназа В, протеинкиназа С α), а негативное — белок р53, продукт одноименного гена, и протеинкиназа А. Отметим, что данные молекулярные посредники являются сигнальными путями IGF-2, TGF- β 2, и других факторов роста, а также гормона АКТГ [8–10, 19, 27].

В ряде экспериментов при потере SHH наблюдались полная аплазия коры надпочечников плода и атрофия клубочковой зоны «взрослого» надпочечника вследствие снижения репаративной способности клеток при повреждении или хроническом воспалении в ткани [26].

Повышенная экспрессия SHH наблюдается при АКР у взрослых, в то время как в педиатрической практике, наоборот, встречается снижение экспрессии этого гликопротеина [8–10].

Сигнальный путь Wnt. Роль лиганда Wnt и его канонического сигнального пути Wnt/ β -catenin в развитии и поддержании аденокортикальных клеток варьирует в зависимости от периода онтогенеза. В раннем эмбриогенезе секретируемый субкапсульными клетками надпочечника плода Wnt паракринным путем стимулирует пролиферацию недифференцированных клеток и тем самым поддерживает выживаемость пула стволовых клеток. В постнатальном периоде Wnt принимает участие в поддержании выживаемости клеток ZG и стероидогенезе путем регуляции экспрессии гена, кодирующего фермент синтеза альдостерона, а также посредством инактивации конверсии клеток в клетки пучковой зоны [8–10, 13–15].

Секретируемые молекулы Wnt связываются с рецепторами Frizzled на поверхности морфологически зрелых клеток с образованием лиганд-рецепторного комплекса. Этот комплекс способен инактивировать «блокирующий комплекс» цитоплазматического белка β -catenin. «Молекулярная связка» Wnt/ β -catenin — это канонический путь трансдукции сигнала лиганда Wnt. Разблокированный β -catenin связывается с ядерным рецептором TCF/LEF, активируя транскрипцию генов, ответственных за ангиогенез, клеточный цикл, адгезию клеток к внеклеточному матриксу, апоптоз [14].

В комплекс «блокирующих белков» β -catenin входит продукт гена-онкосупрессора APC (adenomatosis polyposis coli). Интересно, что в случае мутации этого гена наблюдается инактивация блокирующего комплекса. Это приводит к избыточной активации β -catenin, итогом чего становится повышенная пролиферация клеток. Такой механизм онкогенеза лежит в основе синдрома Гарднера, характеризующегося многочисленными колоректальными полипами и карциномами в сочетании с АКР в некоторых случаях. Также избыточная активность β -catenin наблюдалась в случае мутации кодирующего его гена, что, по некоторым данным, составляет около 16 % случаев АКР [14].

В экспериментах на мышах показано, что нарушение канонической передачи сигнала приводит к развитию аплазии надпочечника плода и атрофии «взрослого»

надпочечника, которая гистологически характеризуется надпочечниковой недостаточностью [8–10].

Подобные мутации, влияющие на активность Wnt/ β -catenin, часто встречаются в аденокортикальных карциномах и коррелируют с неблагоприятным прогнозом.

РОЛЬ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ В АДЕНОКОРТИКАЛЬНОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Инсулиноподобный фактор роста 2. Это полипептид, представитель семейства инсулиноподобных факторов роста. Свое название IGF-2 получил из-за структурного и функционального сходства с молекулой инсулина. Этот фактор играет решающую роль в регуляции роста, миграции и выживания эмбриональных клеток, выступая в качестве сильного митогенного стимула. В норме его наибольшая концентрация наблюдается именно в эмбриональном периоде, а после рождения значительно снижается. Свои эффекты на клетку IGF-2 реализует после связывания с несколькими рецепторами — рецепторами инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R) и 2 (IGF-2R), к которым он имеет разную аффинность, и активирует 2 сигнальных пути: PI3K/АКТ и MAPK (mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа). Рецепторы IGF экспрессируются во всех зонах надпочечников, однако наиболее обогащенной IGF-1R областью является субкапсула. Сигнальный путь PI3K/АКТ транскрибирует целевые гены, продукты которых способствуют усиленному поглощению глюкозы клетками. Другому сигнальному пути — MAPK — отводится роль активации транскрипции генов, участвующих в митозе [5, 8–10, 27–29].

Ген, кодирующий IGF-2, находится в локусе p15.5 11-й хромосомы и включает в себя также CDKN1C, который кодирует циклинзависимый ингибитор киназы 1C (также известный как p57Kip2) и H19, который транскрибируется в нетранслируемую РНК [6–10]. Мутации в данном гене сопряжены с развитием синдрома Беквита—Видемана, включающего АКР, а также макроклоссию, гемигипертрофию и эмбриональные опухоли (нефро- и гепатобластому) [1, 5, 6, 8–10].

В случае спорадического АКР гиперэкспрессия IGF-2 может быть связана с увеличением его синтеза гепатоцитами, эпителиальными клетками мозговых оболочек и церебральным сосудистым сплетением. Усиливают синтез ростового фактора половые гормоны (эстрогены и андрогены), инсулин, тиреоидные гормоны, а угнетают — глюкокортикостероиды. По-видимому, некоторые препараты, влияющие на синтетическую функцию печени, косвенно могут стать причиной опухолей надпочечников.

Значимость определения IGF-2 в настоящий момент сводится к прогностической ценности и ранней выявляемости АКР [1, 5].

Трансформирующий фактор роста β . Это цитокин, представитель суперсемейства трансформирующих

факторов роста, в число которых входят 3 изоформы TGF- β , ингибины, активины, костный морфогенетический белок (BMP), глиальный нейротрофический фактор и т.д. [30, 31]. Данный фактор роста обладает мультинаправленностью в отношении контроля клеточных функций. Клеточный ответ на воздействие TGF- β зависит от типа клеток и цикла их развития. Так, например, в мезенхимальных клетках он выступает стимулятором клеточного деления, активируя пролиферацию фибробластов, а в отношении эпителиальных, гемопоэтических, нервных и иммунных клеток — мощным ингибитором.

Синтез белков подсемейства TGF- β начинается с образования в разных типах клеток его неактивного предшественника, затем путем протеолитического действия ферментов образуется активный ростовой фактор. Однако во внеклеточном матриксе этот фактор роста находится в ассоциированном состоянии со связывающим белком, образуя таким образом латентную форму. Реализовывать свои эффекты в клетках TGF- β может после образования своей активной формы — комплекса лиганд — рецептор. Диссоциацию латентного TGF- β способны вызвать некоторые протеазы, такие как плазмин, матриксные металлопротеазы 2 и 9, тромбоспондин 1, активные формы кислоты, кислая среда (pH <6,0) [31, 32].

Свои эффекты на клетку TGF- β реализует путем активации белков SMAD. Белки этой системы по своей функциональной принадлежности подразделяются на 3 группы: регулируемые рецептором (R-SMAD), которые включает в себя SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD8; общие SMAD (Co-SMAD), представленные SMAD4; ингибирующие SMAD (I-SMAD), включающие SMAD6 и SMAD7. Выбор направления активации пути зависит от типа рецептора, с которым связывается лиганд [5, 7].

Активация сигнального пути SMAD начинается с фосфорилирования SMAD2 и/или SMAD3 рецепторной киназой, в конце образуется комплекс с SMAD4, который впоследствии транспортируется в ядро, где он связывается со специфическими факторами транскрипции и индуцирует транскрипцию TGF- β -зависимых генов. Транскрипция генов-мишеней, таких как p15 и p21, продуктом которых являются одноименные белки, приводит к остановке клеточного цикла в фазе G1 за счет подавления CDK (cyclin-dependent kinase, циклинзависимые киназы) и ингибирования экспрессии с-Мус [30, 31]. Таким образом опосредуются противоопухолевый и антипролиферативный эффекты TGF- β .

Важно отметить, что в механизме опухолевой трансформации, приводящей к развитию АКР, имеется определенная взаимосвязь IGF-2 и TGF- β . Поскольку данные факторы роста оказывают антагонистическое действие на аденокортикальные клетки, логично, что их сигнальные пути могут взаимно ингибировать друг друга. Ингибирующее влияние реализу-

ется на посттранскрипционном уровне при участии микроРНК (miRNA). Они представляют собой короткие некодирующие участки РНК, способные изменять экспрессию белков на посттранскрипционном уровне. МикроРНК — уникальные кандидаты для таргетной терапии, так как обладают возможностью воздействовать на многие молекулы одного сигнального пути.

Ген *IGF-2*, расположенный в локусе p15.5 11-й хромосомы, содержит интроны с информацией о miRNA-485p. Данная miRNA способна угнетать трансляцию матричной РНК (мРНК), несущую в себе закодированную последовательность о SMAD4. Как следствие, при снижении уровня SMAD4 — посредника передачи сигнала TGF- β — наблюдается снижение его антипролиферативного эффекта на аденокортикальные клетки [2, 5, 6].

Фактор роста эндотелия сосудов. Этот фактор роста обеспечивает ангиогенез в нормальных тканях, а также при патологических процессах. Лиганд реализует свои клеточные эффекты путем связывания с одноименными рецепторами VEGFR-1, VEGFR-2 с последующей трансдукцией сигнала через активацию PI3K/AKT и MAPK, а также фосфолипазу C [33], обеспечивая таким образом миграцию, пролиферацию и выживание клеток. В нормальных аденокортикальных клетках плода наибольшая концентрация VEGF-A выявлена в областях капсулы и субкапсулы, т.е. в зоне активной пролиферации [33, 34]. В клетках коры надпочечника взрослого человека уровень экспрессии VEGF-A и его рецепторов высок и обеспечивает поддержание развитой сосудистой сети [34]. В клетках аденокортикальной карциномы повышение экспрессии VEGF-A было продемонстрировано в 8 из 9 исследований. При этом сверхэкспрессия наблюдалась в аденокортикальных карциномах (по сравнению с нормальными надпочечниками и аденомами), а также среди функционально активных карцином (по сравнению с нефункционирующими карциномами) [35–40].

Таким образом, модуляторы выступают в качестве ключевых факторов, предопределяющих судьбу клеток аденокортикальной линии, и включают гетерогенную группу сигнальных молекул: транскрипционный фактор SF-1 и регуляторы его экспрессии, локально экспрессируемые сигнальные молекулы, их пути трансдукции (SHH, Wnt/ β -catenin), факторы роста (IGF-2, TGF- β) и эндокринные факторы (АКТГ, ангиотензин II). Повреждение генов, кодирующих компоненты путей, участвующих в развитии и поддержании аденокортикальных клеток в онтогенезе, может приводить к изменению дифференцировки клеток и их усиленной пролиферации.

ОМИКСНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Омиксные исследования — технологии, основанные на достижениях геномики, транскриптомики, протеомики, метаболомики и метилома. Они предполагают изучение генома и продуктов его реализации

в целом, а не отдельных генов, молекул мРНК, клеточных белков и метаболитов [41]. Такой подход целостного исследования молекулярно-генетических патологических механизмов аденокортикального онкогенеза позволяет выявить новые биомаркеры дооперационной диагностики, создать прогностическую кластеризацию АКР с учетом биологического поведения опухолевых клеток [42, 43].

Эпигенетические изменения в клетках аденокортикальной карциномы. Эпигенетика — раздел генетики, изучающий изменение активных генов во время роста и деления клеток. Эпигенетическое наследование представляет собой изменение синтеза белков, вызванных механизмами, не нарушающими последовательность и целостность ДНК. Эпигенетические механизмы регуляции могут сохраняться в ряде митотических делений соматических клеток с последующей передачей новым поколениям. Выделяют 2 эпигенетические модификации, приводящие к изменению экспрессии генов при раке: дифференциальную экспрессию miRNA и изменение статуса метилирования CpG-островков ДНК [2, 5, 6, 43].

Метиллом ДНК. Метилирование определенного участка ДНК — один из механизмов регуляции экспрессии генов. CpG-островки (CIMP) гена представляют собой неметилированные динуклеотиды, которые присутствуют в регуляторных областях генов. Изменение статуса метилирования CpG-островков (гиперметилирование одних участков и гипометилирование других) может модулировать экспрессию генов. Например, гиперметилирование H19 (участок в локусе 11p15, ингибирующий экспрессию IGF-2) может приводить к сверхэкспрессии ростового фактора. По уровню метилирования в клетках АКР выделяют 2 подгруппы CIMP: высокого (CIMP-high) и низкого (CIMP-low) уровней метилирования, которые тесно связаны с выживаемостью и биологическим поведением опухоли [43].

Некодирующие молекулы РНК. Некодирующие молекулы РНК, или микроРНК, представляют собой молекулы РНК, которые не кодируют белки, но участвуют в регуляции экспрессии генов путем модуляции трансдукции сигнала в разных молекулярных путях, в основном на посттранскрипционном уровне. МикроРНК включает 18–25 нуклеотидов. Являясь частью эпигенетического аппарата, клетки микроРНК участвуют в физиологических процессах, регулируют клеточный цикл, пролиферацию клеток и апоптоз [43–45]. В настоящий момент существуют данные о примерно 200 микроРНК, изменение регуляторного влияния которых может быть задействовано в патогенезе различных заболеваний, включая онкологические. МикроРНК плейотропны по своей природе. Они могут выступать в качестве как онкосупрессора (в физиологических концентрациях), так и онкогена (при сверхэкспрессии). Направление клеточного эффекта зависит от ткани: в каком-то типе ткани одна и та же

микроРНК может выступать в качестве онкогена, а в каком-то — в качестве онкосупрессора (свойство тканеспецифичности). В связи с этим изменение экспрессии конкретной некодирующей РНК и ее верификация путем исследования методом полимеразной цепной реакции, микрочипов и секвенирования нового поколения могут быть полезны при определении гистогенетической принадлежности опухоли в спорных случаях. В клетках аденокортикальной карциномы miRNA-483-3p и miRNA-485-5p наиболее изучены. Их сверхэкспрессия обеспечивает повышенную пролиферацию и угнетение апоптоза. Сверхэкспрессия miRNA-483-3p угнетает проапоптотическую мРНК p53-активируемого модулятора апоптоза PUMA (рис. 5). В свою очередь, miRNA-485-5p способствует пролиферации клеток и не влияет на апоптоз за счет регуляции экспрессии IGF-2. Противоопухолевая активность связана с miRNA-195, нацеленной на ZNF367 (белок цинковых пальцев 367), обеспечивающих клеточную инвазию. Подавленная экспрессия miRNA-195 коррелирует с повышенной клеточной инвазией и пролиферацией в опухолевых клетках. Экспрессия miRNA-205 и miRNA-99/100 регулирует экспрессию Bcl-2, IGF-2 и mTOR (mammalian target of rapamycin, мишень рапамицина млекопитающих) соответственно, выступая в качестве онкосупрессора, путем инициирования апоптоза и блокирования пролиферации клеток [46–50]. Эпигенетическая регуляция представлена на рис. 4 и 5.

Также важно отметить, что микроРНК циркулируют в разных биологических жидкостях и, следовательно, могут быть использованы для неинвазивной дифференциальной и ранней диагностики АКР и его рецидива. Уровень содержания определенных микроРНК может быть применен в целях стратификации риска и прогноза. На данный момент микроРНК с учетом их эпигенетического регуляторного потенциала могут быть рассмотрены как уникальные мишени для таргетной терапии. Сегодня представлены доклинические исследования, сосредоточенные на прогностической значимости и биологическом поведении аденокортикальных карцином в зависимости от изменения экспрессии различных микроРНК. В ряде работ показано влияние изменений экспрессии на модулирование чувствительности и устойчивости к цитостатику цисплатину, входящему в схему лечения метастатических и местно-распространенных форм АКР [49, 50].

Метаболизма стероидных гормонов в опухолевых аденокортикальных клетках. Аденокортикальные карциномы в 60–70 % случаев являются функционально активными образованиями [1]. Даже при невыраженной клинической симптоматике и отсутствии лабораторного биохимического повышения уровня 3 основных стероидных гормонов не исключается избыточная стероидопродуцирующая способность карцином. Как правило, это предшественники и метаболиты промежуточного этапа биосинтеза стероидов,

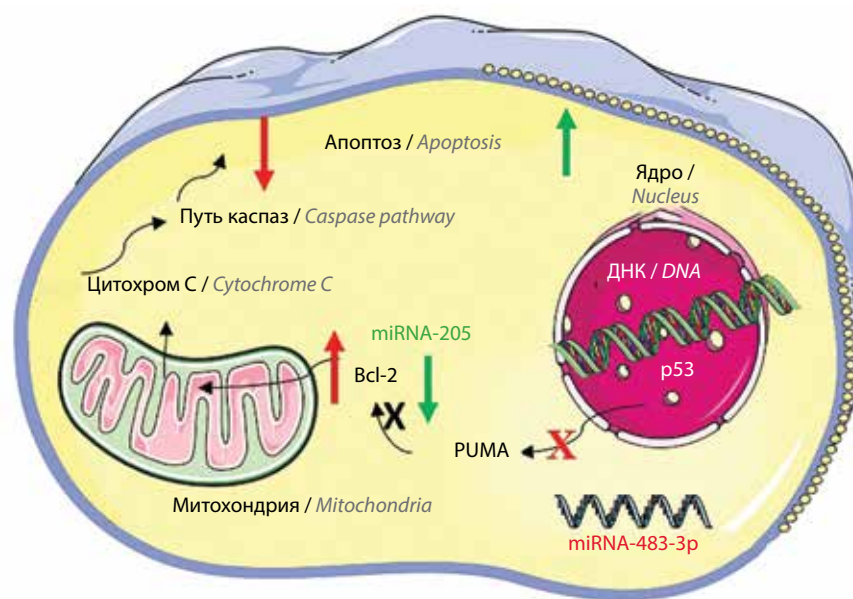


Рис. 5. Эпигенетическая регуляция апоптоза. Черным крестиком обозначено блокирование антиапоптотического комплекса Bcl-2, красным — блокирование матричной РНК проапоптотического белка PUMA, активируемого p53. Черными стрелками отмечен физиологический путь PUMA-индуцированного апоптоза. Красными стрелками обозначен онкогенный эффект miRNA-483-3p, зелеными — онкосупрессивный эффект miRNA-205. Fig. 5. Epigenetic regulation of apoptosis. The black cross indicates the blocking of the anti-apoptotic complex Bcl-2, the red one indicates the blocking of the matrix RNA of the proapoptotic protein PUMA activated by p53. The black arrows indicate the physiological pathway of PUMA induced apoptosis. The red arrows indicate the oncogenic effect of miRNA-483-3p, the green ones indicate the oncosuppressive effect of miRNA-205.

идентификация которых затруднена при применении рутинных методов клинической биохимии [51].

Поскольку окончательный синтез стероидных гормонов зависит от зонспецифичной экспрессии ферментов, то логично, что в незрелых дедифференцированных адренокортикальных клетках наблюдается снижение экспрессии «зрелых» ферментов биосинтеза. Несовершенный стероидогенез в опухолевых клетках был экспериментально доказан путем иммуногистохимического исследования [52]. Авторы изучили паттерн экспрессии основных ферментов стероидного каскада: альдостеронсинтазы (CYP11B2), 11 β -гидроксилазы (CYP11B1, кортизол-синтезирующего фермента), 3 β -гидроксистероида HSD-дегидрогеназы (3 β -гидроксистероид-HSD-дегидрогеназы — фермента для CYP11B2 и CYP11B1) и 17 α -гидроксилазы/C17—20 лиазы (CYP17 — вышестоящего фермента для CYP11B1, но не для CYP11B2). По данным исследования, в нормальных адренокортикальных клетках и доброкачественных аденомах стероидогенез был скоординирован, в то время как в адренокортикальной карциноме выявлена нескоординированная экспрессия ферментов. В опухолевых клетках присутствовала экспрессия CYP17 во всех участках и одновременная хаотичная экспрессия CYP11B2 и CYP11B1.

Ранее в аналогичном иммуногистохимическом исследовании описывались схожие результаты [53]. Так, в ходе такого исследования в опухоли могла обнаружиться экспрессия фермента 3 β -гидроксистероид HSD-дегидрогеназы, но отсутствовала экспрессия нижежащего более «зрелого» фермента CYP21. Последующие работы имели схожие результаты [51, 52, 54].

Наличие дезорганизованного стероидогенеза в опухолевых клетках объясняет фенотипические различия карцином в клинической практике.

Исследование метаболома стероидов в биологических жидкостях (плазме крови, моче, слюне и др.) стало новым диагностически значимым направлением дооперационного определения злокачественного потенциала новообразования и установления рецидива. Профилирование стероидов в моче наиболее предпочтительно в связи с суточным колебанием в сыроворотке крови секреции гормонов. Долгие годы, начиная с 60-х годов XX в., исследование метаболома стероидов осуществлялось посредством иммунного анализа, что ограничивало обнаружение всех метаболитов. Однако появление в начале XXI в. таких методов омиксных исследований, как газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией, и других видов хроматографии позволило преодолеть ограничения в определении стероидного профиля [55–59].

В ходе проспективного валидационного многоцентрового исследования EURINE-ACT, направленного на изучение профилирования стероидов в моче с целью дооперационного определения злокачественности («злокачественного отпечатка») новообразования при помощи газовой хромато-масс-спектрометрии, было выявлено, что чувствительность и специфичность этого метода составили 90 %, в то время как при рутинном биохимическом исследовании избыток стероидов наблюдался в 73 % случаев. К «злокачественным стероидным отпечаткам» можно отнести этиохоланолон, прегнентриол, прегнендиол, прегнандиол, 17-гидроксипрегнанолон, прегнантриол

Наиболее значимые клинические исследования, посвященные оценке эффективности системной и таргетной терапии при адренокортикальной карциноме

The most important clinical trials of systemic chemotherapy and targeted therapy in adrenocortical carcinoma

Направление химиотерапии Direction of chemotherapy	Количество исследований Number of studies	Фаза испытаний Study type	Дизайн исследования Study design	Препарат Drug	Источники References
Ингибиторы IGF-2 и его рецепторы Inhibitors of IGF-2 and its receptors	3	II–III	Рандомизированное II фазы проспективное Phase II randomized prospective	Циксутумумаб + митотан Cixutumumab + mitotan Линситиниб Linsitinib Фигутумумаб Figutumumab	[64–66]
Мультикиназные ингибиторы Multikinase inhibitors	4	II	Рандомизированное II фазы однокрупное открытое Phase II randomized single-arm open label clinical trial Обсервационное ретроспективное когортное Observational retrospective cohort	Сунитиниб Sunitinib Сорафениб Sorafenib Кабозантиниб Cabozantinib Ленватиниб (+ пембролизумаб) Lenvatinib (+ pembrolizumab)	[67–70, 74]
VEGF-A: селективные ингибиторы VEGFR-1, -2, -3 selective inhibitor of VEGFR-1, -2, -3 иммуномодулирующий агент immunomodulatory agent моноклональное антитело против VEGF monoclonal anti-VEGF antibody	3	II	II фазы однокрупное открытое клиническое Phase II, single-arm, open label clinical trial Обсервационное ретроспективное когортное Observational retrospective cohort	Акситиниб Axitinib Талидомид Thalidomide Бевацизумаб (+ капецитабин) Bevacizumab (+ capecitabine)	[71–73]
Иммунотерапия: PD-1 PD-L1	3	II Ib	Рандомизированное проспективное Randomized prospective	Пембролизумаб Pembrolizumab Ниволумаб Nivolumab Авелумаб Avelumab	[70, 75, 77, 78]
ADIUVO-2 (сравнение монотерапии митотаном и его комбинации с цитостатиками) ADIUVO-2 (comparison of mitotane monotherapy and its combination with cytostatics)	1	III	Проспективное рандомизированное открытое параллельное исследование у пациентов с адренокортикальной карциномой I–III стадии и высоким риском развития рецидива Prospective randomized open-label parallel study in patients with stage ACC I–III at high risk of recurrence	Цисплатин, этопозид, митотан + монотерапия митотаном/ Cisplatin, etoposide, mitotan + mitotane monotherapy	[63]
Цитостатик таксанового ряда Cytostatic of the taxane series	1	II	Проспективное нерандомизированное открытое однокрупное исследование Prospective, non-randomized, open-label, single-arm study	Кабазитаксел Cabazitaxel	[74]

и фармакологических исследований выходит за рамки данного обзора. Однако с целью ознакомления в таблице приведены наиболее значимые клинические исследования, посвященные оценке эффективности системной и таргетной терапии при аденокортикальной карциноме. Точки приложения таргетных препаратов представлены на рис. 4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Понимание молекулярно-генетических механизмов аденокортикального онтогенеза, гомеостаза и онкогенеза существенно расширилось за последние десятилетия. На основе полученных результатов появились представления о биологическом потенциале клеток аденокортикальных карцином, что позволило выделить потенциальные биомаркеры ранней диагно-

стики этого заболевания, прогностические факторы и потенциальные мишени для таргетной терапии. Однако, несмотря на достигнутые успехи, АКР остается агрессивной эндокринной опухолью, характеризующейся поздней выявляемостью и неблагоприятным исходом. По-видимому, гетерогенный ландшафт молекулярных и генетических изменений формирует более сложный механизм, который не позволяет достичь значительного терапевтического прорыва. Пангеномные исследования, возможные в связи с внедрением омиксных технологий, являются перспективными и многообещающими для освоения новой и сложной фазы аденокортикального канцерогенеза. Анализ взаимосвязанных генетических изменений на разных уровнях регуляции может привести к интересным заключениям.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Else T., Kim A.C., Sabolch A. et al. Adrenocortical carcinoma. *Endocrine Rev* 2014;35(2):282–326. DOI: 10.1210/er.2013-1029
- Pittaway J., Guasti L. Pathobiology and genetics of adrenocortical carcinoma. *Mol Endocrinol* 2020;62(2):105–19. DOI: 10.1530/JME-18-0122
- Doghman M., Karpova T., Rodrigues G. et al. Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol* 2007;21(12):2968–987. DOI: 10.1210/me.2007-01204
- Bronswijk M.J.H., Laenen A., Bechter O.E. Clinical presentation, treatment modalities and outcome in patients with adrenocortical carcinoma: a single center experience. *Neoplasma* 2020;67(1):209–3. DOI: 10.4149/neo_2019_190105N17
- Ettaieb M., Kerkhofs T., van Engeland M., Haak H. Past, present and future of epigenetics in adrenocortical carcinoma. *Cancers (Basel)* 2020;13(5):1218. DOI: 10.3390/cancers12051218
- Mizdrak M., Tičinović Kurir T., Božić J. The role of biomarkers in adrenocortical carcinoma: a review of current evidence and future perspectives. *Biomedicines* 2021;9(2):174. DOI: 10.3390/biomedicines9020174
- Кроненберг Г.М., Рид Л., Полонский К. и др. Эндокринология по Вильямсу. Заболевания коры надпочечников и эндокринная артериальная гипертензия. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 208 с. Kronenberg H., Reed L., Polonsky K. et al. *Williams textbook of Endocrinology*. Moscow: GEOTAR-media, 2010. 208 p. (In Russ.).
- Simon D.P., Hammer G.D. Adrenocortical stem and progenitor cells: implications for adrenocortical carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 2012;351(1):2–11. DOI: 10.1016/j.mce.2011.12.006
- Walczak E.M., Hammer G.D. Regulation of the adrenocortical stem cell niche: implications for disease. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11(1):14–28. DOI: 10.1016/j.mce.2011.12.006
- Xing Y., Lerario A.M., Rainey W., Hammer G.D. Development of adrenal cortex zonation. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2015;44(2):243–74. DOI: 10.1016/j.ecl.2015.02.001
- Gummow B.M., Sheys J.O., Canselli V.R. et al. Reciprocal regulation of a glucocorticoid receptor-steroidogenic factor-1 transcription complex on the *Dax-1* promoter by glucocorticoids and adrenocorticotrophic hormone in the adrenal cortex. *Mol Endocrinol* 2006;20(11):2711–23. DOI: 10.1210/me.2005-0461
- Gut P., Huber K., Lohr J. et al. Lack of an adrenal cortex in Sf1 mutant mice is compatible with the generation and differentiation of chromaffin cells. *Development* 2005;132(20):4611–9. DOI: 10.1242/dev.02052
- Bland M., Fowkes R.C., Ingraham H.A. Differential requirement for steroidogenic factor-1 gene dosage in adrenal development versus endocrine function. *Mol Endocrinol* 2004;18(4):941–52. DOI: 10.1210/me.2003-0333
- Walczak E.M., Kuick R., Finco I. et al. Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *Mol Endocrinol* 2014;28(9):1471–86. DOI: 10.1210/me.2014-1060
- Исаева А.В., Зима А.П., Шабалова И.П. и др. β -катенин: структура, функции и роль в опухолевой трансформации эпителиальных клеток. *Вестник РАМН* 2015;70(4):475–83. DOI: 10.15690/vramn
- Isaeva A.V., Zima A.P., Shabalova I.P. et al. β -catenin: structure, function and role in malignant transformation of epithelial cells. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences* 2015;70(4):475–83. (In Russ.).
- Hazell G., Horn G., Lightman S.L. et al. Dynamics of ACTH-mediated regulation of gene transcription in ATC1 and ATC7 adrenal zona fasciculata cell lines. *Endocrinology* 2019;160(3):587–604. DOI: 10.1210/en.2018-00840
- Pitsava G., Maria A.G., Faucz F.R. Disorders of the adrenal cortex: genetic and molecular aspects. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:931389. DOI: 10.3389/fendo.2022.931389
- Belogorsky A., Baquedano M.S., Guercio G. et al. Adrenarche: postnatal adrenal zonation and hormonal and metabolic regulation. *Horm Res* 2008;70:257–67. DOI: 10.1159/000157871
- King P., Paul A., Laufer E. SHH signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(50):21185–90. DOI: 10.1073/pnas.0909471106
- Finco I., Lerario A.M., Hammer G.D. Sonic hedgehog and WNT signaling promote adrenal gland regeneration in male mice. *Endocrinology* 2018;159(2):579–96. DOI: 10.1210/en.2017-03061
- Gummow B.M., Scheys J.O., Cancelli V.R. et al. Reciprocal regulation of a glucocorticoid receptor-steroidogenic factor-1 transcription complex on the *Dax-1* promoter by glucocorticoids and adrenocorticotrophic hormone in the adrenal cortex. *Mol Endocrinol* 2006;20(11):2711–23. DOI: 10.1210/me.2005-0461
- Abou Nader N., Zamberlam G., Boyer A. Transgenic mouse models to study the development and maintenance of the adrenal cortex. *Int J Mol Sci* 2022;23(22):14388. DOI: 10.3390/ijms232214388

23. Maity P, Mondal A., Das R. et al. Diagnostic and prognostic utility of SF-1 in adrenal cortical tumours. *Indian J Pathol Microbiol* 2022;65(4):814–20. DOI: 10.4103/ijpm.ijpm_153_21
24. Muzzi J.C.D., Magno J.M., Souza J.S. et al. Comprehensive characterization of the regulatory landscape of adrenocortical carcinoma: novel transcription factors and targets associated with prognosis. *Cancers (Basel)* 2022;14(21):5279. DOI: 10.3390/cancers14215279
25. Ткачук А.В., Бельцевич Д.Г., Порубаева Э.Э., Урусова Л.С. Морфологические предикторы эффективности терапии митотаном при аденокортикальном раке. *Проблемы эндокринологии* 2022;68(6):76–88. DOI: 10.14341/probl13172
Tkachuk A.V., Beltsevich D.G., Porubayeva E.E., Urusova L.S. Morphological predictors of the efficacy of mitotane therapy in adrenocortical cancer. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology* 2023;68(6):76–88. (In Russ.). DOI: 10.14341/probl13172
26. Черепанов С.А., Баклаушев В.П., Габашвили А.Н. и др. Hedgehog-сигналинг и его роль в патогенезе нейроонкологических заболеваний. *Биомедицинская химия* 2015;61(3):332–42. DOI: 10.18097/PBMC20156103332
Cherepanov S.A., Baklaushev V.P., Gabashvili A.N. et al. Hedgehog signaling in the pathogenesis of neuro-oncology diseases. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry* 2015;61(3):332–42. (In Russ.).
27. Бяхова М.М., Воронкова И.А., Кривошеев А.В. Молекулярно-генетические характеристики аденокортикального рака. *Русский медицинский журнал* 2017;22:1651–3.
Byakhova M.M., Voronkova I.A., Krivosheev A.B. Molecular and genetic characteristics of adrenocortical cancer. *Russkij medicinskiy zhurnal = Russian Medical Journal* 2017;22:1651–3. (In Russ.).
28. Геннадиник А.Г., Нелаева А.А. Роль инсулиноподобного фактора роста-I в метаболизме, регуляции клеточного обновления и процессах старения. *Ожирение и метаболизм* 2010; 2:10–6.
Gennadinik A.G., Nelaeva A.A. Role insulin-like growth factor-I in metabolism, regulation of cellular renewal and aging processes. *Ozhirenie i metabolism = Obesity and metabolism* 2010;2:10–6. (In Russ.).
29. Костылева О.И., Герштейн Е.С., Ермилова В.Д. и др. Инсулиноподобные факторы роста I и II в сыворотке крови больных раком молочной железы. *Вестник ТГУ* 2014;19(1):16–20.
Kostyleva O.I., Gershteyn E.S., Yermilova V.D. et al. Insulin-like growth factor in blood serum of breast cancer patients. *Vestnik TGU = TGU Bulletin* 2014;19(1):16–20. (In Russ.).
30. Шевченко В.Е., Брюховецкий И.С., Никифорова З.Н. и др. Трансформирующий фактор роста бета-1 в онкогенезе аденокарциномы легкого человека. *Успехи молекулярной онкологии* 2017;4(4):67–74. DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-67-74
Shevchenko V.E., Bryukhovetskiy I.S., Nikiforova Z.N. et al. The transforming growth factor beta-1 in the oncogenesis of human lung adenocarcinoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2017;4(4):67–74. DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-67-74 (In Russ.).
31. Neel J.Ch., Humbert L., Lebrun J.J. et al. The dual role of TGF β in human cancer: from tumor suppression to cancer metastasis. *ISRN Mol Biol* 2012;2012:381428. DOI: 10.5402/2012/381428
32. Pereira S.S., Oliveira S., Monteiro M.P., Pignatelli D. Angiogenesis in the normal adrenal fetal cortex and adrenocortical tumors. *Cancers (Basel)* 2021;13(5):1030. DOI: 10.3390/cancers13051030
33. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. *Genes Cancer* 2011;2(12):1097–105. DOI: 10.1177/1947601911423031
34. Liggins G.C. Adrenocortical-related maturational events in the fetus. *Am J Obstet Gynecol* 1976;126(7):93141. DOI: 10.1016/0002-9378(76)90680-3
35. Kolomecki K., Stepien H., Bartos M., Kuzdak K. Usefulness of VEGF, MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 serum level evaluation in patients with adrenal tumours. *Endocr Regul* 2001;35(1):9–16.
36. Zacharieva S., Atanassova I., Orbetzova M. et al. Circulating vascular endothelial growth factor and active renin concentrations and prostaglandin E2 urinary excretion in patients with adrenal tumours. *Eur J Endocrinol* 2004;150(3):345–9. DOI: 10.1530/eje.0.1500345
37. Bernini G.P., Moretti A., Bonadio A.G. et al. Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(11):4961–5. DOI: 10.1210/jc.2001-011799
38. Kroiss M., Reuss M., Kühner D. et al. Sunitinib inhibits cell proliferation and alters steroidogenesis by down-regulation of HSD3B2 in adrenocortical carcinoma cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2011;2:27. DOI: 10.3389/fendo.2011.00027
39. De Fraipont F., El Atifi M., Gicquel C. et al. Expression of the angiogenesis markers vascular endothelial growth factor-A, thrombospondin-1, and platelet-derived endothelial cell growth factor in human sporadic adrenocortical tumors: correlation with genotypic alterations. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(12):4734–41. DOI: 10.1210/jcem.85.12.7012
40. Xu Y.Z., Zhu Y., Shen Z.J. et al. Significance of heparanase-1 and vascular endothelial growth factor in adrenocortical carcinoma angiogenesis: potential for therapy. *Endocrine* 2011;40(3):445–51. DOI: 10.1007/s12020-011-9502-1
41. Pozdnyev N., Fishbein L., Gay L.M. et al. Targeted genomic analysis of 364 adrenocortical carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 2021;28(10):671–81. DOI: 10.1530/ERC-21-0040
42. Silvestri E., Lombardi A., De Lange P. et al. Studies of complex biological systems with applications in molecular medicine: the need for integration of transcriptomic and proteomic approaches. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:810242.
43. Detomas M., Pivonello C., Pellegrini B. et al. MicroRNAs and long non-coding RNAs in adrenocortical carcinoma. *Cells* 2022;11(14):2234. DOI: 10.3390/cells11142234
44. Decmann A., Perge P., Turai P.I. et al. Non-coding RNAs in adrenocortical cancer: from pathogenesis to diagnosis. *Cancers* 2020;12(2):461. DOI: 10.3390/cancers12020461
45. Koperski Ł., Kotlarek M., Świerniak M. et al. Next-generation sequencing reveals microRNA markers of adrenocortical tumors malignancy. *Oncotarget* 2017;8(30):49191–200.
46. Kwok G.T.Y., Zhao J.T., Glover A.R. et al. microRNA-431 as a chemosensitizer and potentiator of drug activity in adrenocortical carcinoma. *Oncologist* 2019;24(6):e241–50. DOI: 10.1634/theoncologist.2018-0849
47. Wang S., Li M.Y., Liu Y. et al. The role of microRNA in cisplatin resistance or sensitivity. *Expert Opin Ther Targets* 2020;24:885–97. DOI: 10.1080/14728222.2020.1785431
48. Turai P.I., Herold Z., Nyirő G. et al. Tissue miRNA combinations for the differential diagnosis of adrenocortical carcinoma and adenoma established by artificial intelligence. *Cancers (Basel)* 2022;14(4):895. DOI: 10.3390/cancers14040895
49. Ye B., Shi J., Kang H. et al. Advancing pan-cancer gene expression survival analysis by inclusion of non-coding RNA. *RNA Biol* 2020;17(11):1666–73. DOI: 10.1080/15476286.2019
50. Darabi S., Braxton D.R., Eisenberg B.L., Demeure M.J. Molecular genomic profiling of adrenocortical cancers in clinical practice. *Surgery* 2021;169(1):138–44. DOI: 10.1016/j.surg.2020.05.039
51. Arlt W., Biehl M., Taylor A.E. et al. Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(12):3775–84. DOI: 10.1210/jc.2011-1565
52. Uchida T., Nishimoto K., Fukumura Y. et al. Disorganized steroidogenesis in adrenocortical carcinoma, a case study. *Endocr Pathol* 2017;28(1):27–35. DOI: 10.1007/s12022-016-9441-8
53. Sasano H., Miyazaki S., Sawai T. et al. Primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD): immunohistochemical and in situ hybridization analysis of steroidogenic enzymes in eight cases. *Mod Pathol* 1992;5(1):23–9.
54. Hou Y., Gao Y., Guo S. et al. Applications of spatially resolved omics in the field of endocrine tumors. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023;13:993081. DOI: 10.3389/fendo.2022.993081

55. Bothou C., Penton D., Abate A. et al. A comprehensive investigation of steroidogenic signaling in classical and new experimental cell models of adrenocortical carcinoma. *Cells* 2022;11(9):1439. DOI: 10.3390/cells11091439
56. Kerkhofs T.M., Kerstens M.N., Kema I.P. et al. Diagnostic value of urinary steroid profiling in the evaluation of adrenal tumors. *Horm Cancer* 2015;6(4):168–75. DOI: 10.1007/s12672-015-0224-3
57. Шафигуллина З.Р., Великанова Л.И., Ворохобина Н.В. и др. Диагностическое значение стероидных профилей биологических жидкостей больных синдромом Кушинга. *Проблемы эндокринологии* 2015;61(4):4–8. DOI: 10.14341/probl20156144-8
58. Velikanova L.I., Shafigullina Z.R., Lisitsin A.A. et al. Different types of urinary steroid profiling obtained by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry in patients with adrenocortical carcinoma. *Horm Cancer* 2016;7(56):327–35. DOI: 10.1007/s12672-016-0267-0
59. Schweitzer S., Kunz M., Kurlbaum M. et al. Plasma steroid metabolome profiling for the diagnosis of adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2019;180(2):117–25. DOI: 10.1530/EJE-18-0782
60. Bancos I., Taylor A.E., Chortis V. et al. Urinary steroid metabolomics for the differential diagnosis of adrenal incidentalomas in the EURINE-ACT trial: a prospective validation study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020;8:773–81. DOI: 10.1016/S2213-8587(20)30218-7
61. Paragliola R.M., Corsello A., Locantore P. et al. Medical approaches in adrenocortical carcinoma. *Biomedicines* 2020;8(12):551. DOI: 10.3390/biomedicines8120551
62. Lam A.K. Adrenocortical carcinoma: updates of clinical and pathological features after renewed World Health Organisation classification and pathology staging. *Biomedicines* 2021;9(2):175. DOI: 10.3390/biomedicines9020175
63. Terzolo M., Fassnacht M., Perotti P. et al. Results of the ADIUVO study, the first randomized trial on adjuvant mitotane in adrenocortical carcinoma patients. *J Endoc Soc* 2021;5(Suppl. 1): A166–7. DOI: 10.1210/jendso/bvab048.336
64. Haluska P., Worden F., Olmos D. et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the anti-IGF-1R monoclonal antibody figitumumab in patients with refractory adrenocortical carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;65:765–73. DOI: 10.1007/s00280-009-1083-9
65. Lerario A.M., Worden F.P., Ramm C.A. et al. The combination of insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) antibody cixutumumab and mitotane as a first-line therapy for patients with recurrent/metastatic adrenocortical carcinoma: a multi-institutional nci-sponsored trial. *Horm Cancer* 2014;5:232–9. DOI: 10.1007/s12672-014-0182-1
66. Fassnacht M., Berruti A., Baudin E. et al. Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2015;16(4):426–35. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70081-1
67. Kroiss M., Quinkler M. et al. Sunitinib in refractory adrenocortical carcinoma: a phase ii, single-arm, open-label trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(10):3495–503. DOI: 10.1210/jc.2012-1419
68. Berruti A., Sperone P., Ferrero A. et al. Phase II study of weekly paclitaxel and sorafenib as second/third-line therapy in patients with adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2012;166(3): 451–8. DOI: 10.1530/EJE-11-0918
69. Bedrose S., Miller K.C., Altameemi L. et al. Combined lenvatinib and pembrolizumab as salvage therapy in advanced adrenal cortical carcinoma. *J Immunother Cancer* 2020;8:e001009. DOI: 10.1136/jitc-2020-001009
70. Kroiss M., Megerle F., Kurlbaum M. et al. Objective response and prolonged disease control of advanced adrenocortical carcinoma with cabozantinib. *J Clin Endocrinol Metab* 2020;105(5):14618. DOI: 10.1210/clinem/dgz318
71. O'Sullivan C., Ederly M., Velarde M. et al. The VEGF inhibitor axitinib has limited effectiveness as a therapy for adrenocortical cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(4):1291–7. DOI: 10.1210/jc.2013-2298
72. Kroiss M., Deutschbein T., Schlötelburg W. et al. Treatment of refractory adrenocortical carcinoma with thalidomide: analysis of 27 patients from the European Network for the Study of Adrenal Tumours Registry. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2019;127(9): 578–84. DOI: 10.1055/a-0747-5571
73. Wortmann S., Quinkler M., Ritter C. et al. Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2010;162(2):349–56. DOI: 10.1530/EJE-09-0804
74. Laganà M., Grisanti S., Ambrosini R. et al. Phase II study of cabazitaxel as second-third line treatment in patients with metastatic adrenocortical carcinoma. *ESMO Open* 2022;7(2):100422. DOI: 10.1016/j.esmoop.2022.100422
75. Berruti A., Sperone P., Bellini E. et al. Metronomic therapy concepts in the management of adrenocortical carcinoma. *Horm Cancer* 2011;2(6):378–84. DOI: 10.1007/s12672-011-0087-1
76. Uchiyama M., Tanioka M., Kojima Y. et al. Clinical management and outcomes associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin plus mitotane treatment in metastatic adrenocortical carcinoma: a single institute experience. *Int J Clin Oncol* 2021;26(12):2275–81. DOI: 10.1007/s10147-021-02021-8
77. Carneiro B.A., Konda B., Costa R.B. et al. Nivolumab in metastatic adrenocortical carcinoma: results of a phase 2 trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;104:6193–200. DOI: 10.1210/jc.2019-00600
78. Le Tourneau C., Hoimes C., Zarwan C. et al. Avelumab in patients with previously treated metastatic adrenocortical carcinoma: phase 1b results from the javelin solid tumor trial. *J Immunother Cancer* 2018;6(1):111. DOI: 10.1186/s40425-018-0424-9
79. Alyateem G., Nilubol N. Current status and future targeted therapy in adrenocortical cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:613248. DOI: 10.3389/fendo.2021.613248

Благодарность

В рисунках использованы элементы шаблонов Servier Medical Art, предоставленные компанией Servier с лицензией Creative Commons Attribution 3.0.

Acknowledgment

Figure was partially generated using Servier Medical Art provided by Servier, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 non-porting license.

Вклад авторов

Д.П. Яшина: обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала и таблицы;
З.А. Афанасьева: обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи.

Authors' contribution

D.P. Yashina: review of publications on the topic of the article, article writing, preparation of illustrative material and tables;
Z.A. Afanasyeva: review of publications on the topic of the article, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.П. Яшина / D.P. Yashina: <https://orcid.org/0000-0003-2746-8837>

З.А. Афанасьева / Z.A. Afanasyeva: <https://orcid.org/0000-0002-6187-2983>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено без финансовой поддержки.

Funding. The study was done without financial support.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-58-69



Диагностический и терапевтический потенциал белков экзосом при раке молочной железы

А.А. Шефер^{1,2}, Я.А. Фрик², С.Н. Тамкович^{1,2}¹ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»; Россия, 630090 Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8;²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»; Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2**Контакты:** Светлана Николаевна Тамкович s.tamkovich@g.nsu.ru

Экзосомы представляют собой мембранные везикулы размером 30–150 нм, которые высвобождаются клетками при слиянии мультивезикулярных телец с плазматической мембраной. Отличительной чертой этих везикул является наличие в них поверхностных тетраспанинов CD9, CD63 и CD81. Семейство малых ГТФаз Rab, включая Rab27A и Rab27B, контролирует различные этапы высвобождения экзосом, в том числе транспорт мультивезикулярных телец и слияние мультивезикулярного тельца с плазматической мембраной. На сегодняшний день принято считать экзосомы основными переносчиками информации между клетками в физиологических условиях, таких как развитие молочной железы и лактация, и при патологии, например при раке молочной железы. В обзоре рассмотрены особенности формирования, секреции и транспорта экзосом, их состав и роль в норме и при раке молочной железы, а также перспективы использования этих везикул для разработки ранней неинвазивной диагностики и повышения эффективности противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: экзосомы, рак молочной железы, диагностика рака молочной железы, терапия рака молочной железы**Для цитирования:** Шефер А.А., Фрик Я.А., Тамкович С.Н. Диагностический и терапевтический потенциал белков экзосом при раке молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):58–69. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-58-69

The diagnostic and therapeutic potential of exosomal proteins in breast cancer

A.A. Shefer^{1,2}, Ya.A. Frik², S.N. Tamkovich^{1,2}¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 8 Akademika Lavrent'eva Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia;²Novosibirsk State University; 2 Pirogova St., Novosibirsk 630090, Russia**Contacts:** Svetlana Nikolaevna Tamkovich s.tamkovich@g.nsu.ru

Exosomes are membrane vesicles 30–150 nm in size released by cells upon fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane. A distinctive feature of these vesicles is the presence of the surface tetraspanins CD9, CD63, and CD81. The Rab family of small GTPases, including Rab27A and Rab27B, controls various steps in exosome release, including transport of multivesicular bodies and fusion of the multivesicular body to the plasma membrane. It is commonly accepted to date that exosomes are the main carriers of information between cells under physiological conditions, such as mammary development and lactation, and under pathological conditions, such as breast cancer. This review considers the peculiarities of exosome formation, secretion and transport, their composition and role in normal and breast cancer, as well as the prospects for using these vesicles to develop early non-invasive diagnostics and improve the effectiveness of anti-tumor therapy.

Keywords: exosomes, breast cancer, breast cancer diagnosis, breast cancer therapy**For citation:** Shefer A.A., Frik Ya.A., Tamkovich S.N. The diagnostic and therapeutic potential of exosomal proteins in breast cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(2):58–69. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-58-69

ВВЕДЕНИЕ

Экзосомы представляют собой внеклеточные везикулы, окруженные мембраной диаметром 30–150 нм. Они отличаются от остальных малых везикул наличием поверхностных тетраспанинов CD9, CD63 и CD81 [1, 2]. Основной функцией экзосом является транспорт молекул между клетками (РНК, белки, ДНК, липиды и метаболиты). Показано наличие экзосом практически во всех биологических жидкостях: эти везикулы секретируются клетками организма как в норме, так и при ряде патологических состояний [3, 4]. Кроме того, выявлено повышение концентрации экзосом в биологических жидкостях, а также существенное изменение их состава при наличии в организме злокачественных опухолей, в частности рака молочной железы (РМЖ) [2, 5]. За последние 10 лет появилось много публикаций, посвященных изучению экзосом: согласно базе данных Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), с 2013 по 2022 г. их количество выросло с 661 до 5134. Несмотря на интенсивность исследований, до сих пор остаются неясными многие функции экзосом. Известно, что данные везикулы отражают состав секретирующих их клеток и играют ключевую роль в межклеточной коммуникации, передаче сигналов, поддержке и ремоделировании внеклеточного матрикса, а также в других физиологических процессах. Таким образом, транспорт биологически активных веществ посредством экзосом имеет большое значение в основных клеточных процессах, включая иммунный ответ, гомеостаз и регенерацию. В то же время в крови онкологических больных выявлено повышение концентрации этих везикул и существенное изменение их состава [5]. На сегодняшний день ведется активный поиск диагностически значимых маркеров в составе экзосом крови для разработки жидкой биопсии РМЖ, а также предпринимаются попытки их использования для повышения эффективности противоопухолевой терапии.

Цель работы — анализ состава и роли экзосом в норме и при РМЖ, а также перспективы использования этих везикул для разработки ранней неинвазивной диагностики и повышения эффективности противоопухолевой терапии.

БИОГЕНЕЗ ЭКЗОСОМ

Экзосомы представляют собой везикулы эндотозного происхождения, окруженные липидной мембраной, имеющие, по разным оценкам, размер 30–100 нм [6] или 30–150 нм [7] (что, вероятно, связано с различными методами анализа этих везикул) и несущие на своей поверхности тетраспанины CD9, CD63, CD81 (рис. 1). Помимо экзосом к мембранным везикулам относят микровезикулы (размер 100–1000 нм) и апоптотические тельца (размер 50–500 нм) [2, 8].

Формирование экзосом начинается с инвагинации плазмалеммы и образования ранней эндосомы, которая может либо снова слиться с мембраной (в таком

случае она называется циркулирующей эндосомой), либо претерпеть ряд изменений, превратившись в мультивезикулярное тельце. Основными регуляторами перехода от ранней эндосомы к мультивезикулярному тельцу являются малая ГТФаза Rab5 и эффектор VPS34/p150 [9]. После связывания с Rab5 начинают работу эффекторные белки: фосфоинозитол-3-киназа, ранний эндосомальный антиген 1 и рабенозин-5, которые стабилизируют активную форму Rab5, способствуя дальнейшему узнаванию доменом цинкового пальца FYVE, входящим в состав эндосомального сортировочного комплекса (ESCRT). Комплекс ESCRT-0 узнает убиквитинизированные белки с помощью гетеродимера HRS и STAM1/2 [10]. ESCRT-0 привлекает комплексы ESCRT-I и ESCRT-II, которые индуцируют формирование экзосом из мембраны мультивезикулярного тельца. Далее привлекается комплекс ESCRT-III, который способствует откреплению экзосом от мембраны и высвобождению везикул внутрь мультивезикулярного тельца [11]. После этого мультивезикулярное тельце может либо потерять убиквитиновую метку при помощи группы белков, либо слиться с лизосомой и деградировать. Далее при помощи белков Rab27A и Rab27B данное тельце перемещается к периферии клетки и сливается с мембраной [2, 12].

Стоит отметить, что при инактивации белков Rab27A и Rab27B секреция экзосом снижается лишь наполовину, из чего следует вывод о существовании альтернативных путей реализации секреции. Помимо Rab27A и Rab27B показано влияние на секрецию экзосом белков Rab5A, Rab9A и Rab2 [2, 12] (см. рис. 1). Кроме того, было обнаружено, что как нормальные, так и опухолевые клетки увеличивают уровень секреции экзосом в неблагоприятных условиях (гипоксия, тепловой шок и т. д.) [5].

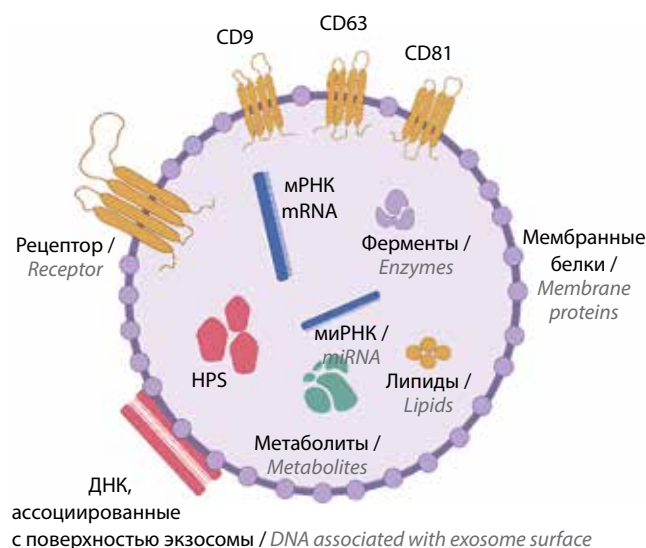


Рис. 1. Состав экзосом
Fig. 1. Exosome structure

Существует также ESCRT-независимый путь формирования экзосом, в котором основным регуляторным белком выступает белок Rab31, фосфорилирующийся рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) и способствующий экспорту EGFR внутрь мультивезикулярного тельца при помощи белков-флотилов. После этого Rab31 инактивирует Rab7 посредством белка TBC1D2B, что не позволяет мультивезикулярному тельцу деградировать, слившись с лизосомой, а дает ему возможность выйти из клетки [13]. Также было показано, что в сформированных ESCRT-независимым путем экзосомах повышено содержание церамида [14].

Секреция экзосом во внеклеточное пространство происходит непосредственно за счет слияния поздней эндосомы с плазмалеммой. Процесс слияния начинается с взаимодействия белка синаптотаксина с кальциевыми рецепторами, в результате чего мультивезикулярное тельце связывается с транс-SNARE-комплексом, после которого экзосомы секретируются во внеклеточную среду [2, 12].

Известно, что экзосомы могут оказывать как локальное воздействие на близлежащие клетки, так и дистально влиять на клетки, разносясь вместе с током крови и лимфы к тканям. Экзосомы обнаруживаются в слюне [15], спинномозговой и вагинальной жидкостях [16], крови [17], моче [4], слезе [18], а также в грудном молоке [19]. Согласно данным литературы, на 1 мкл крови приходится от 3 до 50 млн экзосом [3]. В состав экзосом входят белки, РНК, ДНК, липиды и метаболиты. Основной функцией экзосом является обеспечение межклеточных коммуникаций путем транспортировки функционально активных соединений от клеток-доноров к клеткам-реципиентам [2, 20]. При этом показано, что экзосомы способны оказывать как локальное воздействие — путем диффузии в жидкостях организма, так и дистальное, перемещаясь с током крови и лимфы на большие расстояния. Недавно было выявлено, что экзосомы могут связываться с поверхностью форменных элементов крови и в таком виде длительно циркулировать [21].

СОСТАВ ЭКЗОСОМ

К наиболее характерным для экзосом белкам относят мембранные тетраспаныны CD63, CD9, CD81, за счет которых в том числе осуществляется связывание везикул с клеткой-мишенью (см. рис. 1). В то же время белковый состав экзосом может сильно различаться, отражая состав клеток-доноров. Например, на поверхности экзосом HER2/neu-положительной (HER2 — human epidermal growth factor receptor 2, рецептор эпидермального фактора роста, тип 2) карциномы молочной железы обнаруживается HER2 [22]. Также экзосомы несут в себе набор различных ферментов (одни из важнейших — ГТФазы Rab, способствующие слиянию мембран), белки цитоскелета (тубулин, актин), комплекса гистосовместимости (МНС I и II),

теплового шока (Hsp70, Hsp90), сигнальные белки и т.д. [9, 10, 12, 13]. На основе базы данных ExoCarta (www.exocarta.org), включающей сведения независимых исследований о содержащихся в экзосомах белках, липидах, микроРНК и матричных РНК (мРНК) (на конец 2022 г.), можно выделить 20 наиболее характерных для экзосом белков (табл. 1). Некоторые

Таблица 1. Наиболее представленные белки в составе экзосом по данным ExoCarta на конец 2022 г.

Table 1. The most abundant proteins in exosomes per ExoCarta data from the end of 2022

Белок Protein	Количество идентификаций Number of identifications
CD9	98
TIAM1	96
CA125 (опухолевый маркер, связанный с раком яичников) CA125 (ovarian cancer related tumor marker)	96
Изоформа X2 белка цинкового пальца GLI2 Zinc finger protein GLI2 isoform X2	95
Предшественник изоформы В ашерина Usher1 isoform B precursor	93
Субъединица 5 НАДН-дегидрогеназы NADH dehydrogenase subunit 5	83
CD63	82
Ламинин альфа-5, изоформа CRA_b Laminin, alpha 5, isoform CRA_b	78
ENO1	78
Изоформа калирина Kalirin isoform	77
TSG101	75
PKM	72
Титин, изоформа IC Titin isoform IC	72
Е3 убиквитин-протеинлигаза UBR4 E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	71
Нетрадиционный миозин-XVI Unconventional myosin-XVI	69
PGK1	69
EEF2	69
Цепь А, интегрин-связанной киназы Chain A, Integrin-linked kinase	69
Мидазин Midasin	67
Цитохром b Cytochrome b	67

из этих белков рассматриваются в литературе как связанные с развитием злокачественных новообразований. Так, CA125 является одним из классических маркеров рака яичников [2, 23], а 5 субъединиц NADH-дегидрогеназы — белки, увеличивающие выживаемость при миелоидной лейкемии [24]. Описано, что ламинин альфа-5 является регулятором клеточной адгезии и стимулятором метастазирования при колоректальном раке [25], а ENO1 может регулировать онкогенез, эпителиально-мезенхимальный переход, рост опухоли, метастазирование и супрессию ферроптоза при различных видах рака [26–29].

Для PKM показана способность индуцировать рост опухолевой массы при колоректальном раке [30], а для PGK1 — регулировать этот рост [31].

В литературе показаны роль интегрин-связанной киназы в метастазировании рака простаты [32] и гиперэкспрессия цитохрома b при РМЖ [33]. Остальные белки не были ранее отмечены как вовлеченные в процесс канцерогенеза.

Анализ данных белков с помощью программного обеспечения STRING (<https://string-db.org/>) показал их взаимосвязь и вовлеченность в единые процессы (рис. 2).

Липидный состав экзосом отчасти отражает состав мембраны секретирующих их клеток. В частности, соотношение холестерина, церамидов, фосфатидилсерина и сфингомиелинов более сбалансировано и равномернее распределено между внутренней и внешней

поверхностями мембраны экзосом, чем в мембранах родительских клеток [34]. Как следствие, мембраны экзосом больше склонны к выворачиванию, что сближает их по свойствам и составу с мембранами органелл. Также для экзосом характерно повышенное содержание фосфатидилинозитола и сфингомиелина, что, вероятно, необходимо для защиты от деградации и повышенной устойчивости к pH биологических жидкостей [2, 35]. Чаще всего в экзосомах обнаруживаются сфингомиелин, фосфолипиды, ганглиозид GM3 и холестерол [36–38]. Было показано, что экзосомы астроцитов могут повышать содержание церамидов и PAR-4 и индуцировать апоптоз в клетках-реципиентах [14, 39].

В ранних работах авторы отмечали наличие ДНК в составе экзосом [40]. Вероятно, это связано с использованием методов выделения экзосом, содержащих примеси апоптотических телец и везикул большего размера. Например, в составе экзосом, секретируемых фибробластами, выявлены ретротранспозоны, а в экзосомах некоторых клеток медуллобластомы — ДНК онкогена с-Мус [41]. Работы последних лет демонстрируют наличие ДНК, связанной с белками на поверхности экзосомальной мембраны, однако доля этой ДНК не превышает 0,5 % всей выявленной ДНК крови. Также отмечается присутствие на поверхности экзосом белков, не обеспечивающих связывания с ДНК, но связывающихся с нуклеопротеиновыми комплексами [2, 42].

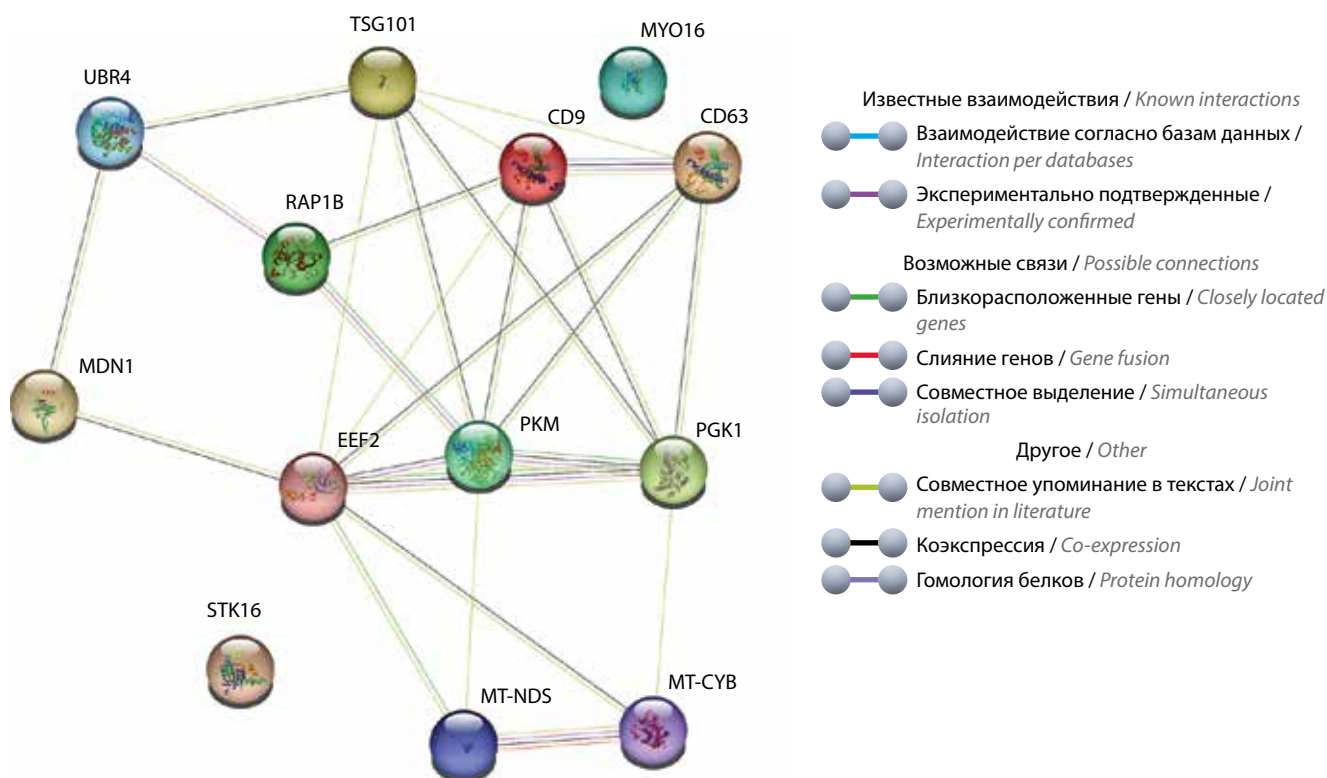


Рис. 2. Взаимосвязь наиболее характерных белков экзосом

Fig. 2. Relationships between the most characteristic exosomal proteins

В состав экзосом также могут входить мРНК, длинная некодирующая РНК и микроРНК; при этом после переноса из одной клетки в другую эти РНК способны к нормальному функционированию [43–45]. Например, экзосомальная микроРНК-212-3р ингибирует транскрипционный фактор МНС-II, а микроРНК-222-3р — SOCS3 [46, 47]. Известно, что РНК в составе экзосом способны индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход (miRNA-210, miRNA-191, miRNA-23a), клеточную подвижность (miRNA-195, miRNA-128, miRNA-188), ангиогенез (miRNA-30с, miRNA-424, miRNA-let-7f) и лекарственную устойчивость (miRNA-21, miRNA-155, miRNA-222) [2, 48]. Экзосомы также способны переносить мРНК, повышая таким образом уровень синтеза белков в клетках-реципиентах; кроме того, данные мРНК можно использовать в качестве онкомаркеров [49].

РОЛЬ ЭКЗОСОМАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В РАЗВИТИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

При РМЖ, помимо участия в начальной злокачественной трансформации, экзосомы могут передавать сигнальные молекулы клеткам опухолевого микроокружения, не только помогая раковым клеткам уклоняться от иммунного ответа, но и способствуя инвазии и метастазированию опухоли путем реконструирования микросреды и стимулирования ангиогенеза.

Анализ белков экзосом клеток MCF-7, характеризующихся низким метастатическим потенциалом, показал повышенное содержание белков суперсемейства тетраспанинов (тетраспанин-14, CD9, CD63 и CD81) [50], которые усиливают клеточную адгезию и уменьшают склонность к миграции и метастазированию. В экзосомах линии MDA-MB-231, имеющей большой метастатический потенциал, была повышена представленность белков, усиливающих клеточную подвижность (виментин, галектин-3-связывающий белок (galectin-3-binding protein), аннексин A1 (annexin A1), плектин (plectin), белок CYR61, EGF-подобный повтор и дискоидин I-подобный домен, содержащий белок (EGF-like repeat and discoidin I-like domain containing protein), филамин D (filamin D), глютамин гамма-глутамилтрансфераза 2 (protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2)) [51]. Также было показано, что экзосомы переносят сурвивин, который усиливает экспрессию SOD1, контролирующего дифференцировку клеток фибробластического ряда в миофибробласты, нарушает адгезию фибробластов, позволяя метастазирующим опухолевым клеткам встраиваться в новые участки, а также усиливает пролиферацию клеток РМЖ [52]. В метастазирование РМЖ также вовлечена экзосомальная аспартат-β-гидроксилаза: было выявлено, что фермент запускает Notch-сигнальный путь, индуцирующий секрецию экзосом и повышающий агрессивность клеток [53]. В одной из работ продемонстрировано, что экзосомы, секретируемые линией MDA-MB-231 (подлинная SCP28), для которой

характерен крайне высокий метастатический потенциал, влияют на активность остеокластов в эксперименте на мышах *in vivo*, что в свою очередь способствует формированию преметастатических ниш в костях [54]. Кроме того, в экзосомах метастатически активных подтипов РМЖ обнаруживается повышение содержания тромбоспондина-1, являющегося регулятором клеточной подвижности и инвазии [2, 55]. Помимо данных о том, что опухолеассоциированные экзосомы способствуют инвазии опухолевых клеток и метастазированию, есть сведения о способности этих везикул изменять ансамбль экспрессируемых белков неопухолевых клеток, усиливая их инвазию в преметастатические ниши [56]. В частности, обработка клеток линии MDA-MB-231 экзосомами крови больных РМЖ повышает клеточную миграцию [57].

Опухолевые экзосомы также способны взаимодействовать с макрофагами, изменяя их фенотип. В частности, было показано, что экзосомы, секретируемые клетками РМЖ, несут в себе гликопротеин 130 (gp130), который совместно с miR-301a-3р вызывает активацию сигнального пути STAT3, в результате чего в макрофагах повышается концентрация активных форм кислорода [58]. Кроме того, после взаимодействия с опухолевыми экзосомами в макрофагах усиливается секреция интерлейкина-6, фактора некроза опухоли α (TNF-α) и CCL2. Также было выявлено, что при ингибировании gp130 макрофаги дифференцируются по обычному пути. Поглощение ими опухолевых экзосом приводит к потере антигена HLA-DR и повышению экспрессии CD14, т.е. к смене фенотипа на иммуносупрессорный [59]. Помимо влияния на макрофаги опухолевые экзосомы способны индуцировать апоптоз активированных Т-клеток, несущих CD8-рецептор [60]. Данный эффект может быть связан с экспрессией на поверхности экзосомальной мембраны МНС-I, который запускает апоптоз Т-лимфоцитов через сигнальный путь FasL/Fas [60]. Также была показана способность секретируемых опухолями экзосом индуцировать распространение клеток-супрессоров миелоидного происхождения, повышая их иммуносупрессорные способности за счет продуцирования множества факторов, вызывающих апоптоз Т-клеток [2, 61].

Большую роль в подавлении иммунного ответа играет лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1), который связывается с рецептором программируемой клеточной гибели 1 (programmed death 1, PD-1) на поверхности Т-клеток, подавляя их пролиферацию и секрецию цитокинов. PD-L1 был обнаружен в экзосомах совместно с галектином-9, который, взаимодействуя с экзосомальным белком Tim-3, подавляет пролиферацию Т-клеток [2, 62].

Экзосомы способны подавлять лекарственное воздействие за счет конкурентного ингибирования антител. В частности, для 1-й линии терапии больных

с HER2/neu-положительными подтипами РМЖ используются моноклональные антитела к рецептору HER2 [63]. Однако примерно через год после окончания лечения большинство пациентов становятся невосприимчивыми к препарату моноклональных антител [64]. На клеточных линиях SK-BR-3 и BT-474 *in vitro* было показано, что экзосомы гиперэкспрессируют HER2 и способны селективно связываться с моноклональными антителами [64]. Аналогичные результаты были получены и для экзосом, выделенных из крови пролеченных пациентов [63]. Вероятно, экзосомы HER2-положительных подтипов РМЖ конкурентно ингибируют моноклональные антитела, снижая их терапевтический эффект. Дополнительно было показано, что устойчивость к анти-HER2-препаратам связана с повышенным уровнем трансформирующего ростового фактора β -1 (transforming growth factor β , TGF- β 1) и PD-L1 [2, 62]. Также выявлено, что при обработке клеточной линии MCF-7, не резистентной к гормональным препаратам, экзосомами подлиний MCF-7 с резистентностью к тамоксифену или метформину наивная линия MCF-7 также приобретает резистентность к соответствующим препаратам [65, 66]. Показано, что чувствительность наивной линии к метформину восстанавливается через несколько суток после прекращения обработки экзосомами [67].

БЕЛКИ ЭКЗОСОМ КРОВИ КАК МАРКЕРЫ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДЛЯ ЖИДКОЙ БИОПСИИ

Поскольку состав экзосом зависит от состава продуцирующих их клеток, эти везикулы являются перспективным объектом для поиска опухолевых маркеров и разработки тест-систем для жидкой биопсии. Преимуществом использования экзосом в качестве источника диагностического материала по сравнению с циркулирующими опухолевыми клетками является их высокая концентрация в биологических жидкостях: $\sim 10^8$ /мл крови и не более ~ 10 /мл крови соответственно [2, 4, 5]. На сегодняшний день в реестре ClinicalTrials.gov зарегистрированы 3 испытания систем диагностики РМЖ, основанных на белках экзосом, 2 из которых были начаты в январе 2023 г.

По данным ряда исследований, для опухолевых экзосом характерна повышенная концентрация белка Hsp70 [68]. Также в экзосомах крови больных РМЖ обнаруживаются фибронектин, Del-1 и альтернативно сплайсированный сурвивин [69], а содержание глипикана-1 в этих везикулах возрастает на 75 % по сравнению со здоровыми женщинами [2, 70].

Кроме того, на поверхности экзосом крови больных РМЖ всех подтипов выявлено снижение содержания CD82 по сравнению со здоровыми женщинами. Причем чем ниже содержание этого тетраспанина в экзосомах, тем выше метастатический потенциал опухоли [2, 71].

Несмотря на высокую гетерогенность белков экзосом как в норме, так и при патологии, можно выде-

лить белки, характерные лишь для одной из групп. В частности, из 257 идентифицированных в составе экзосом крови белков универсальными для здоровых женщин и больных РМЖ оказался лишь 21 (8,2 %) белок; уникальные для экзосом крови пациентов с РМЖ белки представлены в табл. 2 [2, 72, 73]. Также в ходе исследования О.С. Тутанова и соавт. [72] отмечено повышенное содержание тетраспанин-ассоциированной шеддазы ADAM-10 на поверхности экзосом крови больных РМЖ люминального подтипа.

В одной из последних работ показано, что в крови больных с трижды негативным РМЖ, а также в клетках, отражающих данный молекулярный подтип, повышается содержание CD151. Данный тетраспанин влияет на сортировку белков в ходе секреции экзосом, повышая количество прометастатических белков в этих везикулах. Показано, что CD151-положительные экзосомы повышают метастатический потенциал *in vitro* [74]. Также было выявлено, что в экзосомах активно метастазирующих опухолей увеличивается содержание периостина [75].

На данный момент известно, что на поверхности экзосом, обнаруживаемых в асцитной жидкости и крови больных РМЖ, присутствует рецептор CD24 и отсутствует рецептор EpCAM, при этом при инвазии опухоли в легкие на поверхности экзосом идентифицируются оба рецептора, что может быть использовано для раннего выявления инвазии [2, 76].

В ходе масштабного межлабораторного исследования, проведенного в 2020 г., А. Noshino и соавт. [77] проанализировали 426 образцов экзосом из различных источников и выявили как новые специфические маркерные белки экзосом (ACTB, MSN, RAPIB), так и панели белков-маркеров в составе экзосом плазмы и в опухолевых тканях, полученных от больных РМЖ, колоректальным раком, меланомой, мезотелиомой, раком легкого и поджелудочной железы. С помощью метода машинного обучения обнаруженные опухолевые маркеры позволяют с чувствительностью 90 % и специфичностью 94 % дифференцировать норму и злокачественное заболевание [77].

Результаты вышеописанных и других перспективных протеомных исследований экзосом позволяют выделить ряд претендентов на роль белковых онкомаркеров в составе экзосом (см. табл. 2).

Мы оценили взаимосвязь экзосомальных белков, представленных в табл. 2, с помощью программного обеспечения STRING (рис. 3). Выявлено, что большинство проанализированных белков (67/75) взаимодействуют друг с другом, поскольку вовлечены в общие процессы.

Протеомные исследования экзосом позволяют увеличить набор белковых маркеров и выявить их комбинации, наиболее ценные с точки зрения диагностики. Однако для широкого применения в медицине необходимы обширные исследования, которые подтвердят диагностическую ценность новых маркеров на основе белков экзосом.

Таблица 2. Потенциальные протеомные маркеры злокачественных новообразований в составе экзосом крови больных раком молочной железы (РМЖ)

Table 2. Potential proteomic markers of malignant neoplasms in blood exosomes from patients with breast cancer

Белок Protein	Источник экзосом Exosome source	Ссылка Reference
CD82	98 больных РМЖ и 80 здоровых доноров 98 patients with breast cancer and 80 healthy donors	[71]
CD151	12 больных РМЖ и 12 здоровых доноров; клеточные линии BT5-49, MDA-MB-468, MDA-MB-231, T47-D, MCF-7 12 patients with breast cancer; BT5-49, MDA- MB-468, MDA-MB-231, T47-D, MCF-7 cell lines	[74]
CD24+ EpCAM	Первичные клеточные культуры больных РМЖ и здоровых доноров Primary cells lines from patients with breast cancer and healthy donors	[76]
HER2	Клеточные линии SK-BR-3 и BT-474 SK-BR-3 and BT-474 cell lines	[66]
OSF-2	Клеточные линии MCF-7 и MDA-MB-231, 67NR и 4T1 MCF-7 и MDA-MB-231, 67NR and 4T cell lines	[75]
HSP70, Del-1, FN1, альтернативно сплайсированный сурвивин HSP70, Del-1, FN1, alternatively spliced survivin	20 больных РМЖ и 14 здоровых доноров 20 patients with breast cancer and 14 healthy donors	[68, 69]
GPC1	Клеточные линии MDA-MB-231, MCF-10A MDA-MB-231, MCF-10A cell lines	[70]
IGHV3-74, C11orf97, TRBV4-3, SOCS3, PDZD2, SPTBN2, ERC2, COX7A2P2, SERPINB7, MBD4, PCNT, KRT6A, A1BG, KRT6B, KRT1, HMOX1, BMP1, PNLIP, KRT9, GLRB, CLK3, GATM, ELL2, UBA52, PPM1A, ATR, IL16, FAM50A, ITPR2, ITIH4, EXOSC7, SKIV2L, HAGH, TPD52L1, ZNF630, CCDC152, ZNF585B, RABGAP1L, PRAMEF9, DUPD1, PLB1, LPCAT2, MAEA, SSX9P, EPHX4, CKAP2L, CCDC146, C1orf131, SRARP, MYO3B, CACNG8, RUBCN, APPBP2, PHB2, TOR3A, PRDM12, COG4, MIEF1, FARSB, SACS, CABP1, ZNF451	23 больных РМЖ и 21 здоровый донор 23 patients with breast cancer and 21 healthy donors	[72]
FGB, FGA, FGG, CFH, PLG, IGHV3-53, APCS, CFHR1, IGHV3-48, CFHR2, IGHV4-59, IGHV3-11, IGHG3	18 больных РМЖ и 43 здоровых донора 18 patients with breast cancer and 43 healthy donors	[77]

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭКЗОСОМ

В большинстве исследований отмечается способность экзосом проявлять селективность к клеткам-мишеням [78, 79], что теоретически может быть использовано для разработки методов таргетной доставки препаратов для лечения различных заболеваний. На данный момент существуют методы прямого нацеливания экзосом на конкретные типы клеток путем добавления на поверхность везикул лигандов к рецепторам, экспрессируемых определенными клетками [6].

Также показана способность терапевтических экзосом воздействовать на различные типы рака, в частности на РМЖ [80], снижая пролиферацию и миграционный потенциал *in vitro*. Уже сейчас ряд исследований подтверждает возможность использования экзосом как терапевтических агентов при лечении трижды негативного РМЖ. В частности, было показано, что экзосомы, обогащенные MMP-15 и несущие доксорубин, способны таргетно воздействовать

на клетки трижды негативного РМЖ как *in vitro*, так и *in vivo* [81]. Аналогичный эффект был получен при использовании экзосом, обогащенных фолатом и имеющих в своем составе эрастин, который может вызывать ферроптоз в клетках РМЖ [82]. В обоих случаях данная терапия приводила к снижению скорости прогрессии опухоли [83, 84].

Доставка лекарственных препаратов путем их загрузки в экзосомы дает такое значимое преимущество, как адресность, и, как следствие, приводит к значительному снижению неспецифического воздействия на клетки. Однако существенными недостатками такого метода является сложность наполнения экзосом, а также быстрое выведение чужеродных экзосом из организма. К сожалению, авторы [80–84] не приводят информацию о длительности хранения и устойчивости экзосом, нагруженных лекарственными препаратами. Также в литературе недостаточно данных об иммунности этих везикул.

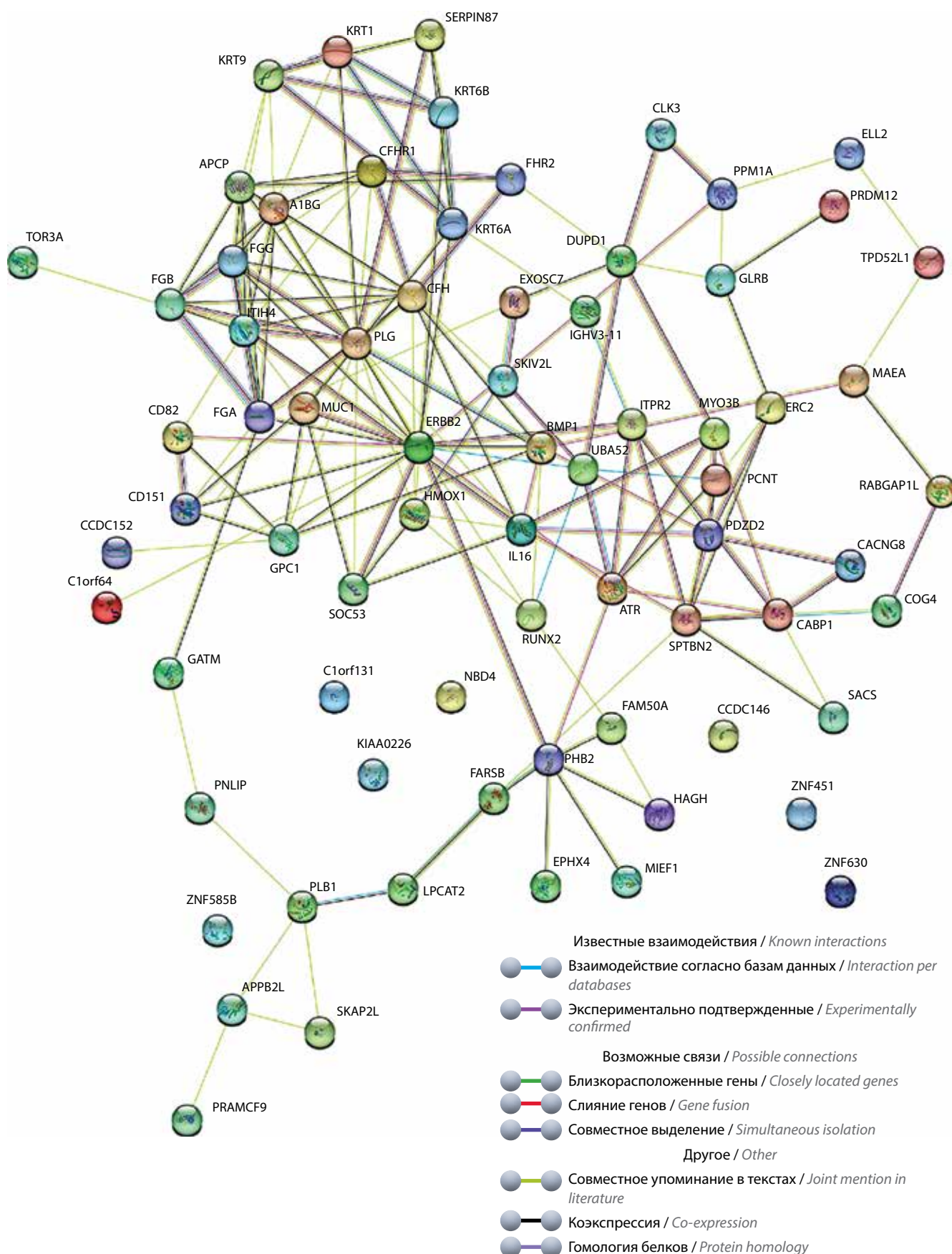


Рис. 3. Взаимосвязь экзосомальных белков — потенциальных маркеров рака молочной железы
Fig. 3. Associations between exosomal proteins — potential markers of breast cancer

Для модификации экзосом с целью их последующего использования в доставке лекарственных препаратов применяют различные подходы. Одним из до сих пор актуальных методов нагрузки экзосом терапевтическим агентом является длительное культивирование клеток-продуцентов в среде, содержащей лекарственное средство. Эффективность такой технологии ограничена проницаемостью клеточных мембран, а также эффектом терапевтического препарата на клетки-продуценты [85].

Для создания экзосом заданного состава также была предложена технология EXOPLEX. Ее суть заключается в добавлении искусственных липосом, несущих необходимый терапевтический агент, к содержащей экзосомы среде; в результате слияния везикул формируются новые везикулы с гибридной мембраной, несущие лекарственный препарат. В экспериментах на мышах было показано, что полученные по технологии EXOPLEX везикулы способны циркулировать в крови значительно дольше экзогенных экзосом [86].

Еще одним наиболее используемым на сегодняшний день подходом получения везикул, содержащих лекарственный препарат, является внедрение трансгена в секретирующую экзосомы клетку, в результате чего можно получать экзосомы, несущие необходимые белки и РНК [87–89]. Следует отметить, что внедрение трансгена в клетку может изменять не только внутренний состав экзосомальной мембраны, но и композицию белков, экспрессируемых в ее составе. Благодаря этому в него могут включаться белки, нехарактерные для экзосомальной мембраны [90, 91]. Данный подход получил название «экзосомальный дисплей» и может быть использован как для отбора экзосом, несущих трансген, так и для более специфического нацеливания на клетки-мишени [85, 92].

Как уже было отмечено ранее, экзосомы играют большую роль во всех процессах развития опухоли, в том числе в формировании лекарственной устойчивости. Исследования, направленные на подавление вклада экзосом в опухолевые процессы, имеют 3 направления: 1) подавление секреции экзосом; 2) снижение эффективности поглощения экзосом клетками-реципиентами; 3) элиминация экзосом из биологических жидкостей [93].

Удаление экзосом из биологических жидкостей может происходить путем использования антител против характерных для экзосом тетраспанинов CD9 и CD63; также показана возможность удаления из циркуляции экзосом, несущих в своем составе TGF- β [94, 95]. Примером снижения эффективности поглощения экзосом клетками-реципиентами является использование антител против CD9 [96]. В работе Z. Wei и соавт. показано, что экзосомы с гиперэкспрессией CD47 не способны эффективно связываться с макрофагами и осуществлять воздействие на иммунную систему [97]. К сожалению, на данный момент в литературе отсутствует информация об эффективных способах снижения уровня секреции экзосом, что, по-видимому, связано с недостаточной изученностью механизмов секреции [98].

Таким образом, несмотря на большое число спекуляций в литературе, разработка векторной доставки лекарственных препаратов на основе экзосом до сих пор находится в зародышевом состоянии. Вероятно, это связано со сложностью разработки как продуцентов векторов, так и методов селективного отбора экзосом, несущих необходимый терапевтический агент. Активно развивающиеся молекулярно-биологические методы и повышенный интерес к экзосомам как новым терапевтическим агентам не оставляют сомнений в появлении в ближайшие 5 лет эффективных стратегий противоопухолевой терапии, увеличивающих качество и продолжительность жизни онкологических больных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на эффективность инструментальных методов диагностики РМЖ, существует ряд ограничений в выявлении новообразования на I стадии и *in situ*, дифференциации доброкачественных и злокачественных новообразований, скрининге здоровых женщин и онкологических больных после курсов терапии. Одним из наиболее перспективных подходов к поиску маркеров РМЖ методами жидкой биопсии является анализ опухолевых белков, входящих в состав экзосом крови. Активно развивающиеся методы молекулярной биологии уже сегодня закладывают базу для создания новых методов снижения опухолевой диссеминации на молекулярном уровне.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Тамкович С.Н., Юнусова Н.В., Стахеева М.Н. Выделение и характеристика экзосом плазмы крови больных раком молочной железы и колоректальным раком. Биомедицинская химия 2017;165–9. DOI: 10.18097/PBMC20176302165
Tamkovich S.N., Yunusova N.V., Stakheeva M.N. Isolation and characterization of plasma exosomes of patients with breast cancer and colorectal cancer. Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry 2017;165–9. (In Russ.). DOI: 10.18097/PBMC20176302165
2. Шефер А.А. Экзосомы карциномы молочной железы: оценка опухолевого потенциала в системе *in vivo* и идентификация белков, вовлеченных в опухолевую диссеминацию. Выпускная квалификационная работа бакалавра. Новосибирск, 2022. 80 с.
Schaefer A.A. Exosomes of breast carcinoma: assessment of tumor potential in the *in vivo* system and identification of proteins involved in tumor dissemination. Bachelor's final qualifying work. Novosibirsk, 2022. 80 p. (In Russ.).

3. 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
4. Kok V.C., Yu C.-C. Cancer-derived exosomes: their role in cancer biology and biomarker development. *Int J Nanomedicine* 2020;15:8019–36. DOI: 10.2147/IJN.S272378
5. Triantafyllou A., Gazouli M., Theodoropoulos C. et al. Exosomes in breast cancer management: where do we stand? A literature review. *Biol Cell* 2022;114(4):109–22. DOI: 10.1111/boc.202100081
6. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest* 2016;126(4):1208–15. DOI: 10.1172/JCI81135
7. Bebelman M., Smith M., Pegtel M. et al. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol Ther* 2018;188:1–11. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.02.013
8. Tenchov R., Sasso M.J., Wang X. et al. Exosomes – nature's lipid nanoparticles, a rising star in drug delivery and diagnostics. *ACS Nano* 2022;16(11):17802–46. DOI: 10.1021/acsnano.2c08774
9. Huotari J., Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J* 2011;30(17):3481–500. DOI: 10.1038/emboj.2011.286
10. Ren X., Hurley J.H. VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *EMBO J* 2010;29(6):1045–54. DOI: 10.1038/emboj.2010.6
11. Wollert T., Yang D., Ren X. et al. The ESCRT machinery at a glance. *J Cell Sci* 2009;122(Pt. 13):2163–6. DOI: 10.1242/jcs.029884
12. Ostrowski M., Carmo B.N., Krumeich S. et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 2010;12(1):19–30. DOI: 10.1038/ncb2000
13. Wei D., Zhan W., Gao Y. et al. RAB31 marks and controls an ESCRT-independent exosome pathway. *Cell Res* 2021;31(7):157–77. DOI: 10.1038/s41422-020-00409-1
14. Trajkovich K., Hsu C., Chiantia S. et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 2008;319(5867):1244–7. DOI: 10.1126/science.1153124
15. Nonaka T., Wong D.T.W. Saliva-exosomics in cancer: molecular characterization of cancer-derived exosomes in saliva. *Enzymes* 2017;42:125–51. DOI: 10.1016/bs.enz.2017.08.002
16. Zhang J., Lui S.-C., Luo X.-H. et al. Exosomal long noncoding RNAs are differentially expressed in the cervicovaginal lavage samples of cervical cancer patients. *J Clin Lab Anal* 2016;30(6):1116–21. DOI: 10.1002/jcla.21990
17. Tamkovich S.N., Tutanov O.S., Laktionov P.P. Exosomes: generation, structure, transport, biological activity, and diagnostic application. *Biochem Suppl Ser A Membr Cell Biol* 2016;10(3):163–73. DOI: 10.1134/S1990747816020112
18. Григорьева А.Е., Тамкович С.Н., Еремина А.В. и др. Экзосомы слезной жидкости здоровых людей: выделение, идентификация и характеристика. *Биомедицинская химия* 2016;62(1):99–106. Grigorieva A.E., Tamkovich S.N., Eremina A.V. et al. Exosomes of lacrimal fluid of healthy people: isolation, identification and characterization. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry* 2016;62(1):99–106. (In Russ.).
19. 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
20. Dong X., Bai X., Ni J. et al. Exosomes and breast cancer drug resistance. *Cell Death Dis* 2020;11(11):987. DOI: 10.1038/s41419-020-03189-z
21. Tamkovich S., Tutanov O., Efimenko A. et al. Blood circulating exosomes contain distinguishable fractions of free and cell-surface-associated vesicles. *Curr Mol Med* 2019;19(4):273–85. DOI: 10.2174/1566524019666190314120532
22. Bonifácio V.D.B. Ovarian cancer biomarkers: moving forward in early detection. *Adv Exp Med Biol* 2020;1219:355–63. DOI: 10.1007/978-3-030-34025-4_18
23. Kuang Y., Peng C., Dong Y. et al. NADH dehydrogenase subunit 1/4/5 promotes survival of acute myeloid leukemia by mediating specific oxidative phosphorylation. *Mol Med Rep* 2022;25(6):195. DOI: 10.3892/mmr.2022.12711
24. Justo B.L., Jasiulionis M.G. Characteristics of TIMP1, CD63, and β 1-integrin and the functional impact of their interaction in cancer. *Int J Mol Sci* 2021;22(17):9319. DOI: 10.3390/ijms22179319
25. Qin Y., Shembrey C., Smith J. et al. Laminin 521 enhances self-renewal via STAT3 activation and promotes tumor progression in colorectal cancer. *Cancer Letters* 2020;476:161–9. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.02.026
26. Zhang T., Sun L., Hao Y. et al. ENO1 suppresses cancer cell ferroptosis by degrading the mRNA of iron regulatory protein 1. *Nat Cancer* 2022;3(1):75–89. DOI: 10.1038/s43018-021-00299-1
27. Hong J., Guo F., Lu S.-Y. et al. *F. nucleatum* targets lncRNA ENO1-IT1 to promote glycolysis and oncogenesis in colorectal cancer. *Gut* 2021;70(11):2123–37. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-322780
28. Li H.-J., Ke F.-Y., Lin C.-C. et al. ENO1 promotes lung cancer metastasis via HGFR and WNT signaling-driven epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2021;81(15):4094–09. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-3543
29. Park M.K., Zhang L., Min K.-W. et al. NEAT1 is essential for metabolic changes that promote breast cancer growth and metastasis. *Cell Metab* 2021;33(12):2380–97. DOI: 10.1016/j.cmet.2021.11.011
30. Lan Z., Yao X., Sun K. et al. The Interaction between lncRNA SNHG6 and hnRNPA1 contributes to the growth of colorectal cancer by enhancing aerobic glycolysis through the regulation of alternative splicing of PKM. *Front Oncol* 2020;10:363. DOI: 10.3389/fonc.2020.00363
31. Nie H., Ju H., Fan J. et al. O-GlcNAcylation of PGK1 coordinates glycolysis and TCA cycle to promote tumor growth. *Nat Commun* 2020;11(1):36. DOI: 10.1038/s41467-019-13601-8
32. Huang C., Shen Q., Song G. et al. Downregulation of PARVA promotes metastasis by modulating integrin-linked kinase activity and regulating MAPK/ERK and MLC2 signaling in prostate cancer. *Transl Androl Urol* 2021;10(2):915–28. DOI: 10.21037/tau-21-108
33. Tong X.-Y., Yang X.-Z., Gao S.-Q. et al. Regulating effect of cytochrome b5 overexpression on human breast cancer cells. *Molecules* 2022;27(14):4556. DOI: 10.3390/molecules27144556
34. Laulagnier K., Motta C., Hamdi S. et al. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J* 2004;380(Pt. 1):161–71. DOI: 10.1042/BJ20031594
35. Choi D.-S., Kim D.-K., Kim Y.-K. et al. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics* 2013;13(10–11):1554–71. DOI: 10.1002/pmic.201200329
36. Llorente A., Skotland T., Sylvänne T. et al. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831(7):1302–9. DOI: 10.1016/j.bbalip.2013.04.011
37. Carayon K., Chaoui K., Ronzier E. et al. Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation. *J Biol Chem* 2011;286(39):34426–39. DOI: 10.1074/jbc.M111.257444
38. Beloribi S., Ristorcelli E., Breuzard G. et al. Exosomal lipids impact notch signaling and induce death of human pancreatic tumoral SOJ-6 cells. *PLoS One* 2012;7(10):e47480. DOI: 10.1371/journal.pone.0047480
39. Wang G., Dinkins M., He Q. et al. Astrocytes secrete exosomes enriched with proapoptotic ceramide and prostate apoptosis response 4 (PAR-4): potential mechanism of apoptosis induction in Alzheimer disease (AD). *J Biol Chem* 2012;287(25):21384–95. DOI: 10.1074/jbc.M112.340513
40. Rak J. Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemost* 2010;36(8):888–906. DOI: 10.1055/s-0030-1267043
41. Balaj L., Lessard R., Cho Y.-J. et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* 2011;2:180. DOI: 10.1038/ncomms1180
42. Tutanov O., Shtam T., Tupkin A. et al. Blood plasma exosomes contain circulating DNA in their crown. *Diagnostics (Basel)* 2022;12(4):854. DOI: 10.3390/diagnostics12040854

43. Xie Y., Dang W., Zhang S. et al. The role of exosomal noncoding RNAs in cancer. *Mol Cancer* 2019;18(1):37. DOI: 10.1186/s12943-019-0984-4
44. Eldh M., Ekstrom K., Valadi H. et al. Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. *PLoS One* 2010;5(12):e15353. DOI: 10.1371/journal.pone.0015353
45. O'Brien K., Rani S., Corcoran C. et al. Exosomes from triple-negative breast cancer cells can transfer phenotypic traits representing their cells of origin to secondary cells. *Eur J Cancer* 2013;49(8):1845–59. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.01.017
46. Ding G., Zhou L., Qian Y. et al. Pancreatic cancer-derived exosomes transfer miRNAs to dendritic cells and inhibit RFXAP expression via miR-212-3p. *Oncotarget* 2015;6(30):29877–88. DOI: 10.18632/oncotarget.4924
47. Ying X., Wu Q., Wu X. et al. Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages. *Oncotarget* 2016;7(28):43076–87. DOI: 10.18632/oncotarget.9246
48. Hood J.L., San R.S., Wickline S.A. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* 2011;71(11):3792–801. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4455
49. Бейерли О.А., Гареев И.Ф., Павлов В.Н. Экзосомальные длинные некодирующие РНК как биомаркеры и терапевтические мишени при раке. *Креативная хирургия и онкология* 2019;9(4):297–304. DOI: 10.24060/2076-3093-2019-9-4-297-304
50. Bayerli O.A., Gareev I.F., Pavlov V.N. Exosomal long non-coding RNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Kreativnaya khirurgiya i onkologiya = Creative Surgery and Oncology* 2019;9(4):297–304. (In Russ.). DOI: 10.24060/2076-3093-2019-9-4-297-304
51. Harris D.A., Patel S.H., Gucek M. et al. Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement. *PLoS One* 2015;10(3):e0117495. DOI: 10.1371/journal.pone.0117495
52. Boucheix C., Duc G.H., Jasmin C. et al. Tetraspanins and malignancy. *Expert Rev Mol Med* 2001;2001:1–17. DOI: 10.1017/S1462399401002381
53. Li K., Liu T., Chen J. et al. Survivin in breast cancer-derived exosomes activates fibroblasts by up-regulating SOD1, whose feedback promotes cancer proliferation and metastasis. *J Biol Chem* 2020;295(40):13737–52. DOI: 10.1074/jbc.RA120.013805
54. Katoh M., Katoh M. Precision medicine for human cancers with Notch signaling dysregulation (Review). *Int J Mol Med* 2020;45(2):279–97. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4418
55. Yuan X., Qian N., Ling S. et al. Breast cancer exosomes contribute to pre-metastatic niche formation and promote bone metastasis of tumor cells. *Theranostics* 2021;11(3):1429–45. DOI: 10.7150/thno.45351
56. Patwardhan S., Mahadik P., Shetty O. et al. ECM stiffness-tuned exosomes drive breast cancer motility through thrombospondin-1. *Biomaterials* 2021;279:121185. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121185
57. Jordan K.R., Hall J.K., Schedin T. et al. Extracellular vesicles from young women's breast cancer patients drive increased invasion of non-malignant cells via the focal adhesion kinase pathway: a proteomic approach. *Breast Cancer Res* 2020;22(1):128. DOI: 10.1186/s13058-020-01363-x
58. Самсонов Р.Б., Коваленко И.М., Васильев Д.А. Стимуляция метастатической активности клеток рака молочной железы экзосомами плазмы. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(2):6–15. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-6-15
59. Samsonov R.B., Kovalenko I.M., Vasiliev D.A. Stimulation of metastatic activity of breast cancer cells by plasma exosomes. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2016;15(2):6–15. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-6-15
60. Ham S., Lima L.G., Chai E.P.Z. et al. Breast cancer-derived exosomes alter macrophage polarization via gp130/STAT3 signaling. *Front Immunol* 2018;9:871. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00871
61. Mengos A.E., Gastineau D.A., Gustafson M.P. The CD14+HLA-DRlo/neg monocyte: an immunosuppressive phenotype that restrains responses to cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2019;10:1147. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01147
62. Contini P., Ghio M., Merlo A. et al. Apoptosis of antigen-specific T lymphocytes upon the engagement of CD8 by soluble HLA class I molecules is fas ligand/fas mediated: evidence for the involvement of p56 lck, calcium calmodulin kinase II, and calcium-independent protein kinase C signaling pathways and for NF-κB and NF-AT nuclear translocation. *J Immunol* 2005;175(11):7244–54. DOI: 10.4049/jimmunol.175.11.7244
63. Tian X., Shen H., Li Z. et al. Tumor-derived exosomes, myeloid-derived suppressor cells, and tumor microenvironment. *J Hematol Oncol* 2019;12(1):84. DOI: 10.1186/s13045-019-0772-z
64. Farhood B., Najafi M., Mortezaee K. CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: a review. *J Cell Physiol* 2019;234(6):8509–21. DOI: 10.1002/jcp.27782
65. Cameron D., Piccart-Gebhart M.J., Gelber R.D. et al. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *Lancet* 2017;389(10075):1195–205. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32616-2
66. Ciravolo V., Huber V., Ghedini G.C. et al. Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *J Cell Physiol* 2012;227(2):658–67. DOI: 10.1002/jcp.22773
67. Semina S.E., Scherbakov A.M., Vnukova A.A. et al. Exosome-mediated transfer of cancer cell resistance to antiestrogen drugs. *Molecules* 2018;23(4):829. DOI: 10.3390/molecules23040829
68. Andreeva O.E., Sorokin D.V., Mikhaevich E.I. et al. Towards unravelling the role of ERα-targeting miRNAs in the exosome-mediated transferring of the hormone resistance. *Molecules* 2021;26(21):6661. DOI: 10.3390/molecules26216661
69. Семина С.Е., Руденская Е.А., Миттенберг А.Г. и др. Экзосомы и развитие резистентности опухолевых клеток к метформину: пилотное исследование. *Успехи молекулярной онкологии* 2017;4(3):92–8. DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-92-98
70. Semina S.E., Rudenskaya E.A., Mittenberg A.G. et al. Exosomes and development of cancer cell resistance to metformin: pilot study. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2017;4(3):92–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-92-98
71. Chanteloup G., Cordonnier M., Isambert N. et al. Monitoring HSP70 exosomes in cancer patients' follow up: a clinical prospective pilot study. *J Extracell Vesicles* 2020;9(1):1766192. DOI: 10.1080/20013078.2020.1766192
72. Melo S.A., Luecke L.B., Kahlert C. et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 2015;523(7559):177–82. DOI: 10.1038/nature14581
73. Wang X., Zhong W., Bu J. et al. Exosomal protein CD82 as a diagnostic biomarker for precision medicine for breast cancer. *Mol Carcinog* 2019;58(5):674–85. DOI: 10.1002/mc.22960
74. Tutanov O., Orlova E., Proskura K. et al. Proteomic analysis of blood exosomes from healthy females and breast cancer patients reveals an association between different exosomal bioactivity on non-tumorigenic epithelial cell and breast cancer cell migration *in vitro*. *Biomolecules* 2020;10(4):495. DOI: 10.3390/biom10040495
75. Тутанов О.С., Бакакина Ю.С., Проскура К.В. и др. Поиск протеомных маркеров рака молочной железы в составе суммарных экзосом крови. *Сибирский онкологический журнал* 2020;19(2):49–61. DOI: 10.21294/1814-4861-2020-19-2-49-61
76. Tumanov O.S., Bakakina Yu.S., Proskura K.V. et al. Search for proteomic markers of breast cancer in the composition of total blood exosomes. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2020;19(2):49–61. DOI: 10.21294/1814-4861-2020-19-2-49-61
77. Sipeng L., Xinya L., Hao P. et al. Proteomic landscape of exosomes reveals the functional contributions of CD151 in triple-negative breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 2021;20:100121. DOI: 10.1016/j.mcpro.2021.100121

74. Vardaki I., Ceder S., Rutishauser D. et al. Periostin is identified as a putative metastatic marker in breast cancer-derived exosomes. *Oncotarget* 2016;7(46):74966–78. DOI: 10.18632/oncotarget.11663
75. Rupp A.-K., Rupp C., Keller S. et al. Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: Role of proteolytic cleavage. *Gynecol Oncol* 2011;122(2):437–46. DOI: 10.1016/j.ygyno.2011.04.035
76. Hoshino A., Kim S.H., Bojman L. et al. Extracellular vesicle and particle biomarkers define multiple human cancers. *Cell* 2020;182(4):1044–61.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2020.07.009
77. Toth B., Nieuwland R., Liebhardt S. et al. Circulating microparticles in breast cancer patients: a comparative analysis with established biomarkers. *Anticancer Res* 2008;28(2A):1107–12.
78. Sancho-Albero M., Navascues N., Mendoza G. et al. Exosome origin determines cell targeting and the transfer of therapeutic nanoparticles towards target cells. *J Nanobiotechnol* 2019;7(1):16. DOI: 10.1186/s12951-018-0437-z
79. Hazan-Halevy I., Rosenblum D., Weinstein S. et al. Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes. *Cancer Lett* 2015;364(1):59–69. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.04.026
80. Yue S., Ye X., Zhou T. et al. PGRN-/- TAMs-derived exosomes inhibit breast cancer cell invasion and migration and its mechanism exploration. *Life Sci* 2021;264:118687. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118687
81. Gong C., Tian J., Wang Z. et al. Functional exosome-mediated co-delivery of doxorubicin and hydrophobically modified microRNA 159 for triple-negative breast cancer therapy. *J Nanobiotechnology* 2019;17(1):93. DOI: 10.1186/s12951-019-0526-7
82. Yu M., Gai C., Li Z. et al. Targeted exosome-encapsulated erastin induced ferroptosis in triple negative breast cancer cells. *Cancer Sci* 2019;110(10):3173–82. DOI: 10.1111/cas.14181
83. Weaver W. J., Zhang J., Rojas J. et al. The application of exosomes in the treatment of triple-negative breast cancer. *Front Mol Biosci* 2022;9:1022725. DOI: 10.3389/fmolb.2022.1022725
84. Vakhshiteh F., Atiyabi F., Ostad N.S. Mesenchymal stem cell exosomes: a two-edged sword in cancer therapy. *Int J Nanomedicine* 2019;14:2847–59. DOI: 10.2147/IJN.S200036
85. Goh J.W., Zou S., Lee K.C. et al. EXOPLEXs: chimeric drug delivery platform from the fusion of cell-derived nanovesicles and liposomes. *Biomacromolecules* 2018;19(1):22–30. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b01176
86. Katakowski M., Buller B., Zheng X. et al. Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer Lett* 2013;335(1):201–4. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.02.019
87. Bolukbasi F.M., Mizrak A., Ozdener B.G. et al. miR-1289 and “Zipcode”-like sequence enrich mRNAs in microvesicles. *Mol Ther Nucleic Acids* 2012;1(2):e10. DOI: 10.1038/mtna.2011.2
88. Riazifar M., Pone J.E., Lotvall J. et al. Stem cell extracellular vesicles: extended messages of regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2017;57:125–54. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-061616-030146
89. Tian Y., Li S., Song J. et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* 2014;11(3):2383–90. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.083
90. Naseri Z., Oskuee K.R., Jaafari R.M. et al. Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-142-3p inhibitor reduces tumorigenicity of breast cancer in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine* 2018;13:7727–47. DOI: 10.2147/IJN.S182384
91. Hung E.M., Leonard N.J. Stabilization of exosome-targeting peptides via engineered glycosylation. *J Biol Chem* 2015;290(13):8166–72. DOI: 10.1074/jbc.M114.621383
92. Kosaka N., Yoshioka Y., Tominaga N. et al. Dark side of the exosome: the role of the exosome in cancer metastasis and targeting the exosome as a strategy for cancer therapy. *Future Oncol* 2014;10(4):671–81. DOI: 10.2217/fon.13.222
93. Nishida-Aoki N., Tominaga N., Takeshita F. et al. Disruption of circulating extracellular vesicles as a novel therapeutic strategy against cancer metastasis. *Mol Ther* 2017;25(1):181–91. DOI: 10.1016/j.ymthe.2016.10.009
94. Baglio R.S., Largerweij T., Perez-Lanzon M. et al. Blocking tumor-educated MSC paracrine activity halts osteosarcoma progression. *Clin Cancer Res* 2017;23(14):3721–33. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2726
95. Santos M.F., Rappa G., Karbanova J. et al. Anti-human CD9 antibody Fab fragment impairs the internalization of extracellular vesicles and the nuclear transfer of their cargo proteins. *J Cell Mol Med* 2019;23(6):4408–21. DOI: 10.1111/jcmm.14334
96. Wei Z., Chen Z., Zhao Y. et al. Mononuclear phagocyte system blockade using extracellular vesicles modified with CD47 on membrane surface for myocardial infarction reperfusion injury treatment. *Biomaterials* 2021;275:121000. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121000
97. Tominaga N. Anti-cancer role and therapeutic potential of extracellular vesicles. *Cancers (Basel)* 2021;13(24):6303. DOI: 10.3390/cancers13246303
98. Roma-Rodriguez C., Fernandes A.R., Baptista P.V. Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells. *Biomed Res Int* 2014;2014:179486. DOI: 10.1155/2014/179486
99. Alimirzaie S., Bagherzadeh M., Akbari M.R. Liquid biopsy in breast cancer: a comprehensive review. *Clin Genet* 2019;95(6):643–60. DOI: 10.1111/cge.13514

Вклад авторов

С.Н. Тамкович: обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи, редактирование;

А.А. Шефер: обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи, редактирование;

Я.А. Фрик: обзор публикаций по теме статьи, редактирование.

Authors' contribution

S.N. Tamkovich: review of publications on the topic of the article, article writing, editing;

A.A. Shefer: review of publications on the topic of the article, article writing, editing;

Ya.A. Frick: review of publications on the topic of the article, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.А. Шефер / A.A. Shefer: <https://orcid.org/0000-0001-5369-397X>

С.Н. Тамкович / S.N. Tamkovich: <https://orcid.org/0000-0001-7774-943X>

Я.А. Фрик / Ya.A. Frick: <https://orcid.org/0000-0003-0390-6580>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках проекта базового бюджетного финансирования Минобрнауки России № 121030200173-6 «Диагностика и терапия онкологических заболеваний».

Funding. The study was supported by the Russian state budget project via the Ministry of Education and Science of Russia No. 121030200173-6 “Diagnostics and therapy of oncological diseases”.

Статья поступила: 13.02.2023. **Принята к публикации:** 06.03.2023.

Article submitted: 13.02.2023. **Accepted for publication:** 06.03.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-70-77



Экспрессия лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1) при раке желудка: обзор литературы

Т.Н. Сотникова¹, Н.В. Данилова², П.Г. Мальков², Т.В. Полушкина^{1,2}

¹ГБУЗ «Городская клиническая больница им. И.В. Давыдовского Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 109240 Москва, ул. Яузская, 11;

²Медицинский научно-образовательный центр ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 53

Контакты: Татьяна Валерьевна Полушкина peperonya1173@yandex.ru

Рак желудка в настоящее время является одним из самых распространенных онкологических заболеваний, что обуславливает значимость и актуальность исследований в этой области. Ингибиторы иммунологических контрольных точек ранее продемонстрировали свою эффективность и безопасность при различных солидных опухолях, однако, что касается рака желудка, на сегодняшний день представлены неоднозначные результаты. Клетки опухоли экспрессируют лиганд запрограммированной смерти 1 (PD-L1), который связывается с рецептором запрограммированной смерти 1 (PD-1). Иммунная защита играет ключевую роль в инициации и прогрессировании заболевания. Понимание регуляторного механизма PD-L1 при раке желудка может привести к существенному прогрессу в иммунотерапии, а также способствовать адекватному отбору пациентов для лечения ингибиторами иммунологических контрольных точек. В обзоре мы провели углубленное исследование экспрессии PD-L1 и регуляторных иммуносупрессивных механизмов при раке желудка, методов оценки PD-L1-статуса, а также изучили результаты текущих клинических испытаний, в которых были рассмотрены ингибиторы иммунологических контрольных точек в комбинации с химиотерапией и без нее при данной онкологической патологии.

Ключевые слова: рак желудка, иммунные клетки, лиганд программируемой клеточной гибели 1, опухоль, рецепторы, сигнальные пути

Для цитирования: Сотникова Т.Н., Данилова Н.В., Мальков П.Г., Полушкина Т.В. Экспрессия лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1) при раке желудка: обзор литературы. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):70–7. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-70-77

Programmed death ligand 1 (PD-L1) expression in gastric cancer: literature review

T.N. Sotnikova¹, N.V. Danilova², P.G. Malkov², T.V. Polushkina^{1,2}

¹I.V. Davydovsky City Clinical Hospital of the Moscow Healthcare Department; 11 Yauzskaya St., Moscow 109240, Russia;

²Medical Scientific and Educational, Lomonosov Moscow State University; Bld. 53, 1 Leninskie Gory, Moscow 119234, Russia

Contacts: Tatiana Valeryevna Polushkina peperonya1173@yandex.ru

Gastric cancer is one of the most common oncological diseases at the present time, so research in this area is very significant and relevant. Immunological checkpoint inhibitors have previously demonstrated their effectiveness and safety in various solid tumors, however, with regard to stomach cancer, to date, ambiguous results have been presented. Tumor cells express programmed death ligand 1 (PD-L1), which binds to its programmed death receptor 1 (PD-1). Immune defense plays a key role in the initiation and progression of the disease. Understanding the regulatory mechanism of PD-L1 in gastric cancer can lead to significant progress in immunotherapy, as well as contribute to the adequate selection of patients treated with checkpoint inhibitors. In the review, we conducted an in-depth study of PD-L1 expression and regulatory immunosuppressive mechanisms in gastric cancer and methods for assessing PD-L1 status, and also studied the results of current clinical trials in which inhibitors of immunological control points were considered in combination with and without chemotherapy for this oncopathology.

Keywords: gastric cancer, immune cells, ligand of programmed cell death, tumor, programmed death ligand 1, receptors, signaling pathways

For citation: Sotnikova T.N., Danilova N.V., Malkov P.G., Polushkina T.V. Programmed death ligand 1 (PD-L1) expression in gastric cancer: literature review. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(2):70–77. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-70-77

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ) находится на 5-м месте по распространенности и на 3-м — по уровню летальности среди онкологических заболеваний в мире [1]. По данным официальной статистики по злокачественным новообразованиям (ЗНО), в Российской Федерации за последние годы распространенность РЖ составила в среднем 93–95 случаев на 100 тыс. населения [2]. Несмотря на то что показатель заболеваемости к 2018 г. снизился на 12,62 % по сравнению с 2008 г. (25,16 и 28,61 случая на 100 тыс. населения соответственно), абсолютное число новых случаев этой патологии составляет порядка 35–40 тыс. в год [3]. Принимаемые меры по активному выявлению онкологических заболеваний привели к некоторому увеличению доли ранних стадий (I–II) в общей структуре заболеваемости РЖ (с 25,1 до 35,1 % за период с 2008 по 2018 г.), однако по-прежнему значительное число его случаев диагностируется на поздних стадиях (в 2018 г. РЖ обнаружен на III и IV стадиях в 22,9 и 39,9 % случаев соответственно) [2]. Летальность в течение 1-го года после установления диагноза приближается к 50 % [2].

Прогноз при распространенном и метастатическом РЖ остается неблагоприятным: медиана выживаемости колеблется в пределах нескольких месяцев. Препараты платины в сочетании с фторпиримидинами применяются в качестве стандартной терапии 1-й линии для лечения пациентов с этими формами РЖ. При неэффективности или непереносимости данной терапии применяют доцетаксел, паклитаксел или иринотекан в качестве монотерапии, а также рамуцирумаб в качестве монотерапии или в комбинации с паклитакселом. Практически у всех пациентов с РЖ поздних стадий наблюдается прогрессирование заболевания на фоне лечения.

Поиск новых терапевтических возможностей основывается на изучении сложной биологии ЗНО, понимании тонких генетических и иммунологических механизмов их развития и прогрессирования.

МЕХАНИЗМ МОДУЛЯЦИИ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

Согласно современным представлениям, степень выраженности иммунного ответа на антиген модулируется системой стимулирующих и ингибирующих корцепторных взаимодействий. Так, для активации Т-лимфоцита, помимо связывания Т-клеточного рецептора со специфическим антигеном, требуется связывание стимулирующего корцептора CD28 с лигандом B7 на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Кроме того, активность иммунной системы контролируется системой ингибирующих корцепто-

ров, так называемых иммунологических контрольных точек (immune checkpoints, ИКТ), что необходимо для регуляции численности пролиферирующих клеточных популяций и элиминации аутореактивных клонов. Цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, CTLA-4) — ингибирующий корцептор Т-лимфоцитов — конкурирует с CD28 за лиганды на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Таким образом, адекватный иммунный ответ достигается благодаря динамическому балансу между CD28-зависимой костимулирующей активацией и CTLA-4-зависимым ингибированием пролиферации Т-лимфоцитов. В отсутствие костимулирующего сигнала CD28 наблюдается анергия лимфоцитов, а при дефекте гена CTLA-4 — неконтролируемая пролиферация цитотоксических Т-лимфоцитов.

РОЛЬ ЛИГАНДА РЕЦЕПТОРА ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ 1 В ИММУННОМ ОТВЕТЕ

Рецептор программируемой клеточной гибели 1 (programmed cell death 1, PD-1) был описан группой ученых под руководством Тасуку Хондзё (Tasuku Honjo) в ходе изучения процессов программируемой клеточной гибели в культурах лимфоидных клеток. Изначально предполагалось, что экспрессия PD-1 служит триггером апоптоза [4]. Позже было показано, что PD-1 неотъемлемо экспрессируется на поверхности Т- и В-лимфоцитов при активации этих клеток антигеном, что не всегда приводит к их гибели, в связи с чем появилась гипотеза о роли данного белка в дифференцировке иммунных клеток [5].

Благодаря структурному сходству с CTLA-4 и наличию в его цитоплазматическом домене ингибирующих тирозинсодержащих аминокислотных последовательностей ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif), PD-1 также был отнесен к ИКТ. Вскоре были открыты специфические лиганды PD-1 PD-L1 и PD-L2 (programmed cell death ligand 1 и 2) [6, 7]. Их экспрессия наблюдается в норме на поверхности клеток жизненно важных органов, в том числе сердца, легких, почек и других, что свидетельствует о роли PD-1/PD-L1-сигнального пути в поддержании периферической ауто-толерантности.

Экспрессия PD-L1 была обнаружена в клетках некоторых опухолей, в связи с чем высказано предположение о возможной роли PD-1/PD-L1-сигнального пути в ускользании опухолевых клеток из-под иммунного надзора и вместе с тем — гипотеза о возможности терапевтического применения специфических антител-блокаторов ИКТ при ряде ЗНО. Вскоре в эксперименте было показано, что при наличии

индуцированной экспрессии PD-L1 на клетках мастоцитомы мыши наблюдается быстрый инвазивный рост опухоли при сниженной цитолитической активности CD8+Т-лимфоцитов, а введение анти-PD-L1-антител приводит к существенному замедлению роста опухоли [8]. Это положило начало новому перспективному направлению в лечении ЗНО — иммунотерапии.

Степень экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках коррелирует с локальным уровнем интерферона γ (ИФН- γ) и плотностью лимфоцитарной инфильтрации, так же как и в нормальных эпителиальных и стромальных клетках при воспалении. Данная корреляция была показана не только между различными опухолями, но и в разных участках одной и той же опухоли. J.M. Taube и соавт. [9] показали, что в PD-L1+-опухолях наиболее выраженная экспрессия наблюдается в областях, инфильтрированных лимфоцитами, что свидетельствует о наличии непрерывного динамического процесса взаимодействия опухоли и иммунной системы, при котором секреция ИФН- γ эффекторными Т-лимфоцитами стимулирует экспрессию PD-L1 опухолевыми клетками. Такая экспрессия, в свою очередь, подавляет активность PD-1+-Т-лимфоцитов.

ПЕРВЫЕ ЗАРЕГИСТРИРОВАННЫЕ ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

Первым препаратом для иммунотерапии ЗНО стал ипилимумаб (ipilimumab), представляющий собой рекомбинантные человеческие моноклональные анти-CTLA-4-антитела. Специфических лигандов для CTLA-4 клетки опухолей не экспрессируют, блокирование данного сигнального пути не предполагает прямого воздействия на эти клетки и в целом подразумевает усиление эффекторной активности Т-лимфоцитов. Известно, что мыши, лишенные гена *CTLA-4*, погибают в возрасте 3–4 нед от деструктивного аутоиммунного миокардита и панкреатита [10], однако при частичной блокаде *CTLA-4* в ходе лечения ипилимумабом было показано увеличение показателей общей выживаемости или стабилизация заболевания у больных метастатической меланомой [11–14]. В связи с этим в 2011 г. данный препарат был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drug Administration) США для лечения меланомы на поздних стадиях, несмотря на развитие тяжелых иммуноассоциированных побочных реакций у 10–15 % пациентов [14].

Ниволумаб (nivolumab, человеческие моноклональные антитела) стал первым анти-PD-1-агентом, продемонстрировавшим в исследовании, завершенном в 2012 г., клиническую эффективность при лечении некоторых видов рака, в том числе меланомы, почечно-клеточного рака и немелкоклеточного рака легкого [15]. Интерес представляет то, что среди пациентов, у которых наблюдался объективный ответ на терапию ингибиторами ИКТ, продолжительность

эффекта значительно превысила период полувыведения препаратов. Больше 2 лет прожили 18 % пациентов, получавших ипилимумаб, тогда как в группе контроля — только 5 % [14]. Продолжительность объективного ответа >1 года после курса ниволумаба наблюдалась также у 20 из 31 длительно наблюдаемых больных [15]. О ресенсибилизирующем воздействии иммунотерапии на иммунную систему свидетельствует также нередко отсроченное наступление эффекта, вплоть до 6 мес после лечения [16].

Ниволумаб был одобрен FDA для лечения меланомы на поздней стадии онкологического процесса 22 декабря 2014 г. В дальнейшем на основании ряда крупных клинических исследований, показавших высокую частоту объективного ответа и статистически значимое увеличение общей выживаемости, применение нескольких ингибиторов PD-1/PD-L1 было одобрено для лечения многих солидных опухолей, меланомы и лимфомы, нечувствительных к общепринятым схемам химиотерапии.

Мишенью для каждого из препаратов являются разные эпитопы PD-1/PD-L1, что определяет различия в их иммуногенных профилях и терапевтических диапазонах. Ниволумаб и пембролизумаб одобрены для лечения распространенного и метастатического РЖ при неэффективности химиотерапии.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ЛИГАНДА РЕЦЕПТОРА ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТЧНОЙ ГИБЕЛИ 1

Исследования, посвященные поиску возможных биомаркеров эффективности иммунотерапии, показали большую вероятность ответа при положительной экспрессии PD-L1 в различных солидных опухолях [17]. Однако данные клинических исследований свидетельствуют о неоднозначной прогностической ценности PD-L1 в связи с высокой гетерогенностью экспрессии, в том числе в зависимости от ранее проведенного лечения. Недостаток надежности PD-L1 в качестве биомаркера усугубляется большим количеством способов выявления экспрессии и методик оценки и классификации PD-L1-статуса. Один и тот же клон антител может иметь разную способность обнаруживать экспрессию PD-L1 в клетках различных видов опухолей, в свою очередь, различные клоны демонстрируют разные паттерны окрашивания в одной и той же опухоли. Интенсивность окрашивания способна варьировать в рамках даже 1 клинического случая. Неоднородность экспрессии затрудняет выбор наиболее репрезентативного участка опухоли для проведения иммуногистохимического исследования. В большинстве случаев для определения PD-L1-статуса при РЖ используется материал центральной части первичной опухоли, однако есть работы, в которых экспрессию PD-L1 наблюдали преимущественно в области инвазивного фронта опухоли [18]. Экспрессия, обнаруженная в биопсийном материале, может не отражать

PD-L1-статуса опухоли в целом, быть неодинаковой в первичной и рецидивной опухолях, множественных опухолях, метастазах [19].

Существует довольно большое количество коммерческих тест-систем, предназначенных для иммуногистохимического определения экспрессии PD-L1 в опухолях. Все они относятся к одной из двух принципиально отличающихся категорий: тест-системы для сопровождающей диагностики и тест-системы для комплементарной диагностики. Классически положительный результат сопровождающего диагностического теста является необходимым условием для назначения определенного препарата, поскольку в случае отрицательного результата его применение может способствовать прогрессированию заболевания. В ситуациях применения тест-системы для комплементарной диагностики отрицательный результат не должен служить противопоказанием к лечению данным препаратом. В этом случае положительный результат может быть лишь предиктором большей вероятности положительного ответа на такую терапию.

Сегодня разработка диагностических тест-систем для определения PD-L1-статуса опухолей ведется в основном в кооперации с производителями тех или иных лекарственных средств, а тестирование их чувствительности и специфичности проводится в рамках клинических исследований соответствующего препарата. Таким образом, сопровождающей тест-системой для определения экспрессии PD-L1 в качестве биомаркера эффективности конкретного препарата на сегодняшний день считается определенный клон анти-PD-L1-антител с конкретными набором реагентов и методикой применения, апробированный в клинических исследованиях и показавший прогностическую ценность.

Первая тест-система, одобренная FDA для сопровождающей диагностики экспрессии PD-L1 (PD-L1 IHC 22C3 PharmDx, Dako, США), разрабатывалась параллельно с изучением эффективности пембролизумаба для лечения немелкоклеточного рака легкого в клиническом исследовании I фазы Keynote-001 [20]. Тестирование системы проводилось на диагностическом материале пациентов, включенных в исследование при известном исходе лечения.

При разработке системы концентрация антител (клон 22C3, Dako, США) и время инкубации для каждого реагента подбирались таким образом, чтобы свести к минимуму неспецифическое окрашивание гистологических препаратов [21]. Критерием положительного PD-L1-статуса было выбрано полное циркулярное или частичное окрашивание мембраны клеток интенсивностью от слабой (1+) до выраженной (3+).

МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ЛИГАНДА РЕЦЕПТОРА ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ 1

Были исследованы несколько методик оценки PD-L1-статуса опухоли и их корреляция с эффектив-

ностью лечения: 1) определение процента опухолевых клеток, демонстрирующих окрашивание любой интенсивности (Proportion Score 1, PS1); 2) определение процента опухолевых клеток, демонстрирующих умеренное или выраженное окрашивание (PS2); 3) определение процента опухолевых клеток, демонстрирующих только выраженное окрашивание (PS3) и 4) гистохимический индекс (Histochemical Score, HS) — сумма PS1, PS2 и PS3.

Несмотря на то что несколько лучшие результаты были получены с использованием HS, эта методика сложна для использования в рутинной клинической практике. В связи с этим для дальнейшей разработки тест-системы был выбран наиболее простой метод оценки PD-L1-статуса опухоли — PS1, в дальнейшем получивший название Tumor Proportion Score (TPS). На основании ROC-анализа пороговым значением положительного PD-L1-статуса в этом исследовании был выбран $PS \geq 50\%$.

Экспрессия PD-L1 наблюдалась в опухолевых и иммунных клетках. Скопления иммунных клеток часто наблюдаются на границе между опухолью и здоровыми тканями, а также в опухолевой строме, образуя характерные пограничный или стромальный варианты окрашивания. Пограничное и стромальное окрашивание расценивалось по принципу есть/нет.

В конечном счете окрашенные иммунные клетки, инфильтрирующие опухоль, также как и стромальное и пограничное окрашивание, были исключены из определения PD-L1-статуса опухоли по ряду причин: 1) окрашивание иммунных клеток не увеличивало количества PD-L1-положительных случаев; 2) иммунные клетки были представлены преимущественно макрофагами; 3) экспрессия PD-L1 характерна для макрофагов, в том числе в здоровых тканях; 4) присутствие истинно опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов при немелкоклеточном раке легких незначительно [22].

В исследовании Keynote-012 [23] экспрессию PD-L1 определяли отдельно для опухолевых (TPS) и иммунных (Mononuclear Immune Cell Density Score, MIDS, показатель плотности инфильтрации мононуклеарными иммунными клетками — отношение числа окрашенных иммунных клеток к общему числу опухолевых клеток, умноженное на 100) клеток. Mononuclear Immune Cell Density Score отражает степень инфильтрации опухолевой ткани PD-L1+-иммунными клетками. На практике этот показатель чаще оценивается по шкале от 0 до 4: MIDS0 означает отсутствие окрашивания иммунных клеток, MIDS1 — присутствие в препарате PD-L1+-иммунных клеток в количестве, не достигающем уровня MIDS2. Критерием положительного PD-L1-статуса опухоли является MIDS2, что соответствует наличию 1 PD-L1+-иммунной клетки на 100 опухолевых клеток. Пороговыми значениями для MIDS3 и MIDS4 являются 10 и 100 PD-L1+-иммунных клеток на 100 опухолевых клеток соответственно.

Tumor Proportion Score рассчитывается по формуле:

$$TPS = \frac{\text{Количество PD-L1+ опухолевых клеток}}{\text{Общее количество опухолевых клеток}} \times 100.$$

Mononuclear Immune Cell Density Score вычисляется по формуле:

$$MIDS = \frac{\text{Количество PD-L1+ иммунных клеток}}{\text{Общее количество опухолевых клеток}} \times 100.$$

С учетом того что и TPS, и MIDS математически представляют собой частное с одинаковым знаменателем, эти показатели были объединены в один комбинированный показатель для оценки PD-L1-статуса (Combined Positive/Positivity Score, CPS), который рассчитывается по формуле:

$$CPS = \frac{\text{Количество PD-L1+ клеток (опухолевых, лимфоцитов, макрофагов)}}{\text{Общее количество опухолевых клеток}} \times 100.$$

Умножение на 100 было добавлено для того, чтобы избежать дробных значений показателя. Таким образом, например, для препарата, в котором на 100 опухолевых клеток приходится 1 PD-L1+-опухолевая или иммунная клетка, CPS будет равен 1, а не 0,01. В качестве максимального значения CPS принято считать 100. В некоторых публикациях можно встретить показатель CPS в процентах по аналогии с TPS, что не изменяет его сути [24].

Показатель удобен: для его оценки не требуется изучать препарат при разных увеличениях (при небольшом увеличении бывает довольно сложно морфологически отличить клетки низкодифференцированной аденокарциномы от макрофагов, которые в равной степени способны экспрессировать PD-L1 на своей поверхности) и не зависит от архитектуры тканей, как в случае определения экспрессии PD-L1 иммунными клетками по площади. Выявление PD-L1-статуса опухоли методом CPS избавляет от необходимости выбирать между экспрессией PD-L1 опухолевыми или иммунными клетками в качестве возможного биомаркера эффективности иммунотерапии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОТЕРАПИИ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

В мультикогортном исследовании Keynote-059 [25, 26] частота и продолжительность объективного ответа больных РЖ и раком гастроэзофагеального перехода при лечении пембролизумабом были достоверно выше при положительной экспрессии PD-L1 с уровнем CPS ≥ 1 . Преимущество оценки PD-L1-статуса методом CPS по сравнению с TPS при РЖ было показано в исследовании KEYNOTE-059: при пороговом значении CPS ≥ 1 метод позволил выявить 57,6 % опухолей, при этом объективный ответ на терапию пембролизумабом

оказался достоверно ассоциирован с положительным PD-L1-статусом опухоли. Опухоли с TPS ≥ 1 % (12,5 %) не были достоверно ассоциированы с благоприятным исходом лечения [24].

На основании данных исследований [21, 25, 26] пембролизумаб был одобрен FDA [30] в США, а затем и в России в качестве терапии 2-й и более поздних линий для лечения распространенного и метастатического РЖ, рефрактерного к химиотерапии, у пациентов с положительным PD-L1-статусом опухоли в соответствии с протоколами сопроводительной терапии (PD-L1 IHC 22C3 PharmDx, Dako, США; CPS ≥ 1).

В дальнейших исследованиях эффективности иммунотерапии при РЖ (Keynote-061 [27]) не было показано преимуществ применения пембролизумаба по сравнению с паклитакселом у пациентов с CPS ≥ 1 , однако в группе больных с CPS ≥ 10 наблюдался более продолжительный ответ на лечение. Аналогично в Keynote-062 [28] сходные результаты были получены при сравнении пембролизумаба и стандартных химиотерапевтических схем в качестве терапии 1-й линии, применяемых у пациентов с CPS ≥ 1 , однако клинически значимое улучшение показателей общей выживаемости наблюдали у пациентов с CPS ≥ 10 .

Помимо данных клинических исследований, O'Malley и соавт. [29] изучили результаты рутинного определения экспрессии PD-L1 в различных опухолях в крупной референсной лаборатории и отметили, что доля положительных тестов при РЖ возрастает с 50,3 % при оценке методом TPS до 83,6 % при оценке методом CPS (22C3). K. Yamashita и соавт. [30] в 39 (20,4 %) случаях из 191 выявили положительный PD-L1-статус опухоли на основании TPS и в 137 (71,7 %) случаях – на основании CPS.

Клинические исследования эффективности использования ниволумаба у больных РЖ [31, 32] также не показали зависимости между успехом лечения и PD-L1-статусом, определявшимся методом TPS (PD-L1 IHC 28–8 PharmDx, Dako, США). Поскольку РЖ является одной из лидирующих причин смерти среди азиатского населения, а результаты терапии оказались весьма обнадеживающими, этот препарат был одобрен для лечения РЖ в Японии вне зависимости от PD-L1-статуса опухоли, а тест-система PD-L1 IHC 28–8 PharmDx (Dako, США) одобрена для комбинированной диагностики.

Для адекватной оценки экспрессии PD-L1, по мнению большинства производителей тест-систем, необходимо наличие в препарате как минимум 100 жизнеспособных опухолевых клеток. Положительным PD-L1-статус считается при мембранном (линейном) окрашивании опухолевых клеток любой степени интенсивности, необязательно на всем протяжении мембраны. Гранулярное окрашивание цитоплазмы опухолевых клеток при оценке экспрессии PD-L1 не учитывается.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ЛИГАНДА РЕЦЕПТОРА ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ 1 НА СЕГОДНЯШНИЙ ДЕНЬ

В настоящее время не утверждено единой методики определения уровня экспрессии PD-L1 при РЖ. С одной стороны, требования к сопровождающей диагностике при назначении того или иного препарата направлены на повышение воспроизводимости получаемых результатов исследования экспрессии PD-L1, а с другой — они ограничивают доступность данного вида диагностики для лабораторий разного уровня и, соответственно, возможность лечения пациентов.

В 2018 г. J. Ma и соавт. опубликовали результаты исследования [33], в котором ретроспективно сравнивали экспрессию PD-L1 в препаратах РЖ, окрашенных с использованием 3 тест-систем: SP142 (Ventana, США), 28–8 (Dako, США) и E1L3N (Cell Signaling Technology, США). Срезы были получены из операционного материала 315 пациентов с РЖ I–III стадии, не получавших ранее какого-либо лечения. Экспрессия PD-L1 в каждом случае оценивалась 3 методами: в клетках опухоли (процент опухолевых клеток, демонстрирующих мембранное окрашивание любой степени интенсивности), иммунных клетках (процент площади опухоли (включая прилежащую строму), занятой окрашенными иммунными клетками) и среди всех клеток (процент окрашенных опухолевых/иммунных клеток от общего числа клеток).

Тест-система E1L3N показала низкую способность окрашивать препараты РЖ. Экспрессия PD-L1 $>1\%$ (среди всех клеток) наблюдалась в 38,73 и 33,65 % случаев при окрашивании SP142 и 28–8 соответственно, при этом SP142 демонстрировал большую способность окрашивать иммунные клетки по сравнению с 28–8: 18,41 и 7,62 % соответственно (с пороговым значением положительного ответа $>1\%$ по площади). Экспрессия PD-L1 $>5\%$ (среди всех клеток) при окрашивании SP142 была ассоциирована с наихудшим прогнозом в данной группе наблюдений.

В настоящее время готовятся к публикации результаты первого анализа взаимозаменяемости тест-систем 22C3 (Dako, США) и SP263 (Ventana, США) для оценки PD-L1-статуса при РЖ, проведенного Y. Park и соавт. [34]. В исследование были включены 379 пациентов с РЖ II–III стадии без предшествующей химиотерапии. Отдельно изучались образцы из центра опухоли и области ее инвазивного края.

При использовании SP263 отмечалось более яркое окрашивание образцов с сильнее выраженным окрашиванием клеточных мембран. Для каждого образца были посчитаны CPS и TPS. Обе тест-системы продемонстрировали схожие, хорошо воспроизводимые результаты независимо от локализации образца и метода оценки экспрессии. Количество опухолей с положительным PD-L1-статусом при CPS >1 /TPS $>1\%$ оказалось несколько выше при использовании SP263, однако при пороговом значении CPS ≥ 10 22C3 позволил выявить больше положительных случаев. В целом в данной группе больных экспрессия PD-L1 с CPS ≥ 10 была ассоциирована с менее агрессивным характером опухоли.

Имеющиеся данные о влиянии экспрессии PD-L1 на прогноз при РЖ противоречивы. Чаще экспрессия данного маркера ассоциируется с плохим прогнозом при этой патологии [35, 36], хотя есть сообщения о хорошем [18] и нейтральном [37] значении экспрессии PD-L1 для прогноза. Кардинальные различия в оценке анализируемого показателя отчасти могут быть объяснены разными подходами к определению положительного PD-L1-статуса опухоли, а отчасти — высокой степенью гетерогенности опухолей и наличием или отсутствием предшествующего лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как справедливо отметила группа ученых [38] в 2011 г., через 13 лет после открытия его группой первого PD-L1, успехи клинического применения блокады PD-1 и PD-L1 заметно опережают наше понимание многогранных механизмов действия этого сигнального пути. Все больший объем данных свидетельствует о том, что помимо сложности морфологического строения системы ИКТ значение имеет также динамический характер взаимодействия опухоли и иммунной системы.

Очевидно, объем иммуногистохимических исследований экспрессии PD-L1 в качестве биомаркера будет увеличиваться пропорционально расширению показаний к иммунотерапии. Исследования, выполняемые в определенном, согласованном порядке с применением антител, демонстрирующих наилучшую способность выявлять экспрессию PD-L1 для данного вида опухолей, позволят уменьшить вариабельность субъективной оценки PD-L1-статуса опухоли разными специалистами и усовершенствовать отбор пациентов, наиболее перспективных в отношении эффективного применения иммунотерапии.

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

- 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
- Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. 236 с.
The state of oncological care to the population of Russia in 2018. Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, G.V. Petrova. Moscow: P.A. Herzen Moscow State Medical Research Institute — branch of the Federal State Budgetary Institution “NMIC of Radiology” of the Ministry of Health of Russia, 2019. 236 p. (In Russ.).
- Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» 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: P.A. Herzen Moscow State Medical Research Institute — branch of the Federal State Budgetary Institution “NMIC of Radiology” of the Ministry of Health of Russia, 2019. 250 p.
- Ishida Y., Agata Y., Shibahara K., Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992;11(11):3887–95. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x
- Agata Y., Kawasaki A., Nishimura H. et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 1996;8(5):765–72. DOI: 10.1093/intimm/8.5.765
- Nishimura H., Nose M., Hiai H. et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999;11(2): 141–51. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80089-8
- Freeman B.G.J., Long A.J., Iwai Y. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000;192(7):1028–34. DOI: 10.1084/jem.192.7.1027
- Iwai Y., Ishida M., Tanaka Y. T. Okazaki et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(19):12293–7. DOI: 10.1073/pnas.192461099
- Taube J.M., Anders R.A., Young G.D. et al. Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 2012;4(127):127ra37. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003689
- Tivol E.A., Borriello F., Schweitzer A.N. et al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995;3(5):541–7. DOI: 10.1016/1074-7613(95)90125-6
- Weber J., Thompson J.A., Hamid O. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II study comparing the tolerability and efficacy of ipilimumab administered with or without prophylactic budesonide in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Clin Cancer Res* 2009;15(17):5591–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1024
- Wolchok J.D., Neyns B., Linette G. et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol* 2010;11(2):155–64. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70334-1
- O’Day S.J., Maio M., Chiarion-Sileni V. et al. Efficacy and safety of ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a multicenter single-arm phase II study. *Ann Oncol* 2010;21(8):1712–7. DOI: 10.1093/annonc/mdq013
- Hodi F.S., O’Day S.J., McDermott D.F. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(8):711–23. DOI: 10.1056/NEJMoa1003466
- Topalian S.L., Hodi F.S., Brahmer J.R. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2443–54. DOI: 10.1056/NEJMoa1200690
- Fuchs C.S., Doi T., Jang R.W. et al. Safety and efficacy of pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated advanced gastric and gastroesophageal junction cancer: phase 2 clinical KEYNOTE-059 trial. *JAMA Oncol* 2018;4(5):e180013. DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.0013
- Ott P.A., Bang Y.-J., Piha-Paul S.P. et al. T-cell-inflamed gene-expression profile, programmed death ligand 1 expression, and tumor mutational burden predict efficacy in patients treated with pembrolizumab across 20 cancers: KEYNOTE-028. *J Clin Oncol* 2019;37(4):318–27. DOI: 10.1200/JCO.2018.78.2276
- Böger C., Behrens H.M., Mathiak M. et al. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget* 2016;7(17):24269–83. DOI: 10.18632/oncotarget.8169
- Frank G.A., Kuznetsova O.A., Zavalishina L.E. et al. PD-L1 status in breast cancer. *Arkh Patol* 2019;81(2):3–9. DOI: 10.17116/patol2019810213
- Garon E.B., Rizvi N.A., Hui R. et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015;372(21):2018–28. DOI: 10.1056/NEJMoa1501824
- Dolled-Filhart M., Locke D., Murphy T. et al. Development of a prototype immunohistochemistry assay to measure programmed death ligand-1 expression in tumor tissue. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140(11):1259–66. DOI: 10.5858/arpa.2015-0544-OA
- Dolled-Filhart M., Roach C., Toland G. et al. Development of a companion diagnostic for pembrolizumab in non-small cell lung cancer using immunohistochemistry for programmed death ligand-1. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140(11):1243–9. DOI: 10.5858/arpa.2015-0542-OA
- Muro K., Chung H.C., Shankaran V. et al. Pembrolizumab for patients with PD-L1-positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): a multicentre, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol* 2016;17(6):717–26. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)00175-3
- Kulangara K., Zhang N., Corigliano E. et al. Clinical utility of the combined positive score for programmed death ligand-1 expression and the approval of pembrolizumab for treatment of gastric cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2019;143(3):330–7. DOI: 10.5858/arpa.2018-0043-OA
- Fuchs C.S., Doi T., Jang R.W. et al. Safety and efficacy of pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated advanced gastric and gastroesophageal junction cancer: phase 2 clinical KEYNOTE-059 trial. *JAMA Oncol* 2018;4(5):1–8. DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.0013
- Bang Y.J., Kang Y.-K., Catenacci D.V. et al. Pembrolizumab alone or in combination with chemotherapy as first-line therapy for patients with advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma: results from the phase II nonrandomized KEYNOTE-059 study. *Gastric Cancer* 2019;22(4):828–37. DOI: 10.1007/s10120-018-00909-5
- Shitara K., Özgüroğlu M., Bang Y.-J. et al. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2018;392(10142): 123–33. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31257-1
- Tabernero K.S.J., Van Cutsem E., Bang Y. et al. Pembrolizumab with or without chemotherapy versus chemotherapy for first-line treatment of advanced gastric or gastroesophageal junction (G/GJ) adenocarcinoma: the phase 3 KEYNOTE-062 study. *Ann Oncol* 2019;30(Suppl. 4):iv152. DOI: 10.1093/annonc/mdz183

29. O'Malley D.P., Yang Y., Boiso S. et al. Immunohistochemical detection of PD-L1 among diverse human neoplasms in a reference laboratory: observations based upon 62,896 cases. *Mod Pathol* 2019;32(7):929–42. DOI: 10.1038/s41379-019-0210-3
30. Yamashita K., Iwatsuki M., Harada K. et al. Prognostic impacts of the combined positive score and the tumor proportion score for programmed death ligand-1 expression by double immunohistochemical staining in patients with advanced gastric cancer. *Gastric Cancer* 2020;23(1):95–104. DOI: 10.1007/s10120-019-00999-9
31. Kang Y.K., Boku N., Satoh T. et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017;390(10111):2461–71. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31827-5
32. Janjigian Y.Y., Bendell J., Calvo E. et al. CheckMate-032 study: efficacy and safety of nivolumab and nivolumab plus ipilimumab in patients with metastatic esophagogastric cancer. *J Clin Oncol* 2018;36(28):2836–44. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.6212
33. Ma J., Li J., Qian M. et al. PD-L1 expression and the prognostic significance in gastric cancer: a retrospective comparison of three PD-L1 antibody clones (SP142, 28-8 and E1L3N). *Diagn Pathol* 2018;13(1):1–10. DOI: 10.1186/s13000-018-0766-0
34. Park Y., Koh J., Na H.Y. et al. PD-L1 testing in gastric cancer by the combined positive score of the 22C3 PharmDx and SP263 assay with clinically relevant cut-offs. 2020 *Cancer Res Treat* 2020;52(3):661–70. DOI: 10.4143/crt.2019.718
35. Zhang M., Dong Y., Liu H. et al. The clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression in gastric cancer: a meta-analysis of 10 studies with 1,901 patients. *Sci Rep* 2016;6:37933. DOI: 10.1038/srep37933
36. Chang H., Jung W.Y., Kang Y. et al. Programmed death-ligand 1 expression in gastric adenocarcinoma is a poor prognostic factor in a high CD8+ tumor infiltrating lymphocytes group. *Oncotarget* 2016;7(49):80426–34. DOI: 10.18632/oncotarget.12603
37. Harada K., Dong X., Estrella J.S. et al. Tumor-associated macrophage infiltration is highly associated with PD-L1 expression in gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer* 2018;21(1):31–40. DOI: 10.1007/s10120-017-0760-3
38. Li Y., Wang J., Ke X.Y. Research update on PD-1/PD-L1 pathway in hematological diseases. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2011;19(6):1523–7. (In Chinese).

Вклад авторов

Н.В. Данилова, Т.Н. Сотникова: сбор и обработка данных;
Т.Н. Сотникова, Т.В. Полушкина: написание текста статьи;
Н.В. Данилова, П.Г. Мальков: редактирование.

Author's contributions

N.V. Danilova, T.N. Sotnikova: data collection and processing;
T.N. Sotnikova, T.V. Polushkina: article writing;
N.V. Danilova, P.G. Malkov: editing.

ORCID авторов / ORCID authors

Т.Н. Сотникова / T.N. Sotnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6482-1110>
Н.В. Данилова / N.V. Danilova: <https://orcid.org/0000-0001-7848-6707>
П.Г. Мальков / P.G. Malkov: <https://orcid.org/0000-0001-5074-3513>
Т.В. Полушкина / T.V. Polushkina: <https://orcid.org/0000-0001-7458-991X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 24.01.2023. Принята к публикации: 25.05.2023.

Article submitted: 24.01.2023. Accepted for publication: 25.05.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-78-89



Малоинвазивная диагностика рака легкого на основе анализа внеклеточной микроРНК крови

М.Ю. Коношенко^{1,2}, П.П. Лактионов^{1,2}, Ю.А. Ланцухай², С.В. Пак², С.Э. Красильников², О.Е. Брызгунова^{1,2}

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

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России; Россия, 630055 Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

Контакты: Мария Юрьевна Коношенко msol@ngs.ru

Введение. Одной из причин высокой смертности больных раком легкого (РЛ) является нехватка высокочувствительных диагностических маркеров этого заболевания. В качестве таковых могут быть предложены маркеры генетических и эпигенетических процессов, характерных для опухолевых клеток, например микроРНК. Известно, что внеклеточная/циркулирующая микроРНК биологических жидкостей в комплексах с белками или упакованная во внеклеточные везикулы представляет интерес для диагностики опухолевых заболеваний.

Цель исследования – выполнить сравнительный анализ экспрессии микроРНК в составе внеклеточных везикул и супернатанта плазмы крови больных РЛ и доноров и предложить на основании полученных результатов диагностическую панель для выявления пациентов с данной патологией.

Материалы и методы. Из образцов крови доноров и больных РЛ методом последовательного центрифугирования была получена плазма крови. Затем из части супернатанта плазмы методом агрегации – осаждения полиэтиленгликолем/синим декстраном выделена фракция внеклеточных везикул (размером 40–150 нм). Из обеих собранных фракций плазмы крови больных РЛ и доноров с использованием гуанидина изотиоцианата и октановой кислоты получены микроРНК. Экспрессия 17 микроРНК, участвующих в механизмах развития РЛ, по нашим данным и данным литературы, в вышеупомянутых фракциях плазмы крови была проанализирована методом петлевой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. В ходе исследования во фракциях внеклеточных везикул и супернатанта плазмы крови обнаружены 29 и 10 пар микроРНК соответственно, экспрессия которых достоверно различалась между больными немелкоклеточным РЛ и донорами. Таким образом, внеклеточные везикулы плазмы обладают большим потенциалом с точки зрения диагностики РЛ на основе оценки относительной экспрессии микроРНК по сравнению с плазмой крови. Разработан диагностический алгоритм, основанный на исследовании aberrантной экспрессии 8 различных микроРНК (miRNA-30e, -1, -125b, -133, -222, -374, -425, -660) в составе 6 пар, позволяющий выявить немелкоклеточный РЛ II–IV стадии в 100 % случаев.

Заключение. Внеклеточные везикулы являются более перспективными, диагностически значимыми микроРНК по сравнению с микроРНК плазмы крови. Для диагностики больных немелкоклеточным РЛ предложена панель из 8 микроРНК, характеризующаяся 100 % чувствительностью и специфичностью.

Ключевые слова: рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, микроРНК, диагностические маркеры, жидкостная биопсия, микровезикулы, плазма крови

Для цитирования: Коношенко М.Ю., Лактионов П.П., Ланцухай Ю.А. и др. Малоинвазивная диагностика рака легкого на основе анализа внеклеточной микроРНК крови. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):78–89. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-78-89

Cell-free plasma miRNAs analysis for low invasive lung cancer diagnostics

M. Yu. Konoshenko^{1,2}, P. P. Laktionov^{1,2}, Yu. A. Lancuhaj², S. V. Pak², S. E. Krasilnikov², O. E. Bryzgunova^{1,2}

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

²Meshalkin Siberian Federal Biomedical Research Center, Ministry of Health of Russia; 15 Rechkunovskaya St., Novosibirsk 630055, Russia

Contacts: Maria Yurievna Konoshenko msol@ngs.ru

Introduction. The high mortality rate in patients with lung cancer (LC) is due to the lack of highly sensitive diagnostic markers of this disease. Genetic and epigenetic alterations in tumor cells, for example, aberrant microRNA expression, can be proposed. It is known that extracellular/circulating microRNA of biological fluids, in complexes with proteins, or packaged in extracellular vesicles is of interest for the diagnosis of tumor diseases.

Aim. To perform a comparative analysis of miRNA expression in plasma and plasma extracellular vesicles of LC patients and healthy donors. Based on the obtained results, to propose a diagnostic panel to identify patients with LC.

Materials and methods. Blood plasma was obtained from blood samples of healthy donors and LC patients by sequential centrifugation. Then, a fraction of extracellular vesicles (40–150 nm in size) was isolated from a part of the obtained plasma supernatant by the method of aggregation-precipitation with polyethylene glycol/blue dextran. MicroRNAs were isolated from both blood plasma fractions of patients and healthy donors using guanidine isothiocyanate and octanoic acid. Expression of 17 miRNAs most characteristic for the development of LC according to our and literature data in the above-mentioned blood plasma fractions was analyzed by stem-loop reverse transcription polymerase chain reaction.

Results. 29 and 10 miRNA pairs were differentially expressed in plasma extracellular vesicles and plasma of lung cancer patients and donors. Thus, plasma extracellular vesicles are characterized by greater potential as a source for miRNA based lung cancer diagnostic panels in comparison with blood plasma. Diagnostic algorithm based on aberrant miRNA expression of 8 different miRNAs (miRNA-30e, -1, -125b, -133, -222, -374, -425, -660) composed in 6 pairs was designed. This algorithm allows to diagnose 100 % of patients with lung cancer stages II–IV.

Conclusion. Extracellular plasma vesicles represent a promising source of diagnostically significant microRNAs compared to plasma microRNAs. For the diagnosis of patients with non-small cell lung cancer with 100 % sensitivity and specificity, a panel of 8 microRNAs (6 miRNA pairs) was proposed.

Keywords: lung cancer, non-small cell lung cancer, miRNA, diagnostic markers, liquid biopsy, microvesicles, blood plasma

For citation: Konoshenko M.Yu., Laktionov P.P., Lancuhaj Yu.A. et al. Cell-free plasma miRNAs analysis for low invasive lung cancer diagnostics. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(2):78–89. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-78-89

ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого (РЛ) — одно из наиболее распространенных в мире онкологических заболеваний, которое каждый год уносит жизни все большего числа людей (1,8 млн человек в 2020 г. [1]). Высокую смертность больных РЛ связывают с распространенностью и поздним выявлением заболевания, что обуславливает необходимость повышения эффективности его диагностики [2]. Многочисленные исследования молекулярных механизмов развития данной патологии свидетельствуют о том, что анализ генетических и эпигенетических изменений в клетках опухоли может быть использован для диагностики онкологических заболеваний и разработки новых типов терапии РЛ [3].

В основе канцерогенеза лежат нарушения в регуляции клеточного цикла, апоптоза, аутофагии, ангиогенеза, механизмы, поддерживающие раковые стволовые клетки, восстановление разрывов ДНК и т. д. Эти процессы управляются рядом сигнальных путей и контролируются клеточными рецепторами, транскрипционными факторами, а также регуляторами экспрессии генов, такими как модификаторы гистонов, метилирование ДНК и микроРНК. Многочисленные исследования указывают на важнейшую роль микроРНК в развитии онкологических заболеваний [4–6]. МикроРНК из клеток опухоли могут попадать во внеклеточные жидкости. Стабильность микроРНК в тканях и биологических жидкостях, а также малая инвазивность метода получения образца, простота выполнения исследования и легкость детекции делают их привлекательными биомаркерами рака. Известно, что часть микроРНК внеклеточных жидкостей упакована

вана во внеклеточные везикулы (ВВ), а часть циркулирует в свободном виде, как правило, в комплексах с белками/липопротеинами/протеогликанами [7]. Показано, что экспрессия микроРНК в обеих фракциях плазмы крови обладает диагностическим потенциалом [8–10].

В настоящем исследовании предпринята попытка разработки диагностической панели для выявления больных немелкоклеточным РЛ (НМРЛ) на основе нескольких внеклеточных микроРНК из плазмы крови и ВВ плазмы крови. Проанализированы концентрации 17 микроРНК, экспрессия которых, согласно полученным нами ранее результатам [11, 12], а также анализу доступных данных литературы [13–30], коррелирует с развитием РЛ в целом и НМРЛ в частности.

Цель исследования — выполнить сравнительный анализ экспрессии микроРНК в составе ВВ и супернатанта плазмы крови больных РЛ и доноров и предложить на основании полученных результатов диагностическую панель для выявления пациентов с данной патологией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе Национального медицинского исследовательского центра им. акад. Е.Н. Мешалкина проанализированы образцы крови доноров ($n = 17$, возраст $62,9 \pm 6,3$ года) и первичных больных НМРЛ (табл. 1).

Образцы крови больных РЛ и доноров центрифугировали в течение 20 мин при 400 g и 4 °C (центрифуга MLW K70D) для осаждения клеток крови. Полученный супернатант центрифугировали в течение 20 мин при 1600 g и 4 °C (центрифуга MLW K70D).

Супернатант отбирали и центрифугировали в течение 20 мин при 17 000 g и 4 °C для осаждения клеточного дебриса (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Фракцию ВВ получали методом последовательных агрегации в присутствии голубого декстрана и осаждения 20 % полиэтиленгликолем, как описано ранее [31].

Таблица 1. Характеристика больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ)

Table 1. Characteristics of non-small cell lung cancer (NSCLC) patient groups

Показатель	Больные НМРЛ (n = 17) NSCLC patients (n = 17)
Возраст, лет Age, years	52,6 ± 5,2
Т-стадия, %: T-stage, %:	
T2	29,4
T3	35,3
T4	35,3
N0	17,6
N1	29,4
N2	47,1
N3	23,5
M0	58,8
M1a–b	41,2
Стадия, %: Tumor stage, %:	
IIIA	17,6
IIIB	17,6
IIIC	17,6
IVA	23,6
IVB2	3,6

Обе фракции размораживали перед применением 1 раз. Из собранных фракций плазмы крови больных РЛ и доноров с использованием гуанидина изотиоцианата и октановой кислоты методом, описанным ранее [32], были выделены суммарные микроРНК. Затем с помощью обратной петлевой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) была проанализирована экспрессия 17 микроРНК [32, 33].

Относительную экспрессию микроРНК оценивали в 2 постановках (сетах). В 1-й постановке анализировали miR-19b, -74a, -324, -22-3p, -222-3p, -133, -144, -425, во 2-й – miR-205, -660, -30e, -125b, -92a, -378, -375, -27b, -31. Для дальнейшей оценки были рассчитаны значения ΔC_t (разница пороговых циклов) каждой пары микроРНК внутри сета. Далее было проанализировано распределение значений ΔC_t . Достоверность межгрупповых различий оценена с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (программа MedCalc).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Значения порогового цикла (C_t), полученные после профилирования микроРНК, нормализовали с помощью метода попарных отношений, который позволяет эффективно оценивать экспрессию всех

возможных комбинаций 2 микроРНК [34]. С помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) были выявлены пары микроРНК, характеризующиеся различной экспрессией у больных РЛ и доноров (табл. 2).

Обнаружено, что пар микроРНК, достоверно различающихся по экспрессии у больных НМРЛ и доноров, существенно больше во фракции ВВ плазмы крови, чем в супернатанте плазмы. Кроме того, различия относительной экспрессии в составе ВВ характеризуются большей достоверностью (пары микроРНК с $p < 0,001$). В плазме крови были обнаружены достоверные различия по 10 парам микроРНК ($p < 0,05$ – 8 пар; $p < 0,01$ – 2 пары), в то время как во фракции ВВ – по 29 ($p < 0,05$ – 7 пар; $p < 0,01$ – 7 пар; $p < 0,001$ – 15 пар) (табл. 2; рис. 1).

Наибольший интерес с точки зрения разработки надежных и диагностически устойчивых панелей представляют собой пары микроРНК, которые характеризуются наименьшим значением p и наибольшим значением ΔC_t . К таким парам относятся miR-133/-222, miR-133/-374, miR-133/-425, miR-205/-125, miR-205/-30, miR-205/-378, miR-30/-660 и miR-125/-660 (при оценке их относительной экспрессии в ВВ плазмы). Результаты анализа ROC-кривых, чувствительности и специфичности каждой пары микроРНК как диагностических маркеров РЛ свидетельствуют о том, что именно во фракции ВВ находится большинство пар с наилучшими диагностическими показателями (наибольшими значениями площади под кривой (area under curve, AUC) и чувствительностью при 100 % специфичности) (табл. 2; рис. 2).

На основе подхода к созданию диагностических панелей, разработанного нами ранее [35] с использованием в качестве референсных средних значений $\Delta C_t \pm 2SD$ (SD – standard deviation, стандартное отклонение), была проанализирована возможность выявлять больных РЛ на основе оценки относительной экспрессии каждой пары микроРНК. Обнаружено, что оценка относительной экспрессии пары miR-133/-374 позволяет диагностировать наибольшее количество больных НМРЛ – 82 %. В то же время с помощью панели микроРНК, состоящей из 3 пар (miR-133/-374, miR-30/-660, miR-125/-660), можно выявить 100 % пациентов с РЛ. Для увеличения диагностической чувствительности и устойчивости эта минимальная панель была дополнена еще 3 парами микроРНК (miR-31/-125, miR-133/-425, miR-133/-222). Расширенная панель позволяет диагностировать каждого исследованного больного РЛ на основе оценки относительной экспрессии как минимум 2 различных пар микроРНК (от 2 до 5 различных пар микроРНК) (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным литературы, внеклеточные микроРНК крови представляют собой перспективные маркеры для диагностики онкологических заболеваний,

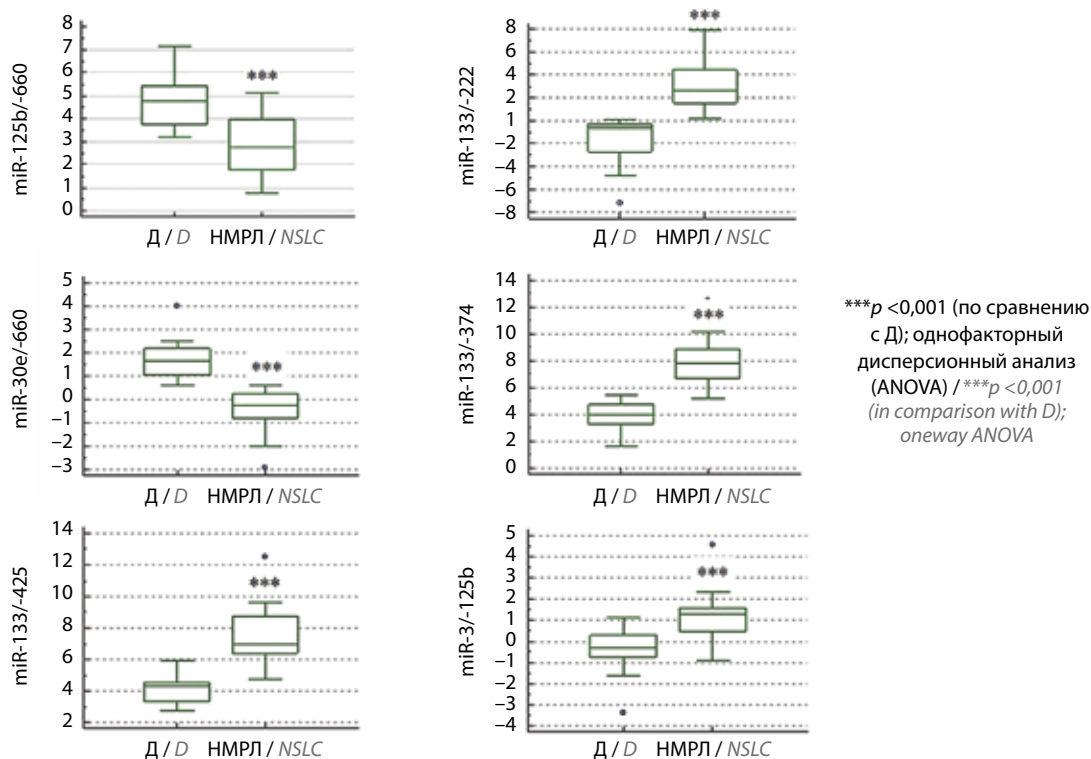


Рис. 1. Относительная экспрессия ΔC_t некоторых микроРНК во фракции внеклеточных везикул плазмы крови доноров (Д) и больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ)

Fig. 1. ΔC_t ratios of miRNA from blood extracellular vesicles of donors (D) and non-small cell lung cancer (NSLC) patients

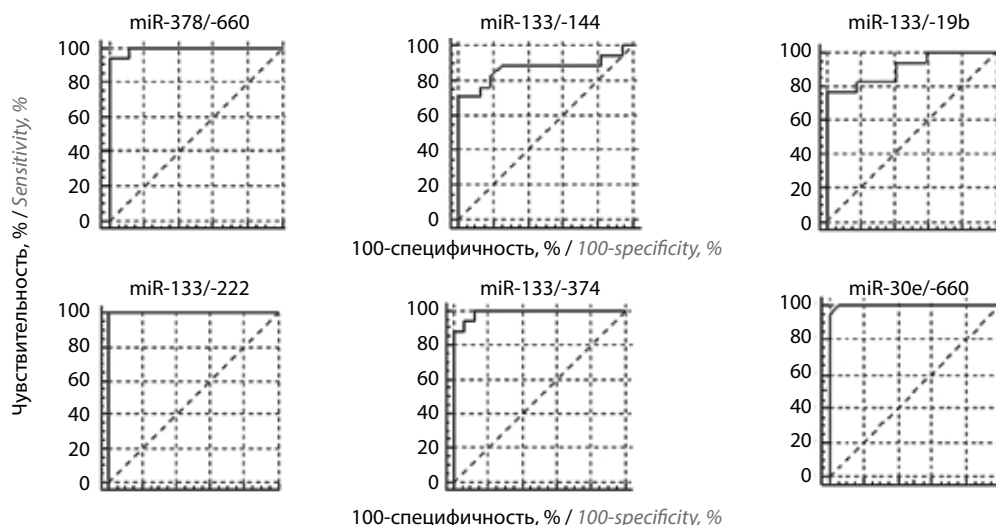


Рис. 2. ROC-анализ относительной экспрессии пар микроРНК во фракции внеклеточных везикул, обладающих наибольшей чувствительностью при 100 % специфичности

Fig. 2. ROC curve analysis of miRNA ratios with highest sensitivity and 100 % specificity in extracellular vesicles

в частности РЛ [12–30], рака предстательной железы [11, 22], остеосаркомы [12], рака яичников и др. Тем не менее диагностические тесты на основе анализа aberrантной экспрессии внеклеточных микроРНК не нашли широкого применения в клинических диагностических лабораториях. Это может быть связано в том числе с методологическими особенностями работы с микроРНК, такими как нормализация данных

об экспрессии микроРНК, недостаточная чувствительность ОТ-ПЦР, выделение образцов без наличия ингибиторов полимеразных реакций и т. д. [36]. В настоящей работе выполнено сравнительное исследование относительных уровней экспрессии 17 микроРНК во фракциях ВВ плазмы крови и общей плазмы крови у пациентов с НМЛР и доноров. Для выделения ВВ из плазмы крови был выбран перспективный с точки

Таблица 2. Пары микроРНК, характеризующиеся различной экспрессией у больных немелкоклеточным раком легкого и доноров во фракциях внеклеточных везикул и супернатанта плазмы крови

Table 2. miRNA ratios with significantly different expression in extracellular vesicles and cell-free plasma of non-small cell lung cancer patients and donors

Показатель Parameter	$p < 0,05$						$p \leq 0,01$		
	$\Delta Ct < 1$			$\Delta Ct \geq 1$			$1 < \Delta Ct < 2$		
	Пары микроРНК miRNA pairs	AUC	Чувствительность при 100 % специфичности, % Sensitivity at 100 % specificity, %	Пары микроРНК miRNA pairs	AUC	Чувствительность при 100 % специфичности, % Sensitivity at 100 % specificity, %	Пары микроРНК iRNA pairs	AUC	Чувствительность при 100 % специфичности, % Sensitivity at 100 % specificity, %
Внеклеточные везикулы Extracellular vesicles	miR-222/-19 miR-30/-92 miR-425/-374	70 68 64	12 0 44	miR-133/-425 miR-222/-144 miR-27/-125 miR-324/-374	97 78 75 73	76 6 6 12	miR-125/-375 miR-222/-425 miR-660/-92	78 85 83	12 18 6
Супернатант плазмы крови Cell-free plasma	miR-30/-378 miR-425/-19	71 68	29 6	miR-144/-374 miR-222/-19 miR-374/-19 miR-27/-660 miR-378/-27 miR-378/-375	72 68 69 65 71 72	24 29 35 47 29 29	miR-205/-27	72	20

Примечание. AUC — area under curve, площадь под кривой.

зрения внедрения в клиническую практику и технологически простой метод осаждения ВВ полиэтиленгликолем в присутствии голубого декстрана [31]. Эта технология не уступает по эффективности «золотому стандарту» выделения ВВ — ультрацентрифугированию, но в то же время не требует сложного дорогостоящего оборудования, позволяет значительно ускорить процедуру и снизить ее стоимость и трудоемкость.

Обнаружено, что пар микроРНК, экспрессия которых достоверно различается у больных РЛ и доноров, существенно больше во фракции ВВ плазмы (29 пар: 7 пар — $p < 0,05$; 7 пар — $p < 0,01$; 15 пар — $p < 0,01$), чем в супернатанте плазмы (10 пар: 8 пар — $p < 0,05$; 2 пары — $p < 0,01$). Таким образом, фракция микроРНК, обогащенная с помощью выделения ВВ, представляет собой перспективный источник микроРНК и ее можно использовать для разработки диагностики НМРЛ. Это полностью согласуется с полученными нами ранее при аналогичном исследовании больных раком предстательной железы данными. Так, мы выявили, что фракция ВВ мочи обладает большим потенциалом для разработки диагностической панели на основе микроРНК для рака предстательной железы по сравнению с бесклеточной фракцией мочи [32].

Уровень микроРНК в составе ВВ плазмы больных РЛ существенно отличается от такового у доноров [37–40]. Диагностический алгоритм, предложенный в настоящей работе на основе оценки относительной экспрессии микроРНК во фракции ВВ плазмы крови, позволил диагностировать 100 % доноров, больных НМРЛ. Этот алгоритм заключается в сравнении относительной экспрессии 6 пар микроРНК (8 различных микроРНК: miRNA-30e, -31, -125b, -133, -222, -374, -425, -660) с референсными значениями. Кроме того, участие этих микроРНК в патогенезе РЛ подтверждено другими исследованиями (табл. 4).

Так, например, было показано, что экспрессия miR-30e была достоверно ниже в образцах тканей, плазмы [41] и ВВ плазмы крови больных РЛ [42]. Более того, анализ экспрессии miR-30e в микровезикулах плазмы позволяет дифференцировать пациентов по стадии заболевания и, следовательно, по необходимости и эффективности хирургического вмешательства [42]. В работах на клеточных линиях было показано, что miR-30e играет роль онкосупрессора: усиление экспрессии этой микроРНК приводит к снижению пролиферации, миграции, инвазии, подавлению эпителиально-мезенхимального перехода, а также к усилению апоптоза, в то время как уменьшение экспрессии

$p \leq 0,01$			$p \leq 0,001$					
$\Delta Ct > 2$			$1 < \Delta Ct < 2$			$\Delta Ct > 2$		
Пары микроРНК miRNA pairs	AUC	Чувствительность при 100 % специфичности, % Sensitivity at 100 % specificity, %	Пары микроРНК miRNA pairs	AUC	Чувствительность при 100 % специфичности, % Sensitivity at 100 % specificity, %	Пары микроРНК miRNA pairs	AUC	Чувствительность при 100 % специфичности, % Sensitivity at 100 % specificity, %
miR-133/-324	94	88	miR-125/-660	87	65	miR-133/-144	87	71
miR-22/-133	85	0	miR-30/-31	86	53	miR-133/-19	91	76
miR-22/-222	87	53	miR-30/-375	81	35	miR-133/-222	100	100
miR-324/-222	80	35	miR-31/-125	84	53	miR-133/-374	99	88
			miR-378/-92	84	35	miR-133/-425	97	76
						miR-205/-125	88	35
						miR-205/-30	86	53
						miR-205/-378	87	24
						miR-30/-660	99,9	94
						miR-378/-660	99	94
miR-133/-19	79	44	—	—	—	—	—	—

Note. AUC — area under curve.

miRNA-30e — к противоположным результатам [43, 44]. В качестве механизмов онкосупрессивного действия miRNA-30e предлагают регуляцию осей ITGA6, USP22 ITGA6/PI3K/AKT и SOX9 [41, 43–45]. В связи с ключевой ролью miR-30e в патогенезе РЛ было предложено использовать ее для разработки таргетной терапии, тем более что увеличение экспрессии этой микроРНК усиливает чувствительность к терапии gefinitибом [46]. Тем не менее некоторые данные литературы противоречивы. Например, было показано, что, с одной стороны, miR-31 активирует опухолевый процесс, усиливая пролиферацию, миграцию, развитие метастазов в лимфатических узлах и подавляя апоптоз, а с другой — ингибирует стволовые раковые клетки (см. табл. 4). Аналогично одни исследования продемонстрировали, что miR-222 усиливает пролиферацию, миграцию, инвазию, жизнеспособность опухолевых клеток и подавляет апоптоз, а в ходе других было выявлено, что повышенная экспрессия этой микроРНК снижает жизнеспособность опухолевых клеток (см. табл. 4). Подобные противоречия могут возникать при работе на различных моделях и при использовании разных источников микроРНК (ткани, клеточные линии, внеклеточные жидкости, микровезикулы, экзосомы), методов выделения, а также в связи с ограниченной

выборкой исследованных объектов. Внеклеточные везикулы плазмы крови и суммарная плазма могут содержать разные наборы микроРНК [47–49]. Несмотря на большой интерес к микроРНК биологических жидкостей как к маркерам различных заболеваний, экспрессия выбранных микроРНК в плазме крови и в ВВ плазмы крови остается малоизученной. В настоящей работе относительная экспрессия пар микроРНК miR-133/-374, miR-31/-125b, miR-133/-425, miR-133/-222 была повышена, а пар miR-30e/-660, miR-125b/-660 — понижена во фракции ВВ плазмы крови больных РЛ по сравнению с донорами. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об онкосупрессорной роли miR-133, -660, -31 и о том, что miR-374, -30e, -125b, -425 и -222 активизируют опухолевые процессы (хотя следует уточнить, что это некоторое упрощение, поскольку одна микроРНК из пары может выполнять лишь роль нормализатора). Эти сведения полностью согласуются с данными литературы о роли miR-133, -660, -374, miR-425, -222 в развитии РЛ, в то время как относительно miR-31, -30e и -125b получены противоречивые результаты (см. табл. 4).

Участие выбранных микроРНК в онкогенезе РЛ подтверждает их перспективность в качестве диагностических биомаркеров данной патологии и свидетельствует

Таблица 3. Результаты анализа микроРНК внеклеточных везикул больных немелкоклеточным раком легкого и доноров по диагностическому алгоритму

Table 3. The results of analysis of miRNA packed in extracellular vesicles of non-small cell lung cancer patients and donors by diagnostic algorithm

Образец Sample	Пороговое значение ΔCt Threshold value ΔCt						Результат Result
	miR-133/ -374 >6,0	miR-30/ -660 <0,1	miR-125/ -660 <2,6	miR-31/ -125 >1,7	miR-133/ -425 > 6,0	miR-133/ -222 >3,2	
Больной: Patient:							
1	+	+	—	—	+	—	+
2	+	+	+	—	—	—	+
3	—	+	+	—	—	—	+
4	—	+	—	+	—	—	+
5	+	+	+	—	+	+	+
6	+	—	—	—	+	+	+
7	+	—	—	—	+	—	+
8	+	+	+	—	+	+	+
9	+	—	—	—	+	—	+
10	+	+	+	+	+	—	+
11	+	+	—	—	+	+	+
12	+	—	—	—	+	+	+
13	—	—	+	+	—	—	+
14	+	+	—	+	+	+	+
15	+	+	—	—	+	+	+
16	+	+	—	—	+	+	+
17	+	—	—	—	+	+	+
Донор: Donor:							
1	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—	—	—
13	—	—	—	—	—	—	—
14	—	—	—	—	—	—	—
15	—	—	—	—	—	—	—

о том, что они могут иметь более широкое клиническое применение. Кроме того, выбранные микроРНК регулируют различные сигнальные пути, что гарантирует чувствительность и стабильность диагностики. Несмотря на значительное количество работ, в которых описывается участие различных микроРНК в развитии РЛ, наше исследование является одним из немногих, демонстрирующих высокий диагностический потенциал микроРНК, упакованных во ВВ [42, 50]. Таким образом, подход, основанный на анализе относительной экспрессии микроРНК из ВВ плазмы крови, набор микроРНК и разработанный нами диагностический алгоритм могут быть в дальнейшем верифицированы на больших выборках доноров и определена их специфичность относительно конкретного вида рака.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе сравнительного исследования относительной экспрессии микроРНК ВВ и супернатанта плазмы крови больных НМРЛ и доноров обнаружены 29 и 10 пар микроРНК соответственно, относительная экспрессия которых у больных РЛ и доноров во фракциях ВВ и супернатанта плазмы крови достоверно различалась. Показано, что оценка относительной экспрессии микроРНК ВВ плазмы имеет большую значимость для диагностики НМРЛ по сравнению с анализом относительной экспрессии микроРНК плазмы крови. Разработан диагностический алгоритм, основанный на исследовании aberrантной экспрессии 8 различных микроРНК в составе 6 пар микроРНК, позволяющий диагностировать 100 % больных НМРЛ II–IV стадии.

Таблица 4. Участие микро РНК, включенных в диагностическую панель, в развитии рака легкого (РЛ) (по данным литературы)
Table 4. The involvement of miRNAs from diagnostic panel in lung cancer (LC) development (according to literature data)

Микро-РНК miRNA	Экспрессия микроРНК в образцах РЛ по сравнению с образцами доноров miR expression in LC samples in comparison with donors			Экспрессия микроРНК, ассоциированная с плохим прогнозом miR expression associated with poor prognosis	Экспрессия микроРНК, ассоциированная с прогрессией опухоли miR expression associated with tumor progression	Биологический эффект Biological effect	Гены-мишени и сигнальные пути, с помощью которых осуществляется биологический эффект Target genes and signal pathways	Влияние на эффективность лечения Effect on therapy effectiveness	Ссылки References
	Ткань Tissue	Плазма Plasma	Клеточные линии Cell lines						
miR-30e	↓	↓	—	↓	↓/↑	Ингибирует пролиферацию, миграцию, инвазию и эпителиально-мезенхимальный переход, стимулирует апоптоз/клеточный рост Inhibits proliferation, migration, invasion, epithelial mesenchymal transition, enhances apoptosis/ cell growth	Сигнальный путь ITGA6/PI3K/АКТ, USP22, SOX9, RPTN13 ?	Повышает чувствительность к терапии gefinitибом Enhances sensitivity to gefinitib	[41, 43–46, 51–54]
miR-31	↑	—	↑	↑	↑	Усиливает пролиферацию, миграцию, развитие метастазов в лимфатических узлах, подавляет апоптоз/ингибирует стволовые раковые клетки Enhances proliferation, migration, lymph nodes metastasis, inhibits apoptosis/inhibits cancer stem cells	Ось TNSI/p53, LATS2, VAP1, ABCB9, FOXO1, сигнальные пути MET-PI3K-Акт, RAS/MAPK (через HnfR) ?	Ингибирует апоптоз, индуцированный цисплатином Inhibits apoptosis induces by cisplatin	[45, 55–62]
miR-125b	↓	—	—	—	—	—	—	—	[45, 63]
miR-133	—	↓	↓	—	—	Ингибирует пролиферацию, миграцию, инвазию и эпителиально-мезенхимальный переход, усиливает апоптоз Inhibits proliferation, migration, invasion, epithelial mesenchymal transition, enhances apoptosis	EGFR, FLOT2 через сигнальный путь Акт, FOXQ1-TGF-β, PKM2, MMP 14 ?	Повышает чувствительность к радиотерапии Enhances sensitivity to radiotherapy	[65–69]

Окончание табл. 4
The end of table 4

Микро-РНК miRNA	Экспрессия микроРНК в образцах РЛ по сравнению с образцами доноров miR expression in LC samples in comparison with donors			Экспрессия микроРНК, ассоциированная с плохим прогнозом miR expression associated with poor prognosis	Экспрессия микроРНК, ассоциированная с прогрессией опухоли miR expression associated with tumor progression	Биологический эффект Biological effect	Гены-мишени и сигнальные пути, с помощью которых осуществляется биологический эффект Target genes and signal pathways	Влияние на эффективность лечения Effect on therapy effectiveness	Ссылки References
	Ткань Tissue	Плазма Plasma	Клеточные линии Cell lines						
miR-222	↑	–	↑	↑	–	Усиливает пролиферацию, миграцию, инвазию, жизнеспособность опухолевых клеток, подавляет апоптоз/ингибирует жизнеспособность опухолевых клеток Enhances proliferation, migration, invasion, cell viability, inhibits apoptosis/inhibits cell viability	PUMA (Bcl-2-связывающий компонент 3), EGFR, P27, ETS1 ?	Повышает резистентность к gefinitibu Enhances resistance to gefinitib	[70–78]
miR-374	–	–	–	↑	–	Усиливает инвазию Enhances invasion	–	–	[79]
miR-425	↑	–	↑	↑	↑	Усиливает пролиферацию, миграцию, инвазию, способность формировать колонии, метастазирование Enhances proliferation, migration, invasion, colony formation, metastasis	CREB1, сигнальный путь PTEN/PI3K/АКТ через DAPK1, AMPH-1, FOXJ3 ?	Повышает резистентность к терапии на основе препаратов платины Enhances resistance to platinum-based therapy	[80–84]
miR-660	↓	↓/↑ в экзо- мах ↓/↑ (in plasma exosomes)	–	↓	–	Усиливает пролиферацию, миграцию, инвазию, способность формировать колонии, клеточный рост/подавляет клеточный рост, пролиферацию и метастазирование Enhances proliferation, migration, invasion, colony formation, cell growth/inhibits cell growth, proliferation and metastasis	MDM2-p53, KLF9	–	[85–87]

Примечание. ↑ – повышенная экспрессия в образцах больных РЛ по сравнению с донорами/в линиях клеток РЛ по сравнению с псевдонормальными клетками эпителия легких.
↓ – пониженная экспрессия в образцах больных РЛ по сравнению с донорами/в линиях клеток РЛ по сравнению с псевдонормальными клетками эпителия легких.
Note. ↑ increased expression in LC patient samples compared to donor/LC lines compared to pseudonormal lung epithelial cells; ↓ reduced expression in LC patient samples compared to donor/LC cell lines

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

- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660
- Eberhardt W.E., Pöttgen C., Gauler T.C. et al. Phase III study of surgery versus definitive concurrent chemoradiotherapy boost in patients with resectable stage IIIA(N2) and selected IIIB non-small-cell lung cancer after induction chemotherapy and concurrent chemoradiotherapy (ESPA-TUE). *J Clin Oncol* 2015;33(35):4194–201. DOI: 10.1200/JCO.2015.62.6812
- Chang K., Wang H. The cancer genome atlas pan-cancer analysis project. *Nat Genet* 2013;45(10):1113–20. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2015.04.02
- Sempere L.F., Azmi A.S., Moore A. microRNA-based diagnostic and therapeutic applications in cancer medicine. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2021;12(6):e1662. DOI: 10.1002/wrna.1662
- Dhawan A., Scott J.G., Harris A.L., Buffa F.M. Pan-cancer characterisation of microRNA across cancer hallmarks reveals microRNA-mediated downregulation of tumour suppressors. *Nat Commun* 2018;9(1):5228. DOI: 10.1038/s41467-018-07657-1
- He B., Zhao Z., Cai Q. et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer. *Int J Biol Sci* 2020;16(14):2628–47. DOI: 10.7150/ijbs.4720
- Fredsoe J., Rasmussen A.K.I., Thomsen A.R. et al. Diagnostic and prognostic microRNA biomarkers for prostate cancer in cell-free urine. *Eur Urol Focus* 2018;4(6):825–33. DOI: 10.1016/j.euf.2017.02.018
- Hu C., Meiners S., Lukas C. et al. Role of exosomal microRNAs in lung cancer biology and clinical applications. *Cell Prolif* 2020;53(6):e12828. DOI: 10.1111/cpr.12828
- Yi M., Liao Z., Deng L. et al. High diagnostic value of miRNAs for NSCLC: quantitative analysis for both single and combined miRNAs in lung cancer. *Ann Med* 2021;53(1):2178–93. DOI: 10.1080/07853890.2021.2000634
- Gao S., Guo W., Liu T. et al. Plasma extracellular vesicle microRNA profiling and the identification of a diagnostic signature for stage I lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2022;113(2):648–59. DOI: 10.1111/cas.15222
- Osipov I.D., Zaporozhchenko I.A., Bondar A.A. et al. Cell-free miRNA-141 and miRNA-205 as prostate cancer biomarkers. *Adv Exp Med Biol* 2016;924:9–12. DOI: 10.1007/978-3-319-42044-8_2
- Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., Ponomaryova A.A. et al. Profiling of 179 miRNA expression in blood plasma of lung cancer patients and cancer-free individuals. *Sci Rep* 2018;8(1):6348. DOI: 10.1038/s41598-018-24769-2
- Li C., Yin Y., Liu X. et al. Non-small cell lung cancer associated microRNA expression signature: integrated bioinformatics analysis, validation and clinical significance. *Oncotarget* 2017;8(15):24564–78. DOI: 10.18632/oncotarget.15596
- Huang W., Huang W., Hu J. et al. Two microRNA panels to discriminate three subtypes of lung carcinoma in bronchial brushing specimens. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(11):1160–7. DOI: 10.1164/rccm.201203-0534OC
- Wu C., Cao Y., He Z. et al. Serum levels of miR-19b and miR-146a as prognostic biomarkers for non-small cell lung cancer. *Tohoku J Exp Med* 2014;232(2):85–95. DOI: 10.1620/tjem.232.85
- Boeri M., Verri C., Conte D. et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(9):3713–8. DOI: 10.1073/pnas.1100048108
- Zhou X., Wen W., Shan X. et al. A six-microRNA panel in plasma was identified as a potential biomarker for lung adenocarcinoma diagnosis. *Oncotarget* 2016;8(4):6513–25. DOI: 10.18632/oncotarget.14311
- Liu M., Gao J., Huang Q. et al. Downregulating microRNA-144 mediates a metabolic shift in lung cancer cells by regulating GLUT1 expression. *Oncol Lett* 2016;11(6):3772–6. DOI: 10.3892/ol.2016.4468
- Pan H.L., Wen Z.S., Huang Y.C. et al. Down-regulation of microRNA-144 in air pollution-related lung cancer. *Sci Rep* 2015;5:14331. DOI: 10.1038/srep14331
- Zhang G., An H., Fang X. MicroRNA-144 regulates proliferation, invasion, and apoptosis of cells in malignant solitary pulmonary nodule via zinc finger E-box-binding homeobox 1. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(5):5960–7.
- Ling B., Wang G.X., Long G. et al. Tumor suppressor miR-22 suppresses lung cancer cell progression through post-transcriptional regulation of ErbB3. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138(8):1355–61. DOI: 10.1007/s00432-012-1194-2
- Xin M., Qiao Z., Li J. et al. miR-22 inhibits tumor growth and metastasis by targeting ATP citrate lyase: evidence in osteosarcoma, prostate cancer, cervical cancer and lung cancer. *Oncotarget* 2014;7(28):44252–65. DOI: 10.18632/oncotarget.10020
- Hosseini S.A., Seidi M., Yaghoobi H. Designed miR-19a/b sponge induces apoptosis in lung cancer cells through the PI3K-PTEN-Akt pathway regulation. *Mol Biol Rep* 2022;49(9):8485–93. DOI: 10.1007/s11033-022-07670-0
- Zhang X., Wang X., Chai B. et al. Downregulated miR-18a and miR-92a synergistically suppress non-small cell lung cancer via targeting Sprouty 4. *Bioengineered* 2022;13(4):11281–95. DOI: 10.1080/21655979.2022.2066755
- Reis P.P., Drigo S.A., Carvalho R.F. et al. Circulating miR-16-5p, miR-92a-3p, and miR-451a in plasma from lung cancer patients: potential application in early detection and a regulatory role in tumorigenesis pathways. *Cancers* 2020;12(8):2071. DOI: 10.3390/cancers12082071
- Wang Z., Pan L., Yang L. et al. Long non-coding RNA GATA6-AS1 sponges miR-324-5p to inhibit lung cancer cell proliferation and invasion. *Onco Targets Ther* 2020;13:9741–51. DOI: 10.2147/OTT.S256336
- Zhang Y., Xu H. Serum exosomal miR-378 upregulation is associated with poor prognosis in non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Lab Anal* 2020;34(6):e23237. DOI: 10.1002/jcla.23237
- Ji K.X., Cui F., Qu D. et al. MiR-378 promotes the cell proliferation of non-small cell lung cancer by inhibiting FOXG1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22(4):1011–9. DOI: 10.26355/eurrev_201802_14383
- Cao X., Zhong W., Guo S. et al. Low expression of miR-27b in serum exosomes of non-small cell lung cancer facilitates its progression by affecting EGFR. *Open Med (Wars)* 2022;17(1):816–25. DOI: 10.1515/med-2022-0472
- Zhong S., Golpon H., Zardo P. et al. miRNAs in lung cancer. A systematic review identifies predictive and prognostic miRNA candidates for precision medicine in lung cancer. *Transl Res* 2021;230:164–96. DOI: 10.1016/j.trsl.2020.11.012
- Konoshenko M.Y., Lekchnov E.A., Bryzgunova O.E. et al. Isolation of extracellular vesicles from biological fluids via the aggregation-precipitation approach for downstream miRNAs detection. *Diagnostics* 2012;11(3):384. DOI: 10.3390/diagnostics11030384
- Lekchnov E.A., Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S. et al. Protocol for miRNA isolation from biofluids. *Anal Biochem* 2016;499:78–84. DOI: 10.1016/j.ab.2016.01.025
- Konoshenko M.Y., Lekchnov E.A., Bryzgunova O.E. et al. The panel of 12 cell-free microRNAs as potential biomarkers in prostate neoplasms. *Diagnostics* 2020;10(1):38. DOI: 10.3390/diagnostics10010038
- Landoni E., Miceli R., Callari M. et al. Proposal of supervised data analysis strategy of plasma miRNAs from hybridisation array data with an application to assess hemolysis-related deregulation. *BMC Bioinformatics* 2015;16:388. DOI: 10.1186/s12859-015-0820-9
- Bryzgunova O.E., Zaporozhchenko I.A., Lekchnov E.A. et al. Data analysis algorithm for the development of extracellular

- miRNA-based diagnostic systems for prostate cancer. *PLoS One* 2019;14(4):e0215003. DOI: 10.1371/journal.pone.0215003
36. Bryzgunova O.E., Konoshenko M.Y., Zaporozhchenko I.A. et al. Isolation of cell-free miRNA from biological fluids: influencing factors and methods. *Diagnostics (Basel)* 2021;11(5):865. DOI: 10.3390/diagnostics11050865
 37. Dejima H., Iinuma H., Kanaoka R. et al. Exosomal microRNA in plasma as a non-invasive biomarker for the recurrence of non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* 2017;13(3):1256–63. DOI: 10.3892/ol.2017.5569
 38. Kanaoka R., Iinuma H., Dejima H. et al. Usefulness of plasma exosomal microRNA-451a as a noninvasive biomarker for early prediction of recurrence and prognosis of non-small cell lung cancer. *Oncology* 2018;94(5):311–23. DOI: 10.1159/000487006
 39. Liu Q., Yu Z., Yuan S. et al. Circulating exosomal microRNAs as prognostic biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2017;8(8):13048–58. DOI: 10.18632/oncotarget.14369
 40. Munagala R., Aqil F., Gupta R.C. Exosomal miRNAs as biomarkers of recurrent lung cancer. *Tumor Biol* 2016;37(8):10703–14. DOI: 10.1007/s13277-016-4939-8
 41. Silva J., García V., Zaballos Á. et al. Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur Respir J* 2011;37(3):617–23. DOI: 10.1183/09031936.00029610
 42. Zhuang L., Shou T., Li K. et al. MicroRNA-30e-5p promotes cell growth by targeting PTPN13 and indicates poor survival and recurrence in lung adenocarcinoma. *J Cell Mol Med* 2017;21(11):2852–62. DOI: 10.1111/jcmm.13198
 43. Li W., Yang P., Zhong C. et al. The circ-PITX1 promotes non-small cell lung cancer development via the miR-30e-5p/ITGA6 axis. *Cell Cycle* 2022;21(3):304–21. DOI: 10.1080/15384101.2021.2020041
 44. Dong W., Zhang H., Dai Y. et al. circRNA circFAT1(e2) Elevates the development of non-small-cell lung cancer by regulating miR-30e-5p and USP22. *BioMed Res Int* 2021;2021:6653387. DOI: 10.1155/2021/6653387
 45. Gao W., Shen H., Liu L. et al. MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137(4):557–66. DOI: 10.1007/s00432-010-0918-4
 46. Ning Z.Q., Lu H.L., Chen C. et al. MicroRNA-30e reduces cell growth and enhances drug sensitivity to gefitinib in lung carcinoma. *Oncotarget* 2017;8(3):4572–81. DOI: 10.18632/oncotarget.13944
 47. Silva J., García V., Zaballos Á. et al. Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur Respir J* 2011;37(3):617–23. DOI: 10.1183/09031936.00029610
 48. Turchinovich A., Burwinkel B. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol* 2012;9(8):1066–75. DOI: 10.4161/rna.21083
 49. Lunavat T.R., Lesley C., Dae-Kyum K. et al. Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells – evidence of unique microRNA cargos. *RNA Biol* 2015;12(8):810–23. DOI: 10.1080/15476286.2015.1056975
 50. Huang X., Tiezheng Y., Tschannen M. et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* 2013;14:319. DOI: 10.1186/1471-2164-14-319
 51. Markou A., Sourvinou I., Vorkas P.A. et al. Clinical evaluation of microRNA expression profiling in non small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013;81(3):388–96. DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.05.007
 52. Cui Y., Zhao L., Zhao S. et al. MicroRNA-30e inhibits proliferation and invasion of non-small cell lung cancer via targeting SOX9. *Human Cell* 2019;32(3):326–33. DOI: 10.1007/s13577-018-0223-0
 53. Xu G., Cai J., Wang L. et al. MicroRNA-30e-5p suppresses non-small cell lung cancer tumorigenesis by regulating USP22-mediated Sirt1/JAK/STAT3 signaling. *Exp Cell Res* 2018;362(2):268–78. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.11.027
 54. He J., Jin S., Zhang W. et al. Long non-coding RNA LOC554202 promotes acquired gefitinib resistance in non-small cell lung cancer through upregulating miR-31 expression. *J Cancer* 2019;10(24):6003–13. DOI: 10.7150/jca.35097
 55. Liu X., Sempere L.F., Ouyang H. et al. MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors. *J Clin Invest* 2010;120(4):1298–309. DOI: 10.1172/JCI39566
 56. Zhu C., Wang S., Zheng M. et al. miR-31-5p modulates cell progression in lung adenocarcinoma through TNSI/p53 axis. *Strahlenther Onkol* 2022;198(3):304–14. DOI: 10.1007/s00066-021-01895-x
 57. Hou C., Sun B., Jiang Y. et al. MicroRNA-31 inhibits lung adenocarcinoma stem-like cells via down-regulation of MET-PI3K-Akt signaling pathway. *Anticancer Agents Med Chem* 2016;16(4):501–18. DOI: 10.2174/1871520615666150824152353
 58. Zhang J., Li D., Zhang Y. et al. Integrative analysis of mRNA and miRNA expression profiles reveals seven potential diagnostic biomarkers for non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2020;43(1):99–112. DOI: 10.3892/or.2019.7407
 59. Cheng X., Sha M., Jiang W. et al. LINC00174 suppresses non-small cell lung cancer progression by up-regulating LATS2 via sponging miR-31-5p. *Cell J* 2022;24(3):140–7. DOI: 10.22074/cellj.2022.7991
 60. Wang Y., Shang S., Yu K. et al. miR-224, miR-147b and miR-31 associated with lymph node metastasis and prognosis for lung adenocarcinoma by regulating PRPF4B, WDR82 or NR3C2. *Peer J* 2020;8:e9704. DOI: 10.7717/peerj.9704
 61. Meng W., Ye Z., Cui R. et al. MicroRNA-31 predicts the presence of lymph node metastases and survival in patients with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2013;19(19):5423–33. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0320
 62. Zeng X., Liu D., Peng G. et al. MicroRNA-31-3p promotes the invasion and metastasis of non-small-cell lung cancer cells by targeting forkhead Box 1 (FOXO1). *Comput Math Methods Med* 2022;2022:4597087. DOI: 10.1155/2022/4597087
 63. Sun X., Zhang S., Ma X. Prognostic value of microRNA-125 in various human malignant neoplasms: a meta-analysis *Clin Lab* 2015;61(11):1667–74. DOI: 10.7754/clin.lab.2015.150408
 64. Kazempour Dizaji M., Farzanegan B., Bahrami N. et al. Expression of miRNA1, miRNA133, miRNA191, and miRNA24, as good biomarkers, in non-small cell lung cancer using real-time PCR method. *Asian Pac J Cancer Prev* 2022;23(5):1565–70. DOI: 10.31557/APJCP.2022.23.5.1565
 65. Liu S., Chen J., Zhang T. et al. MicroRNA-133 inhibits the growth and metastasis of the human lung cancer cells by targeting epidermal growth factor receptor. *J BUON* 2012;24(3):929–35.
 66. Liu G., Li Y.I., Gao X. Overexpression of microRNA-133b sensitizes non-small cell lung cancer cells to irradiation through the inhibition of glycolysis. *Oncol Lett* 2016;11(4):2903–8. DOI: 10.3892/ol.2016.4316
 67. Wei G., Xu Y., Peng T. et al. miR-133 involves in lung adenocarcinoma cell metastasis by targeting FLOT2. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018;46(2):224–30. DOI: 10.1080/21691401.2017.1324467
 68. Xiao B., Liu H., Gu Z. et al. Expression of microRNA-133 inhibits epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells by directly targeting FOXQ1. *Arch Bronconeumol* 2016;52(10):505–11. DOI: 10.1016/j.arbres.2015.10.016
 69. Xu M., Wang Y.Z. miR-133a suppresses cell proliferation, migration and invasion in human lung cancer by targeting MMP-14. *Oncol Rep* 2013;30(3):1398–404. DOI: 10.3892/or.2013.2548
 70. Peinado P., Andrades A., Martorell-Marugán J. et al. The SWI/SNF complex regulates the expression of miR-222, a tumor suppressor microRNA in lung adenocarcinoma. *Human Mol Gen* 2021;30(23):2263–71. DOI: 10.1093/hmg/ddab187
 71. Wu Q., Yu L., Lin X. et al. Combination of serum miRNAs with serum exosomal miRNAs in early diagnosis for non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag Res* 2020;12:485–95. DOI: 10.2147/CMAR.S232383

72. Chen W., Li X. MiR-222-3p promotes cell proliferation and inhibits apoptosis by targeting PUMA (BBC3) in non-small cell lung cancer. *Technol Cancer Res Treat* 2020;19:1533033820922558. DOI: 10.1177/1533033820922558
73. Garofalo M., Romano G., Di Leva G. et al. EGFR and MET receptor tyrosine kinase-altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers. *Nat Med* 2011;18:74–82. DOI: 10.1038/nm.2577
74. Mao K.P., Zhang W.N., Liang X.M. et al. MicroRNA-222 expression and its prognostic potential in non-small cell lung cancer. *Sci World J* 2014;908326. DOI: 10.1155/2014/908326
75. Zhong C., Ding S., Xu Y. et al. MicroRNA-222 promotes human non-small cell lung cancer H460 growth by targeting p27. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(4):5534–40.
76. Sun Q., Jiang C.W., Tan Z.H. et al. MiR-222 promotes proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells by targeting ETS1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21(10):2385–91.
77. Hetta H.F., Zahran A.M., El-Mahdy R.I. et al. Assessment of circulating miRNA-17 and miRNA-222 expression profiles as non-invasive biomarkers in Egyptian patients with non-small-cell lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2019;20(6):1927–33. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.6.1927
78. Kim Y., Sim J., Kim H. et al. MicroRNA-374a expression as a prognostic biomarker in lung adenocarcinoma. *J Pathol Transl Med* 2019;53(6):354–60. DOI: 10.4132/jptm.2019.10.01
79. Wang G., Ji X., Li P. et al. Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes containing microRNA-425 promote migration, invasion and lung metastasis by down-regulating CPEB1. *Regen Ther* 2022;20:107–16. DOI: 10.1016/j.reth.2022.03.007
80. Guo Z., Ye H., Zheng X. et al. Extracellular vesicle-encapsulated microRNA-425-derived from drug-resistant cells promotes non-small-cell lung cancer progression through DAPK1-mediated PI3K/AKT pathway. *J Cell Physiol* 2021;236(5):3808–20. DOI: 10.1002/jcp.30126
81. Zhou J.S., Yang Z.S., Cheng S.Y. et al. miRNA-425-5p enhances lung cancer growth via the PTEN/PI3K/AKT signaling axis. *BMC Pulm Med* 2020;20(1):223. DOI: 10.1186/s12890-020-01261-0
82. Jiang L., Ge W., Geng J. miR-425 regulates cell proliferation, migration and apoptosis by targeting AMPH-1 in non-small-cell lung cancer. *Pathol Res Pract* 2019;215(12):152705. DOI: 10.1016/j.prp.2019.152705.
83. Fu Y., Li Y., Wang X. et al. Overexpression of miR-425-5p is associated with poor prognosis and tumor progression in non-small cell lung cancer. *Cancer Biomark* 2020;27(2):147–56. DOI: 10.3233/cbm-190782
84. Yuwen D., Ma Y., Wang D. et al. Prognostic role of circulating exosomal miR-425-3p for the response of NSCLC to platinum-based chemotherapy. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent* 2019;28(1):163–73. DOI: 10.1158/1055-9965.epi-18-0569
85. Fortunato O., Boeri M., Moro M. et al. Mir-660 is downregulated in lung cancer patients and its replacement inhibits lung tumorigenesis by targeting MDM2-p53 interaction. *Cell Death Dis* 2014;5(12):e1564. DOI: 10.1038/cddis.2014.507
86. Qi Y., Zha W., Zhang W. Exosomal miR-660-5p promotes tumor growth and metastasis in non-small cell lung cancer. *J BUON* 2019;24(2):599–607.
87. Moro M., Di Paolo D., Milione M. et al. Coated cationic lipid-nanoparticles entrapping miR-660 inhibit tumor growth in patient-derived xenografts lung cancer models. *J Control Release* 2019;308:44–56. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.07.006

Вклад авторов

М.Ю. Коношенко, О.Е. Брызгунова: разработка дизайна исследования, проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;

П.П. Лактионов: анализ данных, написание текста статьи;

Ю.А. Ланцухай, С.В. Пак, С.Э. Красильников: сбор биоматериала, предоставление клинических данных больных и доноров.

Authors' contribution

M.Y. Konoshenko, O.E. Bryzgunov: development of research design, conducting experiments, analysis and interpretation of data, article writing;

P.P. Laktionov: data analysis, article writing;

Yu.A. Lantsukhaj, S.V. Pak, S.E. Krasilnikov: collection of biomaterial, provision of clinical data of patients and donors.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.Ю. Коношенко / M.Yu. Konoshenko: <https://orcid.org/0000-0003-2925-9350>

П.П. Лактионов / P.P. Laktionov: <https://orcid.org/000-0002-0866-0252>

Ю.А. Ланцухай / Yu.A. Lantsukhaj: <https://orcid.org/0009-0004-4174-7300>

С.В. Пак / S.V. Pak: <https://orcid.org/0009-0009-6221-2758>

С.Э. Красильников / S.E. Krasilnikov: <https://orcid.org/0000-0003-0687-0894>

О.Е. Брызгунова / O.E. Bryzgunova: <https://orcid.org/0000-0003-3433-7261>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено в рамках проектов базового бюджетного финансирования Минобрнауки России (№ 121030200173-6) и Минздрава России (№ 121031300227-2).

Funding. The study was carried out within the framework of the basic budget financing projects of the Ministry of Education and Science of Russia (No. 121030200173-6) and the Ministry of Health of Russia (No. 121031300227-2).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук (протокол № 10 от 22.12.2008).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences (protocol No. 10 of 22.12.2008).

Статья поступила: 15.09.2022. **Принята к публикации:** 13.03.2023.

Article submitted: 15.09.2022. **Accepted for publication:** 13.03.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-90-99



Особенности метилирования CpG-сайтов некоторых генов Т-лимфоцитов периферической крови пациентов с раком молочной железы до и после лечения

Т.Г. Гончарова, Н.А. Омарбаева, Д.Р. Кайдарова, М.Г. Оразгалиева, Л.А. Малышева

Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии; Республика Казахстан, А05А2В4 Алматы, проспект Абая, 91

Контакты: Татьяна Георгиевна Гончарова goncharova.2004@mail.ru,
Назгуль Айдарбековна Омарбаева nazgulek87@mail.ru

Введение. Рост первичной заболеваемости раком молочной железы (РМЖ) за последнее десятилетие и увеличение числа пациентов с диссеминированным РМЖ в Республике Казахстан обуславливают необходимость поиска возможностей ранней диагностики злокачественных новообразований. Определение маркеров РМЖ в эпигенетических исследованиях позволяет использовать их в качестве диагностических показателей наличия злокачественной опухоли и предикторов эффективности лечения пациентов с данной патологией.

Цель исследования – поиск эпигенетических терапевтических и прогностических маркеров РМЖ.

Материалы и методы. В исследование вошли образцы биологического материала (периферическая кровь) 50 условно здоровых людей и 103 больных местно-распространенным и диссеминированным РМЖ, получавших специальную терапию. Методы проведения исследования: забор крови, выделение ДНК, создание профилей метилирования ДНК, секвенирование, статистическая обработка данных.

Результаты. Результаты поиска эпигенетических мутаций в периферической крови больных РМЖ показали их роль как диагностических, терапевтических и прогностических маркеров со специфичностью 91 % и чувствительностью 94,0 %. Проверена и подтверждена гипотеза о терапевтической значимости ранее обнаруженных диагностических маркеров для пациентов с РМЖ, а именно метилирования в островках CpG, связанных с генами *JAM3*, *C17orf64*, *MSC*, *C7orf51*, и в островке CpG, связанном с внутригенным участком хромосомы 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434).

Заключение. Определена корреляционная связь между особенностями метилирования ДНК и течением болезни на фоне лечения. Данные, полученные в ходе настоящего исследования, могут быть использованы в клинической практике: эпигенетические маркеры, такие как метилирование в островках CpG, связанных с генами *JAM3*, *C17orf64*, *MSC*, *C7orf51*, и в островке CpG, связанном с внутригенным участком хромосомы 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434), можно применять как прогностические маркеры и терапевтические предикторы при РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, эпигенетика, метилирование ДНК, биомаркер

Для цитирования: Гончарова Т.Г., Омарбаева Н.А., Кайдарова Д.Р. и др. Особенности метилирования CpG-сайтов некоторых генов Т-лимфоцитов периферической крови пациентов с раком молочной железы до и после лечения. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):90–9. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-90-99

The specifics of CpG islets methylation of some genes of peripheral blood T-lymphocytes in breast cancer patients before and after treatment

T.G. Goncharova, N.A. Omarbayeva, D.R. Kaidarova, M.G. Orazgaliyeva, L.A. Malysheva

Kazakh Institute of Oncology and Radiology; 91 Prospekt Abaya, Almaty A05A2B4, Republic of Kazakhstan

Contacts: Tatyana Georgievna Goncharova goncharova.2004@mail.ru,
Nazgul Aidarbekovna Omarbayeva nazgulek87@mail.ru

Introduction. The growth of primary breast tumor morbidity in the last ten years and increased number of patients with disseminated breast cancer in the Republic of Kazakhstan require the search for methods of early diagnosis of malignant tumors. Determination of breast cancer markers in epigenetic studies allows to use them as diagnostic signs of the presence of malignant tumor and as predictors of treatment effectiveness in patients with this pathology.

Aim. To perform a search for therapeutic and prognostic breast cancer markers.

Materials and methods. The study included samples of biological material (peripheral blood) of 50 deemed healthy individuals and 103 patients with locally advanced and disseminated breast cancer receiving special therapy. The following methods were used: blood collection, DNA extraction, creation of DNA methylation profiles, sequencing, statistical data analysis.

Results. The results of search for epigenetic mutations in peripheral blood of patients with breast cancer showed their role as specific diagnostic, therapeutic and prognostic markers with specificity 0.91 % and sensitivity 0.94 %. The hypothesis on therapeutic significance of identified earlier diagnostic markers in patients with breast cancer, namely hypermethylation of CpG islands associated with genes *JAM3*, *C17orf64*, *MSC*, *C7orf51* and CpG island associated with intragene part of chromosome 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434) was tested and confirmed.

Conclusion. A correlation between DNA methylation characteristics and disease progression during treatment was shown. The study results can be used in clinical practice: epigenetic markers, such as methylation in the CpG islets associated with the *JAM3*, *C17orf64*, *MSC*, *C7orf51* genes, and in the CpG islet associated with the intragenic site of chromosome 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434) can be used as prognostic markers and therapeutic predictors of breast cancer.

Keywords: breast cancer, epigenetics, DNA methylation, biomarker

For citation: Goncharova T.G., Omarbayeva N.A., Kaidarova D.R. et al. The specifics of CpG islets methylation of some genes of peripheral blood T-lymphocytes in breast cancer patients before and after treatment. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(1):90–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-90-99

ВВЕДЕНИЕ

Рост первичной заболеваемости раком молочной железы (РМЖ) за последнее десятилетие и увеличение числа больных диссеминированным РМЖ в Республике Казахстан [1, 2] обуславливают необходимость поиска возможностей ранней диагностики злокачественных новообразований (ЗНО). Многочисленные генетические исследования пациентов с онкологическими заболеваниями опираются на использование в качестве раннего диагностического биомаркера наличия мутаций в генах.

Хотя большинство патологических процессов, связанных с опухолевыми новообразованиями в организме, обусловлены генетическими изменениями, отдельные нарушения в экспрессии генов предопределены эпигенетическими трансформациями. Эпигеном отличается динамичностью, которая проявляется в метилировании цитозин-гуаниновых островков ДНК (CG-динуклеотидов). Предполагается, что иммунологические сдвиги, происходящие в организме при ЗНО, приводят к эпигенетическим альтерациям в клетках периферической крови [3, 4]. При этом установлено, что метилирование ДНК клеток моноклеарной фракции периферической крови имеет корреляционные различия между здоровыми людьми и пациентами с ЗНО [5, 6]. Также признано, что эпигенетические нарушения в экспрессии ключевых генов, включая *TSG*, играют большую роль в канцерогенезе в целом и в развитии РМЖ в частности [7–9]. Такое эпигенетическое изменение, как aberrantное метилирование ДНК, не предполагает изменений в последовательности ДНК и представляет собой ковалентную химическую структуру ДНК, которая оказывает большое влияние на экспрессию целого гена. Таким образом, эта видоизмененная экспрессия генов приводит ко многим накопленным трансформациям, которые могут влиять на процесс онкогенеза [10].

Предпосылкой для планирования настоящих исследований был факт обнаружения эпигенетических

маркеров, которые можно использовать в ранней диагностике ЗНО, в частности РМЖ. Стоит отметить, что определение профиля метилирования ДНК и анализ транскриптомов опухолей отражают специфический иммунный почерк в зависимости от подтипа опухоли [11–13]. Например, R. Yang и соавт. обнаружили, что при РМЖ (по сравнению с контрольной группой) уровень метилирования CpG-островков гена гиалуроноглюкозаминидазы 2 (*HYAL2*) в периферической крови значительно выше [14]. Поскольку в ткани РМЖ локус *HYAL2* еще более гиперметилирован, данные убедительно свидетельствуют о том, что метилирование *HYAL2* в лейкоцитах периферической крови может являться ранним биомаркером, не имеющим отношения к циркулирующей опухолевой ДНК. Авторы пришли к выводу, что метилирование *HYAL2* лейкоцитов в крови выступает в роли раннего предиктора РМЖ (специфичность 90 %). Изучение статуса метилирования ДНК внутри и вне островков CpG отдельных генов показало, что метилирование некоторых из них связано с риском развития РМЖ. A. Kuchiba и соавт. обнаружили, что глобальный уровень метилирования ДНК лейкоцитов периферической крови понижен по сравнению с нормой у пациентов с РМЖ и может быть потенциальным биомаркером риска развития данной патологии [15]. Кроме того, анализ данных в исследованиях S. Parashar, D. Cheishvili, N. Mahmood и др. выявил в Т-клетках ~10 000 сайтов, ассоциированных с прогрессированием РМЖ, из них 89 сайтов CpG также сильно коррелировали с прогрессированием заболевания ($p < 0,01$; $r > 0,7$; $r < -0,7$). Подавляющее большинство этих гипометилированных сайтов имеют прямое отношение к генам, белки которых участвуют в функционировании иммунной системы [16].

Накопление эпигенетических нарушений в клетках организма со злокачественной опухолью коррелирует с увеличением агрессии раковых клеток, изменением

их поведения с повышением инвазии в близлежащие ткани, диссеминацией по кровеносным и/или лимфатическим сосудам, что в конечном счете, при отсутствии лечения, может привести к смерти пациента. Поскольку иммунная система играет ключевую роль при контроле роста опухоли, различия в восприимчивости к терапии и прогрессировании заболевания должны быть связаны с различиями в молекулярном программировании иммунных клеток для инициации опухоль-специфичного иммунного ответа. Однако вопрос о том, существует ли особенность в ответе на терапевтическое воздействие в периферических иммунных клетках, которая поможет при планировании курсов химиотерапии, не рассматривался.

На основе геномного анализа с использованием периферической крови у больных РМЖ и в контрольной группе ранее нами были определены эпигенетические маркеры для выявления РМЖ. Наша гипотеза, основанная на предварительных исследованиях, заключается в том, что в иммунных клетках периферической крови при наличии РМЖ проявляются особенности профилей метилирования ДНК, и эти сигналы могут служить не только самыми ранними диагностическими биомаркерами заболевания, но и предикторами при планировании противоопухолевой терапии [17].

Цель исследования — поиск эпигенетических терапевтических и прогностических маркеров РМЖ.

Эпигенетический анализ, а именно выявление особенностей профилей метилирования ДНК у больных РМЖ, позволит лучше понять процессы, происходящие в организме как до, так и во время лечения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено корреляционное проспективное исследование без ослепления. В исследовании участвовали пациентки, которые были разделены на 2 группы. В 1-ю (основную) группу вошли образцы крови 103 больных в возрасте 27–83 лет с местно-распространенным и диссеминированным РМЖ (из них 60 — для оценки патоморфологического ответа опухоли на фоне проведенного лечения) до и после противоопухолевого лечения, во 2-ю (контрольную) — 50 образцов крови здоровых женщин такого же возраста, как и пациентки 1-й группы.

Всем больным после верификации диагноза проведена специализированная терапия по утвержденным международным протоколам лечения ЗНО в Казахском научно-исследовательском институте онкологии и радиологии.

Критерии включения: впервые выявленный местно-распространенный и диссеминированный РМЖ, пред- и постклимактерический возраст, дальнейшая специализированная противоопухолевая терапия согласно международным протоколам лечения.

Критерии исключения (для 1-й группы): любое выявленное воспалительное заболевание (бактериальная или вирусная инфекция), диабет, астма, аутоиммунное

заболевание, заболевание щитовидной железы в период обострения, которые могут изменять характеристики показателей иммунитета.

В электронную базу данных включены возраст пациенток, контактные данные, клинический диагноз, результаты обследований (визуальной диагностики), гистологическое заключение биопсийного материала, данные о фенотипе опухоли по результатам иммуногистохимического исследования, об ответе на противоопухолевое лечение, рецидиве и прогрессировании заболевания.

Основные изучаемые параметры:

- фенотипы опухоли у больных с диссеминированным и местно-распространенным РМЖ;
- профиль метилирования ДНК в Т-клетках и моноцитах периферической крови пациенток с РМЖ;
- динамика в профиле ДНК-метилирования в Т-клетках после проведенного специализированного противоопухолевого лечения;
- анализ значимости теста в прогностическом плане и выявление корреляций между экспрессией биомаркеров и клиническими особенностями течения заболевания.

Первый забор крови проводили во время первичной диагностики, второй — после окончания противоопухолевого лечения. Кровь забирали в количестве 15,0 мл с использованием вакуумной системы для забора крови в стерильные пробирки VenoSafe с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Сначала проведены выделение и криоконсервация лимфоцитов и плазмы из цельной крови с применением фикола. Верхний слой плазмы, который не содержит клеток, использовали для выделения циркулирующей ДНК, а слой лимфоцитов — для выделения геномной ДНК. Плазменную ДНК экстрагировали, используя внутренний «бесклеточный протокол» экстракции ДНК (HKG Epitherapeutics, Гонконг). Извлеченную ДНК конвертировали в бисульфит с помощью набора EZ DNA Methylation-Direct (ZymoResearch, Калифорния, США) и хранили при -20°C до начала дальнейшей обработки. Количество выделенной двухцепочечной ядерной ДНК должно было быть не менее 20 ng.

Секвенирование проводили методом метилирования ДНК с помощью Infinium Methylation Epicbeadarray на секвенаторе нового поколения IlluminaMiSeq (Illumina, Калифорния, США). Для мультиплексного секвенирования выполняли 2 цикла полимеразной цепной реакции (ПЦР). Первый шаг был нацелен на исследование 5 генов для образцов больных РМЖ (*JAM3*, *C17orf64*, *MSC*, *C7orf51* и в островке CpG, связанном с внутрисгенным участком хромосомы 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434), метилирование которых обнаружено в клетках РМЖ. Последовательность, включенная в праймеры для данного этапа амплификации, соответствовала бисульфит-конвертированной версии той целевой последовательности, которая служила якорем для второй ПЦР. При второй ПЦР добавляли праймер

для секвенирования, который определял индексную последовательность, служившую уникальным идентификатором для каждой пациентки. Первый цикл ПЦР-амплификации осуществляли в реакционных смесях, содержащих 2 мкл бисульфит-конвертированной ДНК и Taq ДНК-полимеразы (ThermoScientific, США), с применением набора обратных и прямых праймеров при помощи стандартной амплификации. Второй цикл ПЦР проводили для маркировки каждого ампликона определенным штрих-кодом с использованием серий прямого и обратного наборов штрих-кода HKG. Контроль качества выполняли с учетом результатов второй ПЦР.

Библиотеку, содержащую одинаковую дозу полученных ампликонов, объединяли в соответствии с их концентрациями двухцепочечной ДНК (дцДНК), определенными с помощью набора для анализа дцДНК Qubit™ HS (Invitrogen, США), после чего дважды очищали, используя очищающие шарики, и определяли количество с помощью ПЦР в реальном времени (набор для количественного анализа библиотеки NEBNext® для Illumina, NewEnglandBiolabs, США). Затем проводили секвенирование на платформе Illumina с использованием MiSeqReagent V2 Micro (Illumina, США). После секвенирования файлов FastQ определяли уровень метилирования на всех участках гена для каждой пациентки. Метилирование проведено совместно с лабораторией HKG Epitherapeutics Limited (Hong Kong Science Park Shatin, Гонконг), биоинформационный анализ — в лаборатории профессора Moshe Szyf (Канада) с использованием ChAMP пакета в R.

Для каждого гена анализ ПЦР в реальном времени выполняли в 3 повторностях с использованием определенных праймеров (табл. 1) в концентрации 0,3 мМ.

С целью парного сравнения групп для каждого биомаркера использовали *t*-критерий Стьюдента. Для того чтобы удостовериться в чувствительности

и специфичности исследуемого набора маркеров метилирования ДНК при РМЖ, в качестве сравнения использовали открытые базы данных метилирования ДНК (Illumina 450K): Атлас ракового генома (The Cancer Genome Atlas, TCGA), GSE40279, GSE61496, GSE76269 и GSE66836. Для определения функционально значимых различий в метилировании ДНК при РМЖ проводили корреляционный анализ с определением прямой и обратной связей между различиями в метилировании промотора и энхансера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В основу данного исследования легли результаты нашей предыдущей работы [17]. У больных РМЖ были изучены участки CpG, ассоциированные с генами *JAM3*, *C17orf64*, *MSC* и *C7orf51*, и в островке CpG, связанном с внутргенным участком хромосомы 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434), в которых был зафиксирован определенный уровень метилирования, показавший дифференцированную корреляцию между образцами ткани опухоли и крови у больных раком молочной железы и другими злокачественными новообразованиями, нормальными тканями и образцами крови здоровых испытуемых. Эти данные легли в основу расчетов чувствительности и специфичности методического подхода, а также сопоставлены с данными, отраженными в международных базах TCGA и GSE по метилированию ДНК [17].

Основной вопрос настоящего исследования: «Можно ли использовать исследованные метилированные гены не только как диагностические, но и как прогностические маркеры у пациентов с РМЖ после лечения?» Был проведен анализ 103 образцов плазмы крови больных РМЖ, по результатам которого рассчитаны показатели чувствительности и специфичности теста для определения РМЖ (уровень метилирования островков CpG выбранных генов) по сравнению

Таблица 1. Последовательность нуклеотидов праймеров для исследуемых генов

Table 1. The sequence of nucleotides of primers for the studied genes

Целевой ген Target gene	Последовательность нуклеотидов в праймерах The sequence of nucleotides in primers	Размер ампликона, п. н. Amplicon size, bp	Референсная последовательность Reference sequence	Размерность праймера, п. н. Tm-primers bp
<i>JAM3_Fw</i>	CAAGTGACCCCAGGATCGAG	90	NM_032801	59,82
<i>JAM3_Rv</i>	CCGCCAAGTCTCCCTGAATTT			60,61
<i>C17orf64_Fw</i>	AGAAGCAGTGGGTCAGAAGC	130	NM_181707	59,96
<i>C17orf64_Rv</i>	TTGTCACTGCTCTAGTGGC			59,68
<i>MSC_Fw</i>	AGTTACATCGCTCACCTGCG	84	NM_005098	60,46
<i>MSC_Rv</i>	TGGCCATGTCAGGTTCCTG			60,25
<i>NYAP1_Fw</i>	GGGACACCAGAGGAGGAAGA	118	NM_173564	60,25
<i>NYAP1_Rv</i>	CCTCGACCTTGTCCAACCTCC			60,04

с раком другой локализации. Так, специфичность метилирования для дифференциации РМЖ от здоровых тканей и других видов рака составила 91,0 %, чувствительность — 94,0 %. С учетом результатов, полученных при исследовании обнаруженных метилированных генов как диагностических и прогностических маркеров РМЖ (для определения наиболее чувствительных), взвешенные показатели метилирования ДНК с выявлением порогового значения были включены в ROC-анализ с вычислением площади под ROC-кривой (area under curve, AUC) для каждого из них. Статистический показатель AUC, рассчитанный согласно площади под ROC-кривой, оказался равным 0,94 (табл. 2), что подтверждает очень высокий уровень информативности предложенного метода.

Исследование было сфокусировано на различии в уровнях метилирования ДНК ранее выявленных биомаркеров (*C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC*, *NYAP*) в плазме крови больных РМЖ до и после лечения. На рис. 1 представлены результаты исследования профилей метилирования ДНК в плазме пациенток с РМЖ и здоровых людей — тепловая карта метилирования для каждой из 5 областей биомаркеров (*C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC*, *NYAP*). Уровень значимости метилирования для клинического проявления (дифференциальное метилирование) отражен в тепловой карте в виде оттенков красного и синего цвета: ярко-синий — отсутствие метилирования (0–25 %), от голубого до белого — недостаточный уровень метилирования (26–50 %); розовый и красный — достаточный уровень

Таблица 2. Чувствительность, точность и специфичность полигенных эпигенетических маркеров рака молочной железы

Table 2. Sensitivity, accuracy and specificity of polygenic epigenetic markers of breast cancer

Показатель Parameter	Абс. (%) Abs. (%)
Чувствительность Sensitivity	0,94 (94)
Специфичность Specificity	0,91 (91)
Точность Accuracy	0,94 (94)
AUC	0,95 (95)

метилирования (51–75 %); ярко-красный — высокий уровень метилирования (76–100 %). Согласно уровню дифференциального метилирования генов (от 0 до 100 %) для всех больных ($n = 103$), они автоматически включались в одну из 4 групп: 1-я группа — «отсутствие метилирования»; 2-я — «недостаточный уровень метилирования»; 3-я — «достаточный уровень метилирования»; 4-я — «высокий уровень метилирования» (рис. 2; табл. 3).

Согласно данным, представленным на рис. 1 и в табл. 3, до лечения у большинства пациенток (56,9 %) зафиксирован высокий уровень метилирования, который для отдельных генов, таких как *C7orf51*, *GC103* и *NYAP*, составил 82,5; 69,9 и 73,8 % соответственно.

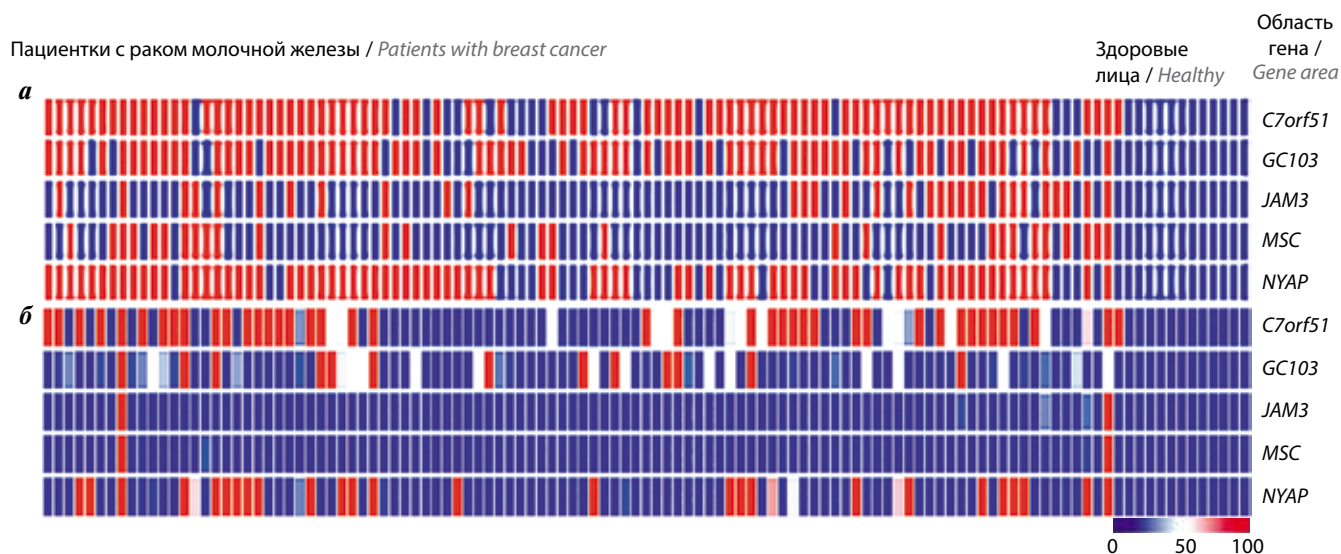


Рис. 1. Результаты исследования профилей метилирования ДНК в плазме больных раком молочной железы и здоровых людей. Тепловая карта метилирования для каждого из 5 биомаркеров. Образцы плазмы крови пациенток с раком молочной железы и здоровых людей обозначены горизонтальными полосами для отдельных участков метилирования в островках CpG, связанных с генами *C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC*, *NYAP*, для каждой пациентки: а — до лечения; б — после лечения. Уровень метилирования гена отдельных пациенток обозначен цветом: от насыщенного синего (отсутствие метилирования) к голубому, белому и насыщенному красному цвету (высокий уровень метилирования)

Fig. 1. The results of the study of DNA methylation profiles in the plasma of breast cancer patients and healthy people. A heat map of methylation for each of the 5 biomarkers. Samples of breast cancer patients and healthy people are indicated by horizontal stripes for individual methylation sites in CpG islets associated with the genes *C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC*, *NYAP* for each patient: а — before treatment, б — after treatment. Individual patient gene methylation levels (according to ID) are color-coded from deep blue (no methylation) to blue, white to deep red (high methylation)

После лечения больных РМЖ суммарный уровень метилирования (по 5 целевым генам) уменьшился более чем в 3 раза, причем высокий уровень этого показателя снизился за счет перехода в 1–3-ю группы. Таким образом, у больных РМЖ после проведенного лечения метилирование в исследуемых генах отсутствовало в 74,8 % случаев. В 7,0 % случаев наблюдался «недостаточный» уровень метилирования ДНК, он оставался «достаточным» или высоким только у 1,9 и 16,3 % пациенток соответственно. При этом в отношении маркеров *JAM3* и *MSC* метилирование после лечения сохранилось только у 2 больных (см. рис. 1).

Таким образом, анализ результатов метилирования участков CpG, ассоциированных с генами *JAM3*, *C17orf64*, *MSC*, *C7orf51*, и в островке CpG, связанном с внутригенным участком хромосомы 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434), может быть полезным для предикативного прогнозирования ответа на лечение больных РМЖ уже на ранних этапах терапии.

- Люминальный тип А и В / Luminal types A and B
- Люминальный тип В с гиперэкспрессией Her2 / Luminal type B with Her2 overexpression
- Her2-положительный тип / Her2-positive type
- Трижды негативный тип / Triple negative type

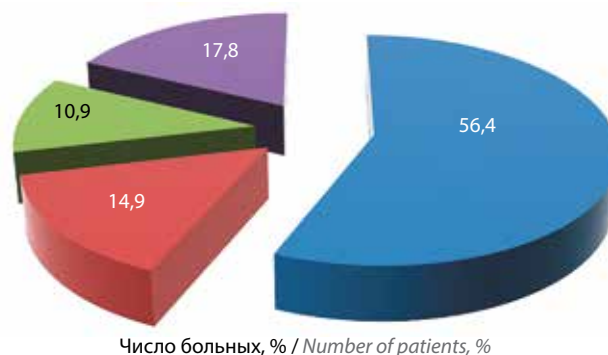


Рис. 2. Распределение больных раком молочной железы по фенотипу опухоли. Her2 – рецептор эпидермального фактора роста, тип 2
Fig. 2. Distribution of patients with breast cancer by tumor phenotype. Her2 – human epidermal growth factor receptor 2

Таблица 3. Количественный анализ образцов больных раком молочной железы ($n = 103$) по уровню метилирования генов (согласно данным тепловой карты) до и после лечения

Table 3. Quantitative analysis of samples of patients with breast cancer ($n = 103$) according to the level of gene methylation (according to heat map data) before and after treatment

Ген (биомаркер) Gene (biomarker)	Общее количество исследований, абс. (%) Total number of studies, abs. (%)	Количество образцов в группах по уровню метилирования гена, согласно данным тепловой карты, абс. (%) The number of samples in groups according to the level of gene methylation, according to the heat map data, abs. (%)			
		Отсутствие метилирования или недостаточ- ный уровень метилирования Lack of methylation or insufficient methylation		Достаточный или высокий уровень метилирования Sufficient or high level of methylation	
		1-я группа (0—25 %) Group 1 (0—25 %)	2-я группа (26—50 %) Group 2 (26—50 %)	3-я группа (51—75 %) Group 3 (51—75 %)	4-я группа (76—100 %) Group 4 (76—100 %)
До лечения Before treatment					
C7orf51	103 (100)	18 (17,5)	0	0	85 (82,5)
GC103	103 (100)	31 (30,1)	0	0	72 (69,9)
JAM3	103 (100)	72 (69,9)	0	0	31 (30,1)
MSC	103 (100)	74 (71,8)	0	0	29 (28,2)
NYAP	103 (100)	27 (26,2)	0	0	76 (73,8)
Всего Total	515 (100)	222 (43,1)	0	0	293 (56,9)
После лечения After treatment					
C7orf51	103 (100)	47 (45,6)	12 (11,6)	3 (2,9)	41 (39,8)
GC103	103 (100)	65 (63,1)	21 (20,4)	4 (3,9)	13 (12,6)
JAM3	103 (100)	101 (98,1)	0	0	2 (1,9)
MSC	103 (100)	101 (98,1)	0	0	2 (1,9)
NYAP	103 (100)	71 (68,9)	3 (2,9)	3 (2,9)	26 (25,2)
Всего Total	515 (100)	385 (74,8)	36 (7,0)	10 (1,9)	84 (16,3)

При анализе групп РМЖ больные были распределены по возрасту, локальному статусу, фенотипу опухоли (по данным иммуногистохимического исследования), стадии заболевания, данным о рецидиве и прогрессировании заболевания, наличию метилирования ДНК.

Средний возраст пациенток с РМЖ составил $52,02 \pm 12,67$ года (27–83 года), из них к представителям азиатской национальности (южносибирская раса – казашки) относились 82,2 % больных, европеоидной расы – 17,8 %. При первом обращении в 39,6 % случаев наблюдался РМЖ ранней стадии (I–IIA стадия), в 57,5 % – местно-распространенный РМЖ (у 16,8 % больных, поступивших в стационар повторно, появились метастазы в различные органы), в 2,9 % – диссеминированный РМЖ. Узловая форма РМЖ отмечена у 87,2 % пациенток, отечно-инфильтративная – у 10,9 %, язвенная – у 1,9 %. Люминальный А и В типы встречались в 56,4 % случаев, люминальный тип В с гиперэкспрессией Her2 – в 14,9 %, трижды негативный тип – в 10,9 %, Her2-позитивный – в 17,8 % (рис. 2).

Согласно полученным данным, наиболее высокий уровень метилирования (значимый в диагностическом плане) *C7orf51* и *NYAP* у пациенток с РМЖ наблюдался до и после лечения в 39,8 и 25,2 % случаев соответственно. Этот факт, возможно, связан с наличием либо остаточной опухоли, либо метастазов или циркулирующих опухолевых клеток. С целью установления динамики в профиле ДНК-метилирования в Т-клетках после специализированного противоопухолевого лечения больных с РМЖ для оценки значимости теста в прогностическом плане и выявления возможных корреляций между метилированием в биомаркерах и особенностями клинического течения заболевания проведен анализ, результаты которого отражены на рис. 3.

Выполнен корреляционный анализ уровней метилирования в генах *C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC* и *NYAP* со следующими параметрами: возраст пациентов на момент постановки диагноза, стадия заболевания, фенотип опухоли и прогрессирование заболевания после лечения, результаты которого частично представлены в предыдущих исследованиях [17]. При этом на основании корреляционного анализа по методу Спирмана, определения достоверности разницы между исследуемыми параметрами с помощью критериев Краскела–Уоллиса, Пирсона и U-критерия Манна–Уитни показана лишь достоверная положительная корреляция метилирования вышеописанных генов со средним возрастом и стадией заболевания.

Данные, полученные в ходе выявления корреляций между метилированием в генах *C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC* и *NYAP* и прогрессированием заболевания (параметр 629, p -value 0,79), согласно U-критерию Манна–Уитни, отражены на рис. 3. Несмотря на выявление четкой зависимости полученных результатов

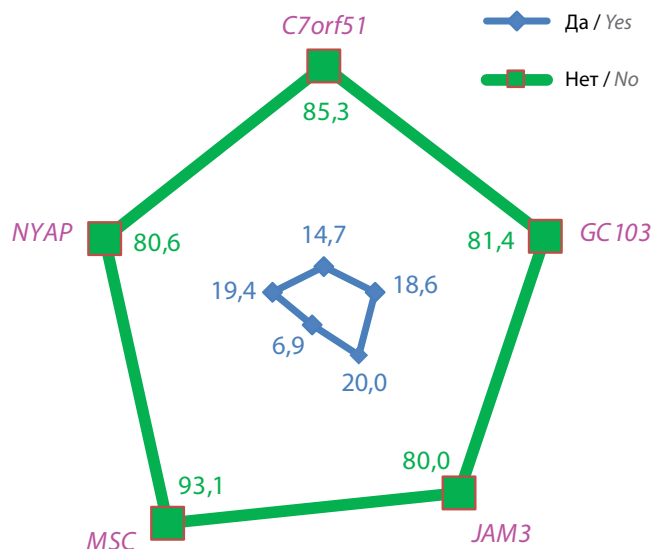


Рис. 3. Корреляции между метилированием в генах *C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC* и *NYAP* и наличием (да) или отсутствием (нет) прогрессирования заболевания (в процентном отношении), %

Fig. 3. Correlations between methylation in the *C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC* and *NYAP* genes and the presence (yes) or absence (no) of disease progression (percentage), %

лечения от наличия/отсутствия метилирования в исследуемых генах у больных с РМЖ, необходимы дальнейшие исследования с увеличением размера выборки для того, чтобы дать корректное определение клинической значимости полученных корреляций.

Оценка патоморфологического ответа опухоли, индуцированного противоопухолевой терапией на фоне предоперационных курсов полихимиотерапии, и объективного ответа на лечение проведена у 60 пациенток с местно-распространенным и диссеминированным РМЖ. Полный патоморфологический ответ при проведении комбинированных курсов полихимиотерапии с таргетной терапией достигнут в 30,7 % случаев. На фоне лечения у 40 % пациенток с диссеминированным РМЖ отмечалась стабилизация процесса, у 30 % – частичная регрессия метастатических очагов, у 30 % – прогрессирование заболевания в виде увеличения размеров метастатических очагов (табл. 4).

Таким образом, прогрессирование заболевания наблюдалось у 9 больных, что составляет 15 % ($n = 60$) от общей выборки (табл. 4). Это соответствует данным корреляционного анализа между метилированием в исследуемых маркерах и показателем наличия прогрессирования опухолевого процесса (рис. 3).

Согласно нашим предварительным данным предложенный метод определения профиля метилирования ДНК в Т-лимфоцитах и моноклеарной фракции периферической крови пациентов имеет потенциал в качестве дополнения к стандартным методам диагностики РМЖ, а также для периодического наблюдения за больными, которые проходят лечение или находятся в ремиссии после комплексной терапии.

Таблица 4. Оценка патоморфологического ответа опухоли на фоне предоперационных курсов полихимиотерапии (клинический эффект) у пациенток с метастатическим раком молочной железы

Table 4. Assessment of the pathomorphological response of the tumor against the background of preoperative polychemotherapy courses (clinical effect) in patients with metastatic breast cancer

Предоперационная ПХТ Preoperative PCT	Клинический эффект, абс. (%) Clinical effect, abs. (%)		Патоморфологический ответ, степень (%) Pathomorphological response, degree (%)
НАПХТ: NPHT: АС АС + Т/АТ D + ТТ (n = 50)	Частичная регрессия Partial regression	20 (40)	2 (10)
	Полная регрессия Full regression	13 (26)	4 (30,7)
	Стабилизация Stabilization	11 (22)	1 (9,1)
	Прогрессирование Progression	6 (12)	0
СПХТ: IPHT: АС АС + Т/АТ D + ТТ (n = 10)	Частичная регрессия Partial regression	3 (30)	—
	Полная регрессия Full regression	—	—
	Стабилизация Stabilization	4 (40)	—
	Прогрессирование Progression	3 (30)	—

Примечание. НАПХТ — неoadъювантная полихимиотерапия; СПХТ — самостоятельная полихимиотерапия; АС — антрациклины + циклофосфамид; АС + Т/АТ — антрациклины (например доксорубин, эпирубин с циклофосфамидом) с переходом на препараты таксанового ряда или антраклины + таксаны; D + ТТ — доцетаксел + таргетная терапия.

Note. NAPHT — neoadjuvant polychemotherapy; IPHT — independent polychemotherapy; AS — anthracyclines + cyclophosphamide; AS + T/AT — anthracyclines (for example, doxorubicin, epirubicin with cyclophosphamide) with the transition to drugs of the taxane series or anthraclines + taxanes; D + TT — docetaxel + targeted therapy.

ОБСУЖДЕНИЕ

Многими авторами установлено, что исследование эпигенома клеток периферической крови обладает огромным диагностическим и терапевтическим потенциалом и относится к малоинвазивным методам, поскольку для теста достаточно образца плазмы крови обследуемого [17–19].

Исследование эпигенетических механизмов, на первый взгляд, кажется второстепенным по сравнению с определением генетического профиля пациента. Однако стандартный генетический анализ выявляет только нуклеотидную последовательность ДНК, но если ген-супрессор опухолевого роста метилирован неверно, это нарушение вызовет сбой в работе гена. С учетом того что нарушения в экспрессии генов появляются не только в злокачественных клетках, но и в микроокружении опухоли, обуславливая прогрессирование и рецидив заболевания, эпигенетические маркеры могут быть полезными в лечении и реабилитации пациенток с РМЖ, делая возможным применение персонализированного подхода [20]. Эпигенетический анализ в данной ситуации — метод выбора, позволяющий обнаружить потенциальные нарушения в клетках. Немаловажным различием между генетическими и эпигенетическими нарушениями является то, что последние могут быть скорректированы при помощи лекарств, которые безрезультативны в терапии в случае генетических мутаций [21]. Изучение роли эпигенетических методов в диагностике и лечении

ЗНО, в частности РМЖ, позволит понять процессы, происходящие в организме при развитии опухоли, и найти эффективные подходы к ее ранней диагностике и лечению.

Патогенетическое многообразие форм РМЖ, с одной стороны, и наличие закономерности ответной реакции на лечебное воздействие, с другой, дают основание не только для признания гетерогенности ЗНО, но и для ожидания единообразного ответа на терапию. При этом знание индивидуальных молекулярных характеристик опухоли в зависимости от степени ее патоморфологического ответа на терапию может обеспечить заблаговременную оценку результативности выбранного режима лечения с долгосрочным прогнозом для отдельного больного. В перспективе возможно управление восстановлением исходной генетической программы организма под контролем тестирования эпигенетических изменений, что позволит улучшить результаты терапии ЗНО.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты исследования метилирования ДНК в периферической крови пациентов дают возможность определения их в роли не только как диагностического, но и как прогностического биомаркера РМЖ при минимально инвазивной диагностике.

Данное исследование уникально, поскольку предоставляет возможности дальнейшего глубокого изучения эпигенетических биомаркеров для диагностики РМЖ

и последующего контроля за рецидивом ЗНО. Данные, полученные в ходе настоящего исследования, могут быть использованы в клинической практике: эпигенетические маркеры, такие как метилирование в островках CpG, связанных с генами *JAM3*, *C17orf64*, *MSC*, *C7orf51*, и в островке CpG, связанном с внутригенным участком

хромосомы 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434), можно применять как прогностические маркеры и терапевтические предикторы при РМЖ. Это, в свою очередь, ставит перед клиницистами и исследователями вопрос о возможной устойчивости опухоли к определенным препаратам, что требует отдельного исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Кайдарова Д.Р., Шатковская О.В., Абдрахманова А.Ж. и др. Эпидемиология рака молочной железы в Казахстане (2014–2018 годы). Онкология и радиология Казахстана 2019;54(4):4–8. Kaidarova D.R., Shatkovskaya O.V., Abdrakhmanova A.Z. et al. Breast cancer epidemiology in Kazakhstan (2014–2018). *Onkologiya i radiologiya Kazakhstana = Oncology and Radiology of Kazakhstan* 2019;54(4):4–8. (In Russ.).
2. Шатковская О.В., Кайдарова Д.Р., Душимова З.Д. и др. Тенденции заболеваемости, молекулярной диагностики и лечения больных раком молочной железы в Казахстане, 2014–2019 гг. Онкология и радиология Казахстана 2021;62(4):16–23. DOI: 10.52532/2521-6414-2021-4-62-16-23. Shatkovskaya O.V., Kaidarova D.R., Dushimova Z.D. et al. Trends in incidence, molecular diagnostics, and treatment of patients with breast cancer in Kazakhstan, 2014–2019. *Onkologiya i radiologiya Kazakhstana = Oncology and Radiology of Kazakhstan* 2021;62(4):16–23. DOI: 10.52532/2521-6414-2021-4-62-16-23
3. Szyf M. DNA methylation signatures for breast cancer classification and prognosis. *Genome Med* 2012;30(4):26. DOI: 10.1186/gm325
4. Bjaanas M.M., Fleischer T., Halvorsen A.R. et al. Genome-wide DNA methylation analyses in lung adenocarcinomas: association with EGFR, KRAS and TP53 mutation status, gene expression, and prognosis. *Mol Oncol* 2016;10:330–43. DOI: 10.1016/j.molonc.2015.10.021
5. Swann J.B., Smyth M.J. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 2007;117(5):1137–46. DOI: 10.1172/JCI31405
6. Гончарова Т.Г., Кайдарова Д.Р., Кадырбаева Р.Е. и др. Разработка метода ранней диагностики рака легких на основе метилирования клеток мононуклеарной фракции крови. Онкология и радиология Казахстана 2020;3(57):13–20. DOI: 10.52532/2521-6414-2020-3-57-13-20. Goncharova T.G., Kaidarova D.R., Kadyrbaeva R.E. et al. Development of a method for early diagnosis of lung cancer based on methylation of blood mononuclear fraction cells. *Onkologiya i radiologiya Kazakhstana = Oncology and Radiology of Kazakhstan* 2020;3(57):13–20. (In Russ.). DOI: 10.52532/2521-6414-2020-3-57-13-20
7. Guerrero-Preston R., Hadar T., Ostrow K.L. et al. Differential promoter methylation of kinesin family member 1a in plasma is associated with breast cancer and DNA repair capacity. *Oncol Rep* 2014;32(2):505–12.
8. Kanwal R., Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet* 2012; 81(4):303–11. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2011.01809.x
9. Cheishvili D., Christiansen S., Stochinsky R. et al. DNA methylation controls unmethylated transcription start sites in the genome in trans. *Epigenomics* 2017;9(5):611–33. DOI: 10.2217/epi-2016-0141
10. Cheishvili D., Stefanska B., Yi C. et al. A common promoter hypomethylation signature in invasive breast, liver and prostate cancer cell lines reveals novel targets involved in cancer invasiveness. *Oncotarget* 2015;6(32):33253–68. DOI: 10.18632/oncotarget.5291
11. Midthun D.E. Early detection of lung cancer. *F1000Res* 2016;25(5): F1000 Faculty Rev-739. DOI: 10.12688/f1000research.7313.1
12. Drake R.R., Cazares L.H., Jones E.E. et al. Challenges to developing proteomic-based breast cancer diagnostics. *OMICS* 2011;15(5):251–9. DOI: 10.1089/omi.2010.0120
13. Birse C.E., Lagier R.J., FitzHugh W. et al. Blood-based lung cancer biomarkers identified through proteomic discovery in cancer tissues, cell lines and conditioned medium. *Clin Proteomics* 2015;12(1):18. DOI: 10.1186/s12014-015-9090-9
14. Yang R., Pfütze K., Zucknick M. et al. DNA methylation array analyses identified breast cancer associated HYAL2 methylation in peripheral blood. *Int J Cancer* 2015;136(8):1845–55. DOI: 10.1002/ijc.29205
15. Kuchiba A., Iwasaki M., Ono H. et al. Global methylation levels in peripheral blood leukocyte DNA by LUMA and breast cancer: a case-control study in Japanese women. *Br J Cancer* 2014;110(11):2765–71. DOI: 10.1038/bjc.2014.223
16. Parashar S., Cheishvili D., Mahmood N. et al. DNA methylation signatures of breast cancer in peripheral T-cells. *BMC Cancer* 2018;18(1):574. DOI: 10.1186/s12885-018-4482-7
17. Гончарова Т.Г., Кайдарова Д.Р., Омарбаева Н.А. и др. Разработка метода ранней диагностики рака молочной железы на основе эпигенетических маркеров. Онкология и радиология Казахстана 2020;58(4):29–35. DOI: 10.52532/2521-6414-2020-4-58-29-35. Goncharova T.G., Kaidarova D.R., Omarbayeva N.A. et al. Epigenetic markers-based breast cancer early detection method development. *Onkologiya i radiologiya Kazakhstana = Oncology and Radiology of Kazakhstan* 2020;58(4):29–35. (In Russ.). DOI: 10.52532/2521-6414-2020-4-58-29-35
18. Kloten V., Schlenz M., Magnus L. et al. Epigenetic loss of putative tumor suppressor SFRP3 correlates with poor prognosis of lung adenocarcinoma patients. *J Epigenetics* 2018;13(3):217–27. DOI: 10.1080/15592294.2016.1229730
19. Brennan K., Flanagan J.M. Is there a link between genome-wide hypomethylation in blood and cancer risk? *Cancer Prev Res* 2012;5(12):1345–57. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0316
20. Солопова А.Г., Блинов Д.В., Демьянов С.В. и др. Эпигенетические аспекты реабилитации онкогинекологических больных. Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология 2022;15(2):294–303. DOI: 10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2022.141. Solopova A.G., Blinov D.V., Demyanov S.V. et al. Epigenetic aspects in rehabilitation of female cancer patients. *Farmakoeconomika. Sovremennaya farmakoeconomika i farmakoepidemiologiya = Farmakoeconomika. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology* 2022;15(2): 294–303. (In Russ.). DOI: 10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2022.141
21. Luo Y.H., Luo L., Wampfler J.A. et al. 5-year overall survival in patients with lung cancer eligible or ineligible for screening according to US Preventive Services Task Force criteria: a prospective, observational cohort study. *Lancet Oncol* 2019;20(8):1098–108. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30329-8

Благодарность. Авторы выражают благодарность David Cheishvili, Farida Vaisheva и Moshe Szyf за помощь в организации и выполнении эпигенетических исследований.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to David Cheishvili, Farida Vaisheva and Moshe Szyf for their help in organizing and performing epigenetic studies.

Вклад авторов

Т.Г. Гончарова: написание текста статьи, анализ и интерпретация результатов, научное редактирование;

Н.А. Омарбаева: сбор клинического материала и клинических данных, анализ клинического материала;

Д.Р. Кайдарова: идея, организация исследования, разработка концепции;

М.Г. Оразгалиева: сбор и обработка биологического материала, оптимизация методов исследования;

Л.А. Малышева: редактирование.

Authors' contribution

T.G. Goncharova: article writing, analysis and interpretation of the results, scientific editing;

N.A. Omarbayeva: collection of clinical material and clinical data, analysis of clinical material;

D.R. Kaidarova: idea, research organization, concept development;

M.G. Orazgaliyeva: collection and processing of biological material, optimization of research methods;

L.A. Malysheva: editing

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.Г. Гончарова / T.G. Goncharova: <https://orcid.org/0000-0003-2524-8750>

Н.А. Омарбаева / N.A. Omarbayeva: <https://orcid.org/0000-0003-0986-1328>

Д.Р. Кайдарова / D.R. Kaidarova: <https://orcid.org/0000-0002-0969-5983>

М.Г. Оразгалиева / M.G. Orazgaliyeva: <https://orcid.org/0000-0001-8191-2068>

Л.А. Малышева / L.A. Malysheva: <https://orcid.org/0000-0003-4599-4048>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства образования и науки Республики Казахстан AP05131940 «Возможности определения маркеров Т-лимфоцитов в ранней диагностике и прогнозировании рака легких и молочной железы», а также в рамках бюджетной темы Министерства здравоохранения Республики Казахстан OR12165486 «Национальная программа внедрения персонализированной и превентивной медицины в Республике Казахстан».

Funding. The work was performed with the financial support of the grant Ministry of Education and Science of Republic of Kazakhstan of AP05131940 "Possibilities to determine T-lymphocyte markers in early diagnostics and prognosis of lung and breast cancer", and the work was carried out within the framework of the budget topic of Ministry of Health of Republic of Kazakhstan OR12165486 "National program for the implementation of personalized and preventive medicine in the Republic of Kazakhstan".

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальными этическими комитетами Республики Казахстан АО «Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии» (протокол № 13/17 от 28.09.2017) и НАО «Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова» (протокол № 12 (118) от 28.09.2021).

Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The protocol of the study was approved by the local ethical committees of Republic of Kazakhstan: of Kazakh Research Institute of Oncology and Radiology (protocol No. 13/17, 28.09.2017) and Asfendiyarov Kazakh National Medical University (protocol No. 12 (118), 28.09.2021).

All patients signed an informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 11.02.2023. **Принята к публикации:** 12.03.2023.

Article submitted: 11.02.2023. **Accepted for publication:** 12.03.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-100-107



Содержание sEMMPRIN/CD147 в сыворотке крови больных с опухолями костей и его связь с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

Н.Е. Кушлинский, О.В. Ковалева, Ю.Б. Кузьмин, Е.В. Самойлова, П.Л. Прищеп, Е.С. Герштейн, С.Р. Варфоломеева, Д.В. Рогожин, Н.Ю. Соколов, К.А. Борзов, Е.А. Сушенцов, А.К. Валиев, И.С. Стилиди

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Кушлинский Николай Евгеньевич biochimia@yandex.ru

Введение. Иммуноферментный анализ биохимических маркеров является одним из важнейших методов диагностики опухолей. В число таких маркеров входит индуктор экспрессии матричных металлопротеаз EMMPRIN/CD147. Изменение его экспрессии связано с прогрессией некоторых опухолей. Настоящее исследование является первой работой, посвященной изучению содержания растворимой формы трансмембранного гликопротеина EMMPRIN (sEMMPRIN) в сыворотке крови пациентов с различными опухолями костей.

Цель исследования – изучить содержание sEMMPRIN в сыворотке крови больных со злокачественными опухолями костей, его связь с клинико-морфологическими характеристиками новообразований и прогнозом.

Материалы и методы. В исследование включены 88 пациентов со злокачественными опухолями (остеосаркома – 37 случаев, хондросаркома – 39, хордома – 5, саркома Юинга – 7) и пограничными новообразованиями костей (11 случаев), из которых 14 больных – в возрасте до 18 лет. Группу контроля составили 29 здоровых доноров, 8 из которых были в возрасте до 18 лет. Концентрацию sEMMPRIN определяли в сыворотке больных и доноров с помощью реактивов для прямого иммуноферментного анализа “Human EMMPRIN” (R&D, США) в соответствии с инструкциями производителя и выражали в нанограммах (нг) на 1 мл сыворотки крови. Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism 9.4. Для сравнения показателей и оценки их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса. Анализ общей выживаемости выполняли по методу Каплана–Майера.

Результаты. Проведенный нами анализ содержания sEMMPRIN в сыворотке крови пациентов с опухолями костей не выявил статистически значимых различий между контрольной группой и пациентами с пограничными и злокачественными опухолями как у взрослых, так и у детей. Вместе с тем обнаружена тенденция к снижению уровня sEMMPRIN в сыворотке крови при наличии злокачественного новообразования кости по сравнению с соответствующей контрольной группой. Дополнительно нами выявлено, что содержание sEMMPRIN ассоциировано с возрастом и выше в группе обследуемых в возрасте до 18 лет (как здоровых доноров, так и онкологических пациентов). Анализ ассоциации содержания sEMMPRIN с клинико-морфологическими характеристиками не выявил статистически значимых закономерностей, однако наблюдалась тенденция к повышению уровня маркера при прогрессировании заболевания в обеих исследованных возрастных группах, что согласуется с другими исследованиями, в которых анализировались иные солидные опухоли.

Заключение. С помощью иммуноферментного анализа sEMMPRIN выявлен в сыворотке крови у всех обследованных детей и взрослых пациентов с пограничными, злокачественными опухолями костей и у здоровых доноров. Уровни этого маркера в вышеуказанных группах не различались, однако отмечена тенденция к снижению его концентрации у больных саркомами костей по сравнению с контрольной группой независимо от возраста.

Ключевые слова: опухоли костей, sEMMPRIN/CD147, сыворотка крови

Для цитирования: Кушлинский Н.Е., Ковалева О.В., Кузьмин Ю.Б. и др. Содержание sEMMPRIN/CD147 в сыворотке крови больных с опухолями костей и его связь с клинико-морфологическими характеристиками заболевания. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):100–7. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-100-107

The content of sEMMPRIN/CD147 in the blood serum of patients with bone tumors and its relationship with the clinical and morphological characteristics of the disease

N.E. Kushlinskii, O.V. Kovaleva, Yu.B. Kuzmin, E.V. Samoilova, P.L. Prishchep, E.S. Gershtein, S.R. Varfolomeeva, D.V. Rogozhin, N.Yu. Sokolov, K.A. Borzov, E.A. Sushentsov, A.K. Valiev, I.S. Stilidy

N.N. Blokhin National Medical Russian Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia

Contacts: Nikolai Evgenievich Kushlinskii biochimia@yandex.ru

Introduction. Enzyme-linked immunosorbent assay of biochemical markers is one of the most important methods for diagnosing tumors. One of these markers is an inducer of expression of matrix metalloproteases EMMPRIN/CD147. Changes in its expression are associated with the progression of some tumors. This study is the first work devoted to the study of the content of the soluble form of the transmembrane glycoprotein EMMPRIN (sEMMPRIN) in the blood serum of patients with various bone tumors.

Aim. To study the content of sEMMPRIN in the blood serum of patients with malignant bone tumors, its relationship with the clinical and morphological characteristics of neoplasms and prognosis.

Materials and methods. The study included 88 patients with malignant tumors (osteosarcoma – 37 cases, chondrosarcoma – 39, chordoma – 5, Ewing's sarcoma – 7) and borderline (11 cases) bone neoplasms, of which 14 patients were under the age of 18 years. The control group consisted of 29 healthy donors, 8 of which were under the age of 18 years. The concentration of EMMPRIN was determined in the serum of patients and donors with reagents for direct enzyme immunoassay "Human EMMPRIN" (R&D, USA) in accordance with the manufacturer's instructions and expressed in nanograms (ng) per 1 ml of blood serum. The obtained data were processed using the GraphPad Prizm 9.4 program. When comparing indicators and analyzing their relationships, we used the nonparametric Mann–Whitney and Kruskal–Wallis tests. Overall survival was analyzed using the Kaplan–Meier method.

Results. Our analysis of the sEMMPRIN content in the blood serum of patients with bone tumors did not reveal statistically significant differences between the control group and patients with borderline and malignant tumors, both in adults and in children. At the same time, a trend towards a decrease in the level of sEMMPRIN in the blood serum was noted in the presence of a malignant neoplasm of the bone compared with the corresponding control group. Additionally, we found that the content of sEMMPRIN is associated with age and higher in the group of patients under 18 years of age, both among healthy donors and oncological patients. An analysis of the association of sEMMPRIN content with clinical and morphological characteristics did not reveal statistically significant patterns, however, a trend towards an increase in the level of the marker with disease progression in both studied age groups was observed, which is consistent with other studies conducted on other solid tumors.

Conclusion. ELISA revealed the marker sEMMPRIN in the blood serum of all examined children and adults with borderline malignant bone tumors and healthy donors. At the same time, the levels of sEMMPRIN did not differ between the above groups, however, there was a tendency for a decrease in the concentration of the marker in patients with bone sarcomas compared with the control group, regardless of age.

Keywords: bone tumors, sEMMPRIN/CD147, blood serum

For citation: Kushlinskii N.E., Kovaleva O.V., Kuzmin Yu. et al. The content of sEMMPRIN / CD147 in the blood serum of patients with bone tumors and its relationship with the clinical and morphological characteristics of the disease. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(2):100–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-100-107

ВВЕДЕНИЕ

Индуктор экспрессии матриксных металлопротеаз (matrix metalloproteinases, MMP) EMMPRIN/CD147 является трансмембранным белком семейства иммуноглобулинов, который широко экспрессируется в различных тканях и клетках человека (гемопоэтических, эпителиальных и эндотелиальных клетках, фибробластах). В норме данный белок принимает участие в процессах эмбриогенеза и ангиогенеза, а также клеточной миграции и инвазии при заживлении ран. Помимо участия в нормальных физиологических процессах EMMPRIN вовлечен в развитие различных заболеваний, например, он является рецептором для инвазии малярийного плазмодия в эритроциты [1] и связан с прогрессированием злокачественных новообразований [2–4]. В контексте канцерогенеза EMMPRIN/CD147 выпол-

няет следующие функции: 1) способствует секреции MMP-1, -9 и MT1-MMP опухолевыми и стромальными клетками, что приводит к деградации базальной мембраны и внеклеточного матрикса (ВКМ), а также к инвазии и метастазированию опухоли [5]; 2) стимулирует опухолевый ангиогенез за счет увеличения содержания фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) в опухоли [6]; 3) регулирует экспрессию и активность монокарбоксилатных транспортеров-1 (MCT-1, MCT-4), которые способствуют переносу молочной кислоты, образующейся при анаэробном гликолизе [7]; 4) принимает участие в пролиферации посредством активации фосфатидилинозитол-3-киназы (phosphoinositide-3-kinase, PI3K) и MAPK-киназных каскадов [8]; 5) регулирует адгезию путем взаимодействия с интегринами $\alpha\beta1$ и $\alpha6\beta1$ [9].

В дополнение к локализации в плазматической мембране EMMPRIN также идентифицирован во внеклеточной среде. Исследования убедительно доказали, что образование растворимой формы данного белка происходит благодаря активности MT1-MMP (MMP-14), которая осуществляет отрезание растворимой формы EMMPRIN (sEMMPRIN) от мембраносвязанного белка [10]. Высвобожденный протеолитический фрагмент способен взаимодействовать с мембранным EMMPRIN, тем самым осуществляя положительную обратную связь. Некоторые исследования показали, что полноразмерный EMMPRIN может высвобождаться с поверхности клетки в растворимой форме как в составе экзосом [10], так и без участия микровезикул [11].

Для большинства солидных новообразований повышенная тканевая экспрессия EMMPRIN ассоциирована с более злокачественным фенотипом опухоли и считается фактором неблагоприятного прогноза [8]. Исследований, посвященных изучению растворимой формы данного белка, немного, и в большинстве своем они нацелены на определение его функциональной значимости на моделях *in vitro*. Таким образом, клиническая и прогностическая роль sEMMPRIN для различных типов опухолей на данном этапе исследований неизвестна.

Цель исследования — изучение содержания sEMMPRIN в сыворотке крови больных злокачественными опухолями костей, его связи с клинико-морфологическими характеристиками новообразований и прогнозом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 99 пациентов с пограничными ($n = 11$) и злокачественными ($n = 88$; 50 мужчин и 38 женщин) новообразованиями костей (остеосаркома — 37 случаев, хондросаркома — 39, саркома Юинга — 7, хордома — 5), из которых 14 больных — в возрасте до 18 лет. Группу контроля составили 29 здоровых доноров (мужчин и женщин), 8 из которых были в возрасте до 18 лет. Медиана возраста пациентов старше 18 лет составила 41,1 года (33–57 лет), в то время как медиана возраста пациентов до 18 лет — 13,5 года (11,7–15,0 лет).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием пациентов и здоровых доноров, соответствуют стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Все больные проходили обследование и лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина. Клинико-рентгенологический диагноз новообразования кости подтвержден данными морфологического исследования опухоли в соответствии с Международной гистологической классификацией опухолей костей Всемирной организации здравоохранения (2020). Характеристика участников исследования представлена в табл. 1–3.

Концентрацию EMMPRIN определяли в сыворотке здоровых доноров и пациентов с пограничными

Таблица 1. Характеристика всех участников исследования

Table 1. Characteristics of all study participants

Группа Group	Число наблюдений, n (%) Number of patients, n (%)	
	до 18 лет age under 18 years	старше 18 лет age over 18 years
Контроль Control	8 (27,6)	21 (72,4)
Пограничные опухоли костей Borderline bone tumors	—	11 (100)
Злокачественные опухоли костей Malignant bone tumors	14 (15,9)	74 (84,0)

и злокачественными опухолями костей с помощью набора реактивов для прямого иммуноферментного анализа “Human EMMPRIN” (R&D, США) в соответствии с инструкциями производителя. Содержание маркеров выражали в нанограммах (нг) на 1 мл сыворотки крови.

Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prizm 9.4. Для сравнения показателей и анализа их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса. Анализ общей выживаемости выполняли по методу Каплана–Майера. Сравнение статистической значимости различий между показателями проводили с помощью логарифмического рангового критерия. Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе исследования оценили уровень sEMMPRIN в контрольной группе и у пациентов с различными морфологическими вариантами опухолей костей. Медиана содержания sEMMPRIN в сыворотке крови здоровых доноров в возрасте 18 лет и старше составила 5,3 (4,1–5,9) нг/мл и не отличалась от группы больных со злокачественными опухолями костей соответствующего возраста — 4,7 (4,1–5,5) нг/мл. Результаты исследования представлены в табл. 4.

Согласно данным, представленным в табл. 4, концентрация sEMMPRIN в сыворотке крови больных в возрасте 18 лет и старше с пограничными опухолями костей (5,24 нг/мл (3,6–5,9 нг/мл)) не отличалась от этого показателя в группах злокачественных новообразований и контроля (5,29 нг/мл (4,1–5,9 нг/мл)). Однако следует отметить слабую тенденцию к снижению медиан содержания данного белка в сыворотке крови при развитии новообразований костей у пациентов всех возрастов. Также выявлено, что концентрация sEMMPRIN в сыворотке крови у детей в целом выше, чем у взрослых, как в группе здоровых доноров,

Таблица 2. Характеристика пациентов со злокачественными новообразованиями костей старше 18 лет

Table 2. Characteristics of patients with malignant bone neoplasms over the age of 18 years

Показатель Parameter	Число наблюдений, n (%) Number of patients, n (%)
Пол: Gender:	
мужской male	42 (56,8)
женский female	32 (43,2)
Гистологический тип: Histological type:	
остеосаркома osteosarcoma	26 (35,2)
хондросаркома chondrosarcoma	39 (52,6)
хордома chordoma	5 (6,8)
саркома Юинга Ewing's sarcoma	4 (5,4)
Стадия: Stage:	
I	17 (23,0)
II	48 (64,9)
III–IV	9 (12,1)
Степень дифференцировки опухоли: Grade:	
G ₁₋₂	36 (48,7)
G ₃	34 (46,0)
NA	4 (5,3)
Размер опухоли: Tumor size:	
T1	12 (16,3)
T2	57 (77,1)
T3–4	5 (6,6)
Наличие регионарных метастазов: Nodal status:	
N0	71 (95,9)
N1	3 (4,1)
Наличие отдаленных метастазов: Metastasis:	
M0	71 (95,9)
M1	3 (4,1)
Тип кости: Type of the bone:	
губчатая/плоская spongy/flat	37 (50,0)
трубчатая tubular	37 (50,0)
Локализация опухоли: Tumor location:	
верхняя конечность upper limb	12 (17,2)
грудная клетка/позвоночник thoracic cage/vertebral column	9 (11,1)
таз pelvis	28 (37,9)
нижняя конечность lower limb	25 (33,8)

Таблица 3. Характеристика пациентов со злокачественными новообразованиями костей в возрасте до 18 лет

Table 3. Characteristics of patients with malignant neoplasms of bones under the age of 18 years

Показатель Parameter	Число наблюдений, n (%) Number of patients, n (%)
Пол: Gender:	
мужской male	8 (57,2)
женский female	6 (42,8)
Гистологический тип: Histological type:	
остеосаркома osteosarcoma	11 (78,6)
саркома Юинга Ewing's sarcoma	3 (21,4)
Стадия: Stage:	
II	11 (78,6)
III–IV	3 (21,4)
Степень дифференцировки опухоли: Grade:	
G ₃	11 (78,6)
NA	3 (21,4)
Наличие отдаленных метастазов: Metastasis:	
M0	11 (78,6)
M1	3 (21,4)
Тип кости: Type of the bone:	
губчатая/плоская spongy/flat	1 (7,1)
трубчатая tubular	13 (92,5)
Локализация опухоли: Tumor location:	
таз pelvis	1 (7,1)
нижняя конечность lower limb	13 (92,5)

так и в группе больных со злокачественными опухолями костей ($p \leq 0,05$).

Результаты анализа содержания sEMMPRIN в сыворотке крови с учетом основных клинико-морфологических характеристик пациентов в возрасте 18 лет и старше представлены в табл. 5.

Проведенный анализ показал отсутствие ассоциации уровней sEMMPRIN в сыворотке крови с полом и возрастом пациентов, а также со стадией заболевания, наличием регионарных и отдаленных метастазов. Однако наблюдалась значимая связь содержания sEMMPRIN с максимальным размером первичной опухоли: при новообразованиях большего размера выявлена более высокая концентрация сывороточного

Таблица 4. Содержание sEMMPRIN у пациентов с новообразованиями костей, нг/мл
Table 4. Levels of sEMMPRIN in patients with bone neoplasms, ng/ml

Группа Groups	Возраст ≥18 лет Age ≥18 years			Возраст <18 лет Age <18 years		
	Медиана Median	Квартили (25–75 %) Quartiles	p	Медиана Median	Квартили (25–75 %) Quartiles	p
Контроль Control	5,3	4,1–5,9	—	6,4	4,8–10,2	—
Пограничные опухоли костей Borderline bone tumors	5,2	3,6–5,9	Ns	—	—	—
Злокачественные опухоли костей Malignant bone tumors	4,7	4,1–5,5	Ns	5,9	5,0–8,1	Ns

Примечание. Здесь и в табл. 5–7: Ns — различия статистически незначимы.
Note. Here and in Tables 5–7: Ns — not significant differences.

Таблица 5. Содержание sEMMPRIN у больных со злокачественными опухолями костей в возрасте ≥18 лет с учетом клинико-морфологических характеристик, нг/мл
Table 5. The content of sEMMPRIN in patients with malignant bone tumors aged ≥18 years, taking into account the clinical and morphological characteristics, ng/ml

Показатель Parameter	Ме- диана Median	Квартили (25–75 %) Quartiles	p
Возраст, лет: Age, years:			
≤41	4,6	4,1–5,9	Ns
>41	4,7	4,2–5,2	
Пол: Gender:			
мужской male	4,7	4,1–5,2	Ns
женский female	4,7	4,1–6,3	
Гистологический тип: Histological type:			
остеосаркома osteosarcoma	4,9	4,2–6,6	Ns
хондросаркома chondrosarcoma	4,6	3,9–5,0	
хордома chordoma	5,3	5,2–7,0	
саркома Юинга Ewing's sarcoma	4,7	4,0–7,4	
Стадия: Stage:			
I	5,0	4,1–6,5	Ns
II	4,6	4,0–5,1	
III–IV	5,4	4,6–7,1	
Степень дифференци- ровки опухоли: Grade:			
G ₁₋₂	4,5	3,9–5,0	Ns
G ₃	4,8	4,4–6,5	

Размер опухоли: Tumor size:			
T1	5,1	4,6–6,4	p ≤0,05*
T2	4,6	3,9–5,1	
T3–4	5,7	5,1–7,6	
Наличие регионарных метастазов: Nodal status:			
N0	4,7	4,1–5,4	Ns
N1	4,9	4,4–5,7	
Наличие отдаленных метастазов: Metastasis:			
M0	4,7	4,1–5,4	Ns
M1	6,5	4,4–17,2	
Тип кости: Type of the bone:			
губчатая/плоская spongy/flat	4,7	4,1–6,1	Ns
трубчатая tubular	4,6	4,2–5,4	
Локализация опухоли: Location:			
верхняя конечность upper limb	4,6	3,8–5,7	Ns
грудная клетка/ позвоночник thoracic cage/vertebral column	5,2	4,8–8,2	
кости таза pelvis	4,7	3,9–5,0	
нижняя конечность lower limb	4,6	4,2–5,4	

*Различия между группами T2 и T3–4.
Примечание. При p ≤0,05 различия статистически значимы.
*Differences between the T2 and T3–4 groups.
Note. Differences are statistically significant at p ≤0.05.

sEMMPRIN. Также отмечена тенденция к повышению уровня исследуемого маркера в сыворотке крови пациентов со злокачественными опухолями костей с низкой дифференцировкой.

Результаты анализа уровня sEMMPRIN в сыворотке крови пациентов с саркомами костей в возрасте до 18 лет в зависимости от основных клинико-морфологических характеристик заболевания представлены в табл. 6.

В группе пациентов в возрасте до 18 лет не выявлено значимых ассоциаций с клиническо-морфологическими характеристиками заболевания.

Таблица 6. Содержание sEMMPRIN у пациентов со злокачественными опухолями костей в возрасте до 18 лет с учетом клинико-морфологических характеристик, нг/мл

Table 6. The content of sEMMPRIN in patients with malignant bone tumors under the age of 18 years, taking into account the clinical and morphological characteristics, ng/ml

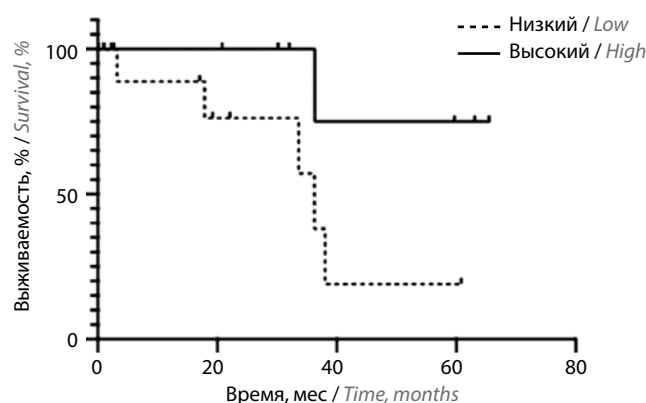
Показатель Parameter	Медиана Median	Квартили (25–75 %) Quartiles (25–75 %)	p
Возраст, лет: Age, years:			
≤13	6,6	5,1–9,6	Ns
>13	5,7	4,6–7,9	
Пол: Gender:			
мужской male	6,3	4,9–8,5	Ns
женский female	5,7	4,9–7,4	
Гистологический тип: Histological type:			
остеосаркома osteosarcoma	5,8	5,1–8,7	Ns
саркома Юинга Ewing's sarcoma	6,6	4,2–6,7	
Стадия: Stage:			
II	5,7	4,6–6,7	Ns
III–IV	7,9	6,6–8,9	
Наличие отдаленных метастазов: Metastasis:			
M0	5,7	4,6–6,7	Ns
M1	7,9	6,6–8,9	
Тип кости: Type of the bone:			
губчатая/плоская spongy/flat	6,6	—	—
трубчатая tubular	5,8	4,9–8,3	
Локализация: Location:			
кости таза pelvis	6,6	—	—
нижняя конечность lower limb	5,8	4,9–8,3	

На втором этапе исследования оценили прогностическую значимость sEMMPRIN в группе взрослых пациентов. Проведенный анализ показал, что высокая продукция sEMMPRIN может служить фактором благоприятного прогноза при опухолях костей (отношение рисков 0,166; $p \leq 0,05$). Результаты прогностической значимости данного маркера представлены на рисунке.

Данное исследование является первой работой, посвященной изучению содержания растворимой формы трансмембранного гликопротеина EMMPRIN в сыворотке крови пациентов с различными опухолями костей. В него включены больные с пограничными и злокачественными опухолями костей различных гистологических вариантов: остеосаркомой, хондросаркомой, хордомой и саркомой Юинга. Согласно данным литературы, тканевая экспрессия EMMPRIN повышена в большинстве солидных новообразований, в том числе в остеосаркомах [12].

Также следует отметить, что иммуногистохимически экспрессию этого белка наблюдали в опухолевых, а не стромальных клетках новообразований, и уровень его экспрессии коррелирует с более распространенной стадией заболевания и неблагоприятным прогнозом [13]. Исследований экспрессии EMMPRIN при других типах опухолей костей не проводили. Растворимая форма данного белка и ее содержание в биологических жидкостях человека изучены в значительно меньшей степени, чем тканевая экспрессия. Так, показано, что sEMMPRIN может быть более эффективным диагностическим маркером гепатоцеллюлярного рака по сравнению с α -фетопротеином [14]. На моделях рака молочной железы, эпителиоидной саркомы и ларингофарингеальной карциномы показано, что растворимая форма EMMPRIN индуцирует экспрессию MMP-2 фибробластами [15–17].

Проведенный нами анализ содержания sEMMPRIN в сыворотке крови пациентов с опухолями костей



Прогностическая значимость sEMMPRIN в сыворотке крови у пациентов со злокачественными опухолями костей старше 18 лет относительно медианы содержания исследуемого белка
Prognostic significance of blood serum sEMMPRIN in patients with malignant bone tumors over the age of 18 relative to the median content of the studied protein

не выявил статистически значимых различий между контрольной группой и группой пациентов с пограничными и злокачественными опухолями как у взрослых, так и у детей. Вместе с тем отмечена тенденция к снижению уровня этого маркера в сыворотке крови при наличии злокачественного новообразования кости по сравнению с соответствующей контрольной группой. Дополнительно нами выявлено, что содержание sEMMPRIN ассоциировано с возрастом и выше в группе пациентов в возрасте до 18 лет как у здоровых доноров, так и у онкологических пациентов. Анализ ассоциации содержания sEMMPRIN с клинико-морфологическими характеристиками не выявил статистически значимых закономерностей, однако наблюдалась тенденция к повышению уровня этого маркера с прогрессией заболевания в обеих исследованных возрастных группах, что согласуется с другими исследованиями, проведенными на различных солидных опухолях [8, 18].

На заключительном этапе исследования проведен анализ прогностической значимости sEMMPRIN. Нами впервые показано, что высокое содержание этого

маркера в сыворотке крови пациентов в случае обнаружения опухоли в кости является фактором благоприятного прогноза. В целом для большинства солидных новообразований показана неблагоприятная прогностическая роль данного белка, однако для немелкоклеточного рака легкого и рака шейки матки не выявлено прогностической значимости этого маркера [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы большое внимание исследователей привлекает возможность использования экзосом в клинической практике для проведения различных диагностических процедур, а также прогностического мониторингирования. Показано, что изучение экспрессии растворимой формы EMMPRIN в составе экзосом при злокачественных новообразованиях может не только иметь в перспективе диагностическую и прогностическую значимость, но и служить эффективным маркером в мониторинге ответа опухоли на терапию, например при колоректальном раке [20] и немелкоклеточном раке легкого [21].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Crosnier C., Bustamante L.Y., Bartholdson S.J. et al. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2011;480(7378):534–7. DOI: 10.1038/nature10606
2. Zeng W., Su J., Wu L. et al. CD147 promotes melanoma progression through hypoxia-induced MMP2 activation. *Curr Mol Med* 2014;14(1):163–73. DOI: 10.2174/15665240113136660077
3. Kong L.M., Liao C.G., Zhang Y. et al. A regulatory loop involving miR-22, Sp1, and c-Myc modulates CD147 expression in breast cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 2014;74(14):3764–78. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3555
4. Kong L.M., Yao L., Lu N. et al. Interaction of KLF6 and Sp1 regulates basigin-2 expression mediated proliferation, invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2016;7(19):27975–87. DOI: 10.18632/oncotarget.8564
5. Grass G.D., Toole B.P. How, with whom and when: an overview of CD147-mediated regulatory networks influencing matrix metalloproteinase activity. *Biosci Rep* 2015;36(1):e00283. DOI: 10.1042/BSR20150256
6. Pinheiro C., Garcia E.A., Morais-Santos F. et al. Reprogramming energy metabolism and inducing angiogenesis: co-expression of monocarboxylate transporters with VEGF family members in cervical adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2015;15:835. DOI: 10.1186/s12885-015-1842-4
7. Li S., Nguyen T.T., Bonanno J.A. CD147 required for corneal endothelial lactate transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(7):4673–81. DOI: 10.1167/iovs.14-14386
8. Xin X., Zeng X., Gu H. et al. CD147/EMMPRIN overexpression and prognosis in cancer: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2016;6:32804. DOI: 10.1038/srep32804
9. Berditchevski F., Chang S., Bodorova J., Hemler M.E. Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6. *J Biol Chem* 1997;272(46):29174–80. DOI: 10.1074/jbc.272.46.29174
10. Egawa N., Koshikawa N., Tomari T. et al. *J Biol Chem* 2006;281(49):37576–85. DOI: 10.1074/jbc.M606993200
11. Sidhu S.S., Mengistab A.T., Tauscher A.N. et al. The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions. *Oncogene* 2004;23(4):956–63. DOI: 10.1038/sj.onc.1207070
12. Kim H.-S., Kim H.J., Lee M.R., Han I. EMMPRIN expression is associated with metastatic progression in osteosarcoma. *BMC Cancer* 2021;21(1):1059. DOI: 10.1186/s12885-021-08774-9
13. Lu Q., Lv G., Kim A. et al. Expression and clinical significance of extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN/CD147, in human osteosarcoma. *Oncol Lett* 2013;5(1):201–7. DOI: 10.3892/ol.2012.981
14. Wu J., Hao Z.W., Zhao Y.X. et al. Full-length soluble CD147 promotes MMP-2 expression and is a potential serological marker in detection of hepatocellular carcinoma. *J Transl Med* 2014;12:190. DOI: 10.1186/1479-5876-12-190
15. Taylor P.M., Woodfield R.J., Hodgkin M.N. et al. Breast cancer cell-derived EMMPRIN stimulates fibroblast MMP2 release through a phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase catalyzed pathway. *Oncogene* 2002;21(37):5765–72. DOI: 10.1038/sj.onc.1205702
16. Hanata K., Yamaguchi N., Yoshikawa K. et al. Soluble EMMPRIN (extra-cellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates the migration of HEp-2 human laryngeal carcinoma cells, accompanied by increased MMP-2 production in fibroblasts. *Arch Histol Cytol* 2007;70(5):267–77. DOI: 10.1679/aohc.70.267
17. Koga K., Nabeshima K., Aoki M. et al. Emmprin in epithelioid sarcoma: expression in tumor cell membrane and stimulation of MMP-2 production in tumor-associated fibroblasts. *Int J Cancer* 2007;120(4):761–8. DOI: 10.1002/ijc.22412
18. Kong L.M., Liao C.G., Chen L. et al. Promoter hypomethylation up-regulates CD147 expression through increasing Sp1 binding and associates with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med* 2011;15(6):1415–28. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01124.x

19. Hakuma N., Betsuyaku T., Kinoshita I. et al. High incidence of extracellular matrix metalloproteinase inducer expression in non-small cell lung cancers. Association with clinicopathological parameters. *Oncology* 2007;72(3–4):197–204. DOI: 10.1159/000112826
20. Yoshioka Y., Kosaka N., Konishi Y. et al. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat Commun* 2014;5:3591. DOI: 10.1038/ncomms4591
21. Qiao X., Gu Y., Yu J. et al. The combination of CD147 and MMP-9 Serum levels is identified as novel chemotherapy response markers of advanced non-small-cell lung cancer. *Dis Markers* 2020;2020:8085053. DOI: 10.1155/2020/8085053

Вклад авторов

Н.Е. Кушлинский, О.В. Ковалева: разработка дизайна исследования, написание текста статьи;
Ю.Б. Кузьмин, Е.В. Самойлова, П.Л. Прищеп: получение данных для анализа;
Е.С. Герштейн, С.Р. Варфоломеева, Д.В. Рогожин, Н.Ю. Соколов: анализ полученных данных;
К.А. Борзов, Е.А. Сушенцов, А.К. Валиев: планирование исследования, обсуждение результатов, редактирование;
И.С. Стилиди: обсуждение дизайна исследования и результатов.

Authors' contributions

N.E. Kushlinskii, O.V. Kovaleva: development of the design of the study, article writing;
Yu.B. Kuzmin, E.V. Samoilova, P.L. Prishchep: obtaining data for analysis;
E.S. Gershtein, S.R. Varfolomeeva, D.V. Rogozhin, N.Yu. Sokolov: analysis of the obtained data;
K.A. Borzov, E.A. Sushentsov, A.K. Valiev: planning the study, discussing the results, editing;
I.S. Stilidi: discussion of study design and results.

ORCID авторов / ORCID authors

Н.Е. Кушлинский / N.E. Kushlinskii: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>
О.В. Ковалева / O.V. Kovaleva: <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>
Ю.Б. Кузьмин / Yu.B. Kuzmin: <https://orcid.org/0000-0001-9684-2509>
Е.В. Самойлова / E.V. Samoilova: <https://orcid.org/0000-0003-3178-8331>
П.Л. Прищеп / P.L. Prishchep: <https://orcid.org/0000-0003-0810-8238>
Е.С. Герштейн / E.S. Gershtein: <https://orcid.org/0000-0002-3321-801X>
С.Р. Варфоломеева / S.R. Varfolomeeva: <https://orcid.org/0000-0001-6131-1783>
Д.В. Рогожин / D.V. Rogozhin: <https://orcid.org/0000-0003-0777-9152>
Н.Ю. Соколов / N.Yu. Sokolov: <http://orcid.org/0000-0002-0706-9575>
К.А. Борзов / K.A. Borzov: <https://orcid.org/0000-0002-3512-0390>
Е.А. Сушенцов / E.A. Sushentsov: <https://orcid.org/0000-0003-3672-1742>
А.К. Валиев / A.K. Valiev: <https://orcid.org/0000-0002-2038-3729>
И.С. Стилиди / I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>

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

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

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.
Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia.
The patients gave written informed consent to the publication of their data.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-108-116



Сравнительная оценка уровней опухолеассоциированных микроРНК экзосом плазмы крови и асцитической жидкости пациентов с раком яичников

Е.И. Джугашвили¹, Н.В. Юнусова², А.И. Яловая³, А.Е. Григорьева³, Е.Е. Середа², Л.А. Коломиец², С.Н. Тамкович^{1,3}

¹ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»; Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2;

²Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный медицинский исследовательский центр Российской академии наук»; 634009 Томск, пер. Кооперативный, 5;

³ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»; Россия, 630090 Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8

Контакты: Светлана Николаевна Тамкович s.tamkovich@ngs.ru

Введение. Рак яичников (РЯ) входит в число злокачественных новообразований женской репродуктивной системы с высокой летальностью. Применяемые в настоящее время онкомаркеры данной патологии не обладают высокими чувствительностью и специфичностью. В связи с этим перспективными направлениями молекулярной онкологии являются исследование механизмов канцерогенеза РЯ и поиск новых биомаркеров жидкостной биопсии для ранней неинвазивной диагностики новообразований. Известно, что опухолевые клетки активно секретируют во внеклеточное пространство экзосомы, в состав которых входят биологически активные молекулы, участвующие в канцерогенезе и претендующие на роль диагностических маркеров. Ранее было показано, что микроРНК-24 (miR-24) и микроРНК-101 (miR-101) переносятся в составе экзосом при РЯ и участвуют в процессе деградации внеклеточного матрикса, ремоделировании стромы, ангиогенезе и подвижности раковых клеток.

Цель исследования – оценка представленности и диагностической значимости miR-24 и miR-101 в экзосомах плазмы и асцитической жидкости больных РЯ.

Материалы и методы. В исследование включены образцы крови и асцитической жидкости больных РЯ ($n = 20$) и образцы крови здоровых женщин ($n = 19$). Экзосомальную природу везикул подтверждали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, трекового анализа и проточной цитофлуориметрии. После выделения экзосомальной РНК определяли относительный уровень микроРНК с использованием обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Наибольшая концентрация экзосом выявлена в асцитической жидкости больных РЯ, при этом концентрация экзосом в плазме крови этих пациенток оказалась достоверно выше, чем у здоровых женщин. Относительные уровни miR-24 и miR-101 в экзосомах плазмы крови здоровых женщин были достоверно выше, чем в экзосомах плазмы крови и асцитической жидкости больных РЯ; при этом уровни этих микроРНК в экзосомах плазмы и асцитической жидкости пациентов достоверно не различались.

Заключение. Полученные результаты подтверждают перспективность экзосомальных miR-101 и miR-24 для диагностики РЯ методом жидкостной биопсии.

Ключевые слова: экзосомы, плазма, асцит, опухолеассоциированные микроРНК, miR-24-3p, miR-101, рак яичников

Для цитирования: Джугашвили Е.И., Юнусова Н.В., Яловая А.И. и др. Сравнительная оценка уровней опухолеассоциированных микроРНК экзосом плазмы крови и асцитической жидкости пациентов с раком яичников. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):108–116. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-108-116

Comparative assessment of the exosomal tumor-associated microRNA levels in blood plasma and ascitic fluid in ovarian cancer patients

E.I. Dzhusashvili¹, N.V. Yunusova², A.I. Yalovaya³, A.E. Grigorieva³, E.E. Sereda², L.A. Kolomiets², S.N. Tamkovich^{1,3}

¹Novosibirsk State University; 2 Pirogova St., Novosibirsk 630090, Russia;

²Scientific Research Institute of Oncology of the Tomsk National Medical Research Center of the Russian Academy of Sciences; 5 Cooperative Lane, Tomsk 634009, Russia;

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 8 Akademika Lavrent'eva Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia

Contacts: Svetlana Nikolaevna Tamkovich s.tamkovich@g.nsu.ru

Introduction. Ovarian cancer (OC) is one of the malignant neoplasms of the female reproductive system with a high mortality rate. Currently used tumor markers of this pathology do not have high sensitivity and specificity. In this regard, promising areas of molecular oncology are the study of the mechanisms of carcinogenesis of OC and the search for new biomarkers of liquid biopsy for early non-invasive diagnosis of neoplasms. It is known that tumor cells actively secrete exosomes into the extracellular space, which include biologically active molecules involved in carcinogenesis and claiming to be diagnostic markers. It was previously shown that microRNA-24 (miR-24) and microRNA-101 (miR-101) are transported as part of exosomes in OC and are involved in the degradation of the extracellular matrix, stromal remodeling, angiogenesis, and cancer cell motility.

Aim. To evaluate the representation and diagnostic significance of miR-24 and miR-101 in plasma exosomes and ascitic fluid of OC patients.

Materials and methods. The study included blood and ascitic fluid samples from OC patients ($n = 20$) and blood samples from healthy women ($n = 19$). The exosomal nature of the vesicles was confirmed by transmission electron microscopy, nanotracing analysis, and flow cytometry. After isolation of exosomal RNA, the relative level of miRNA was determined using reverse transcription and real-time polymerase chain reaction.

Results. The highest concentration of exosomes was found in the ascitic fluid of OC patients, while the concentration of exosomes in the blood plasma of these patients was significantly higher than in healthy women. Relative levels of miR-24 and miR-101 in exosomes of blood plasma of healthy women were significantly higher than in exosomes of blood plasma and ascitic fluid of OC patients; at the same time, the levels of these miRNAs in exosomes of plasma and ascitic fluid of patients did not differ significantly.

Conclusion. The results obtained confirm the promise of exosomal miR-101 and miR-24 for the diagnosis of OC by liquid biopsy.

Keywords: exosomes, plasma, ascites, tumor-associated microRNAs, miR-24-3p, miR-101, ovarian cancer

For citation: Dzhugashvili E.I., Yunusova N.V., Yalovaya A.I. et al. Comparative assessment of the exosomal tumor-associated microRNA levels in blood plasma and ascitic fluid in ovarian cancer patients. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(2):108–16. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-108-116

ВВЕДЕНИЕ

Частота развития перитонеальной диссеминации при первичном раке яичников (РЯ) достигает высоких значений, в том числе из-за поздней диагностики заболевания, что в дальнейшем отрицательно влияет на эффективность хирургического и химиотерапевтического лечения [1]. Отсутствие высокочувствительных и специфичных онкомаркеров для раннего выявления РЯ приводит к тому, что 5-летняя выживаемость пациенток не достигает 30 % [2]. Асцитическая жидкость в малом количестве обнаруживается уже на начальных стадиях онкологического процесса, причем по мере прогрессирования РЯ ее объем увеличивается. Известно, что асцитическая жидкость является средой с уникальным опухолевым микроокружением и содержит как биологически активные молекулы, так и секретируемые опухолевыми клетками внеклеточные везикулы [3]. Среди внеклеточных везикул наибольший интерес представляют экзосомы — мембранные везикулы размером 30–150 нм, несущие на своей поверхности тетраспанины CD9, CD63 и CD81 [4]. Экзосомы не только паракринно влияют на окружающие клетки, но и передают информацию клеткам отдаленных органов. Показано, концентрация экзосом в крови повышается при различных злокачественных новообразованиях [5–8], при этом в асцитической жидкости больных РЯ их

содержание выше, чем в плазме крови [9]. Липидный бислой защищает экзосомальные микроРНК от гидролиза нуклеазами, что увеличивает время циркуляции таких РНК в отличие от свободно циркулирующих микроРНК в крови и других биологических жидкостях [10, 11]. На сегодняшний день неизвестно, как именно происходит сортировка некодирующих РНК в экзосомы, тем не менее информация об опухолеассоциированных микроРНК увеличивается с каждым годом. На различных клеточных моделях и тканях опухолей было показано, что miR-24-3p и miR-101 участвуют в эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП), ингибируют апоптоз, стимулируют пролиферацию и ангиогенез, а также участвуют в клеточной миграции и метастазировании [12–14]. Однако до сих пор неизвестны представленность и диагностическая значимость данных микроРНК в экзосомах плазмы и асцитической жидкости больных РЯ. Поскольку при РЯ микроРНК-24 (miR-24) и микроРНК-101 (miR-101) вовлечены в механизмы канцерогенеза и метастазирования, представляется актуальным провести сравнительную оценку уровней данных микроРНК в составе экзосом биологических жидкостей у здоровых женщин (ЗЖ) и пациенток с РЯ для оценки их применимости в качестве биомаркеров для жидкостной биопсии, а также в качестве прогностических маркеров агрессивного течения заболевания.

Цель исследования — оценка представленности и диагностической значимости miR-24 и miR-101 в экзосомах плазмы и асцитической жидкости больных РЯ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. Образцы крови ЗЖ, не имевших онкологической патологии и заболеваний репродуктивной системы, а также генетически не предрасположенных к ним ($n = 19$; средний возраст 43 года), получены из ГБУЗ НСО «Центральная клиническая больница», образцы крови и асцитической жидкости первичных больных РЯ ($n = 20$; средний возраст 56 лет) — из отделения гинекологии Научно-исследовательского института онкологии Томского национального медицинского исследовательского центра. Характеристика пациенток с РЯ представлена в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика пациенток с раком яичников ($n = 20$)

Table 1. Characteristics of the patients with ovarian cancer ($n = 20$)

Показатель Parameter	Число больных, n (%) Number of patients, n (%)
Серозная карцинома Serous carcinoma	20 (100)
Стадия по классификации FIGO (2013): FIGO (2013) stage:	
IIВ	2 (10)
IIIВ	3 (15)
IIIC	15 (75)
Высокая степень злокачественности High malignancy grade	20 (100)
Объем асцитической жидкости, мл: Ascitic fluid volume, mL:	
<200	5 (25)
200–1000	5 (25)
>1000	10 (50)

Примечание. Здесь и в табл. 3 и 4: FIGO — Международная федерация акушерства и гинекологии (International Federation of Obstetrics and Gynecology).

Note. Here and in Tables 3 and 4: FIGO — International Federation of Obstetrics and Gynecology.

Кровь и асцитическая жидкость больных РЯ были собраны до начала лечения. Объем асцитической жидкости оценивали с помощью ультразвукового исследования. Были сформированы клинические подгруппы больных РЯ с малым (<200 мл), средним (200–1000 мл) и большим (>1000 мл) объемами асцитической жидкости. Для определения индекса перитонеального канцероматоза (peritoneal cancer index, PCI) использовали компьютерную томографию и/или диагностическую лапароскопию. Значение этого показателя у включенных в исследование больных было в диапазоне от 8 до 16 баллов. Устанавливали наличие в семейном анамнезе РЯ или РЯ в сочетании с раком молочной железы.

Выделение и характеристика экзосом. Экзосомы выделяли из плазмы (из 18 мл венозной крови) и асцитической жидкости (из 18–20 мл) с помощью ультрафильтрации и последующего ультрацентрифугирования, как описано ранее [15]. Образцы экзосом ресуспендировали в 400 мкл фосфатного буфера (10 mM фосфатный буфер; 0,15 M NaCl; pH 7,5), аликвотировали и хранили при температуре -80°C или в жидком азоте. Аликвоты размораживали 1 раз перед использованием.

Размер везикул и целостность их мембран оценивали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), как описано ранее [16].

Трековый анализ проводили на анализаторе частиц NanoSight® LM10 с использованием голубого лазера (45 мВ на длине волны 488 нм) и камеры C11440-5B. Измерение проводили трижды согласно инструкциям по использованию прибора: длительность записи 1 мин, чувствительность камеры 15 у. е., пороговый уровень 5 у. е. На видео анализировали не менее 200 треков. Для оценки данных использовали программное обеспечение NTA версии 2.3.

Концентрацию экзосомального белка определяли с помощью коммерческого набора NanoOrange Protein (Molecular Probes, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Оценку CD9/CD63/CD81/CD24 субпопуляций экзосом плазмы крови и асцитической жидкости проводили методом проточной цитофлуориметрии, как описано ранее [9], в ЦКП «Медицинская геномика» Томского национального исследовательского медицинского центра. Среднюю интенсивность флуоресценции (mean fluorescence intensity, MFI) анализировали и сравнивали с изотип-контролем (BD bioscience, Германия) и отрицательным контролем.

Оценка относительных уровней микроРНК. РНК выделяли из 66 мкл экзосом плазмы и асцитической жидкости (полученных из 3 мл крови или асцитической жидкости для исследования уровня 3 микроРНК) с использованием коммерческого набора (Biosilica, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Выделенную РНК концентрировали осаждением с гликогеном и изопропанолом и растворяли в 35 мкл воды [15]. Количество выделенной РНК определяли спектрофотометрически с помощью Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, США).

Реакцию обратной транскрипции по матрице микроРНК проводили по ранее описанному протоколу [17]. Праймеры и флуоресцентные зонды для обратной транскрипции и TaqMan полимеразной цепной реакции (ПЦР) были синтезированы в лаборатории медицинской химии Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск). Реакцию обратной транскрипции проводили в 10 мкл, содержащих 4,5 мкл РНК, 25 нмоль каждого из микроРНК-специфичных праймеров, 0,5 единиц RiboLock ингибитора

РНКазы (Fermentas, Литва), 50 единиц M—MuLV-RN ревертазы (Fermentas, Литва), 2,5 мкл $5 \times$ MMLV реакционного буфера (Fermentas, Литва) и 125 ммоль каждого dNTP. Реакцию проводили при 16 °C в течение 30 мин, затем при 42 °C в течение 30 мин и при 70 °C в течение 10 мин. В качестве отрицательного контроля использовали воду.

Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени выполняли на анализаторе LightCycler 480 II (Roche, Швейцария). Все реакции проводили в дублях в 49 мкл, содержащих 9 мкл реакционной смеси после обратной транскрипции, 1 мкл (1 единица) Taq-ДНК-полимеразы (Fermentas, Вильнюс, Литва), 2,4 мкл $10 \times$ ПЦР-буфера (750 мМ Трис-HCl (pH 8,8 при 25 °C), 32 мМ $MgCl_2$, 200 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 % Твин-20), 200 мМ каждого dNTP, 480 нМ микроРНК-специфичного прямого праймера, 640 нМ универсального обратного праймера и 240 нМ специфичного TaqMan флуоресцентного зонда. После первой денатурации при температуре 95 °C в течение 3 мин реакцию проводили за 45 циклов при температуре 95 °C в течение 15 с и 60 °C в течение 45 с. Полученные значения уровня РНК-мишени нормализовали на miR-16, вычисляя dCt, как было описано ранее [18].

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6.0. Выполнен анализ данных на соответствие выборки нормальному распределению с использованием критерия Шапиро—Уилка. Все данные выражены как медианы с межквартильным размахом или в виде средних значений со стандартными ошибками. Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна—Уитни и критерия Краскела—Уоллиса. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$. Достоверность корреляции оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена. При анализе учитывали только статистически значимые корреляционные связи ($p < 0,05$). С целью прогнозирования риска развития

РЯ использовался метод полиномиальной логистической регрессии.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеризация экзосом. Размер везикул и целостность их мембран оценивали с помощью ТЭМ (рис. 1).

В образцах плазмы крови ЗЖ и плазмы крови и асцитической жидкости пациенток с РЯ обнаружены везикулы размером ≤ 100 нм с характерными для экзосом чашеобразной формой и низкой электронной плотностью [5, 19].

С помощью трекового анализа было показано, что экзосомы в плазме и асцитической жидкости больных РЯ несколько крупнее, чем в плазме ЗЖ (различия недостоверны) (рис. 2). Впервые установлено, что концентрация экзосом в асцитической жидкости достоверно выше ($p < 0,05$), чем в плазме крови больных РЯ ($35,7 \pm 6,5 \times 10^{10}$ и $14,1 \pm 3,4 \times 10^{10}$ везикул/мл соответственно), а также выше, чем в плазме крови ЗЖ ($6,0 \pm 1,4 \times 10^{10}$ везикул/мл).

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных везикул с помощью проточной цитофлуориметрии выявлены экзосомальные маркеры CD9, CD24, CD63 и CD81. Сочетание неконъюгированных и конъюгированных с FITC антител позволяет идентифицировать различные субпопуляции экзосом. По снижению MFI субпопуляции экзосом распределялись следующим образом: экзосомы плазмы крови ЗЖ и больных РЯ — $CD9/CD24 > CD9/CD81 > CD9/CD63$, экзосомы асцитической жидкости — $CD9/CD24 > CD9/CD81 \approx CD9/CD63$ (рис. 3). Средняя интенсивность флуоресценции отрицательного и изотипического контролей составила 145 и 155 соответственно.

Экспрессия CD24, CD63 и CD81 на поверхности CD9-положительных экзосом у пациенток с РЯ была выше, чем у ЗЖ, однако статистически значимые различия ($p < 0,05$) выявлены только между экспрессией тетраспанина CD24 на экзосомах плазмы крови ЗЖ

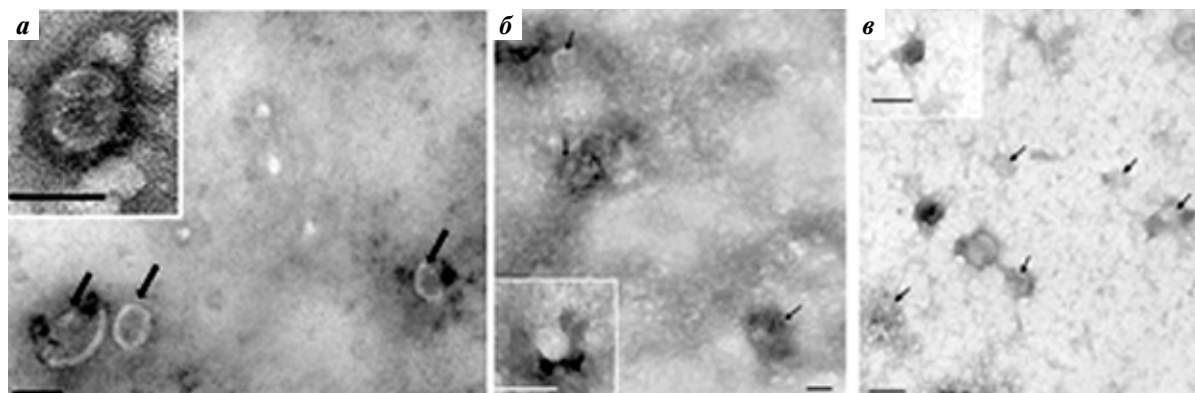


Рис. 1. Общий вид препаратов экзосом, полученных из плазмы крови здоровых женщин (а), плазмы крови (б) и асцитической жидкости (в) больных раком яичников. Трансмиссионная электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорно-вольфрамовой кислотой. На вставках и стрелками отмечены экзосомы. Масштаб шкалы соответствует 100 нм

Fig. 1. General appearance of exosome samples obtained from plasma of healthy women (a), plasma (б) and ascitic fluid (в) of patients with ovarian cancer. Transmission electron microscopy, phosphotungstic acid negative staining. Panels and arrows show exosomes. Scale is 100 nm

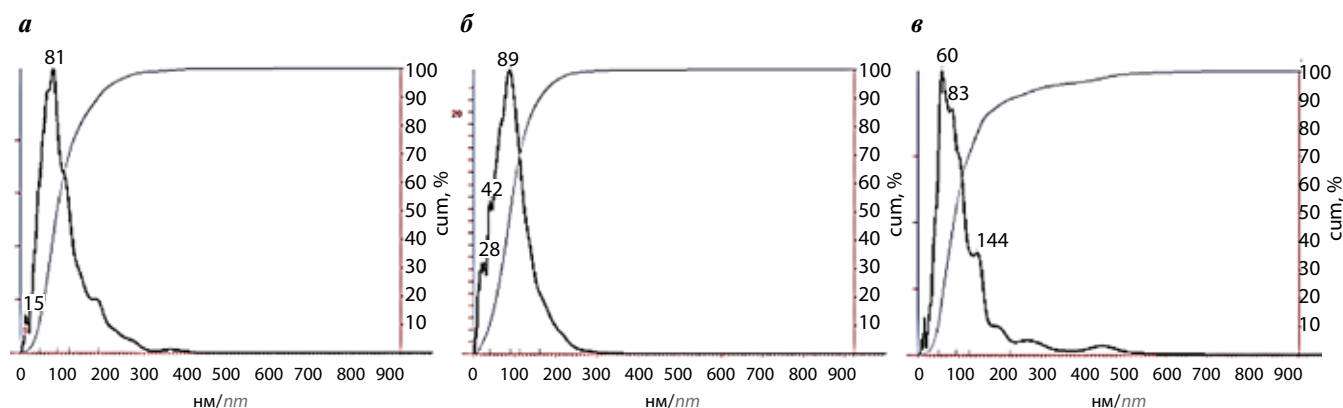


Рис. 2. Результаты трекового анализа экзосом из индивидуальных образцов плазмы крови здоровых женщин (а), плазмы крови (б) и асцитической жидкости (в) больных раком яичников

Fig. 2. Results of tracking analysis of exosomes from individual plasma samples of healthy women (a), plasma (б) and ascitic fluid (в) samples of patients with ovarian cancer

и больных РЯ (1080 ± 162 и 1400 ± 238 соответственно), а также на экзосомах плазмы крови и асцитической жидкости больных РЯ (1400 ± 238 и 2300 ± 276 соответственно).

Уровень экзосомальных miR-24 и miR-101 у здоровых женщин и больных раком яичников. Ранее было показано, что экспрессия miR-24 и miR-101 по сравнению с парными образцами достоверно снижена в тканях карцином высокой степени злокачественности, в том числе РЯ [12]. Поскольку уровень miR-16 в составе экзосом здоровых доноров и онкологических больных достоверно не различался, данная микроРНК была выбрана для нормировки уровней микроРНК-мишеней [20–22]. Действительно, для экзосомальной miR-16 показатели Ct в норме и при РЯ составили 32,09 и 31,89 соответственно. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили в рабочем диапазоне Ct 23,15–34,35; экзогенная контрольная cel-miR-39 была обнаружена во всех образцах ($Ct 25 \pm 1$). Относительные уровни miR-24-3p и miR-101 в образцах экзосом ЗЖ и больных РЯ представлены в табл. 2.

Относительный уровень miR-24-3p в экзосомах плазмы крови больных РЯ был достоверно ниже по сравнению с данным показателем у ЗЖ ($p < 0,01$) (см. табл. 2), при этом уровень этой микроРНК не различался в экзосомах плазмы крови и асцитической

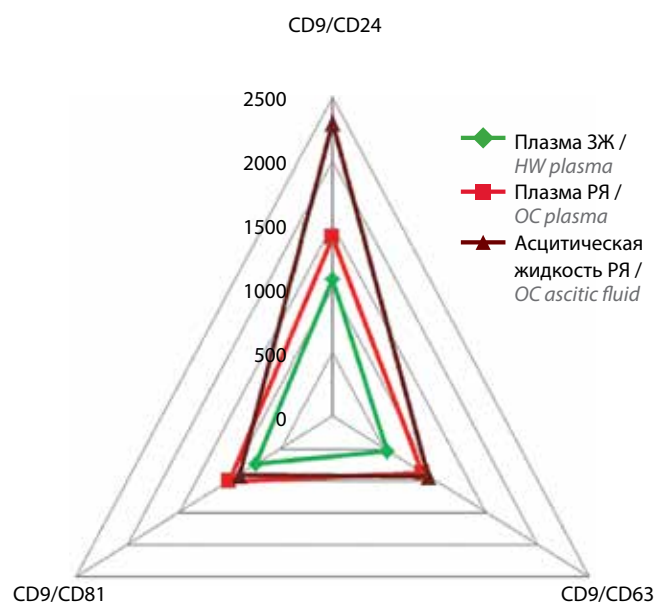


Рис. 3. Экспрессия CD24, CD63 и CD81 на поверхности CD9-положительных экзосом плазмы крови здоровых женщин (ЗЖ) и экзосом плазмы крови и асцитической жидкости больных раком яичников (РЯ). Средняя интенсивность флуоресценции

Fig. 3. CD24, CD63 and CD81 expression on the surface of CD9-positive exosomes from plasma of healthy women (HW) and exosomes from plasma and ascitic fluid of patients with ovarian cancer (OC). Mean fluorescence intensity

Таблица 2. Относительные уровни miR-24-3p и miR-101 в составе экзосом плазмы крови здоровых женщин (ЗЖ), плазмы крови и асцитической жидкости больных раком яичников (РЯ), медиана и диапазон значений (минимальное; максимальное)

Table 2. Relative miR-24-3p and miR-101 levels and ranges (minimum, maximum) in exosomes from plasma of healthy women (HW), plasma and ascitic fluid of patients with ovarian cancer (OC)

микроРНК microRNA	Плазма ЗЖ HW plasma	Плазма больных РЯ OC patient plasma	Асцитическая жидкость больных РЯ OC patient ascitic fluid
miR-24	–4,20 (–8,24; –0,12)	–6,68* (–9,35; –0,80)	–5,44 (–10,84; –2,10)
miR-101	8,77 (3,29; 11,14)	7,18* (5,50; 8,35)	6,92 (3,49; 8,80)

* $p < 0,05$ при сравнении уровня микроРНК-мишени в экзосомах плазмы больных РЯ и ЗЖ.

* $p < 0,05$ for comparison of target microRNA level in exosomes of OC patients and HW.

Таблица 3. Взаимосвязь уровня miR-24 в экзосомах плазмы и асцитической жидкости больных раком яичников с клиническими показателями, медиана [27–75 %]

Table 3. Correlation of miR-24 levels in exosomes from plasma and ascitic fluid of patients with ovarian cancer with clinical characteristics, median [27–75 %]

Показатель Parameter	Уровень miR-24 в экзосомах плазмы miR-24 level in plasma exosomes	<i>p</i>	Уровень miR-24 в экзосомах асцитической жидкости miR-24 level in ascitic fluid exosomes	<i>p</i>
Возраст, лет: Age, years: <56 (<i>n</i> = 10) ≥56 (<i>n</i> = 10)	–6,5 [–7,4; –5,8] –6,4 [–9,1; –4,8]	0,67	–5,7 [–8,6; –3,6] –5,5 [–9,0; –5,0]	0,75
Стадия по классификации FIGO: FIGO stage: IIВ – IIАВ (<i>n</i> = 5) IIIС (<i>n</i> = 15)	–6,9 [–8,0; –0,8] –6,4 [–7,6; –5,8]	0,89	–3,8 [–10,8; –2,2] –5,7 [–8,8; –5,0]	0,78
Рак яичников в семейном анамнезе: Ovarian cancer in family history: есть (<i>n</i> = 4) present (<i>n</i> = 4) нет (<i>n</i> = 16) absent (<i>n</i> = 16)	–5,8 [–8,0; –5,2] –6,5 [–8,0; –4,8]	1,00	–3,6 [–4,5; –3,4] –5,7 [–9,0; –3,8]	1,00
Объем асцитической жидкости, мл: Ascitic fluid volume, c. u.: <200 (<i>n</i> = 5) 200–1000 (<i>n</i> = 5) >1000 (<i>n</i> = 10)	–6,0 [–6,3; –5,8] –7,9 [–8,7; –6,2] –6,5 [–7,4; –4,3]	0,35	–5,5 [–5,7; –3,6] –8,9 [–9,6; –5,6] –5,3 [–8,6; –3,8]	0,43
Индекс перитонеального канцероматоза, у. е.: Peritoneal cancer index, c. u.: ≤9 (<i>n</i> = 10) >9 (<i>n</i> = 10)	–7,8 [–8,2; –6,0] –6,4 [–7,4; –4,8]	0,35	–8,9 [–10,1; –5,7] –5,3 [–8,6; –3,6]	0,22

жидкости больных РЯ. Аналогичная картина наблюдалась для miR-101 ($p < 0,01$) (см. табл. 2). У онкологических больных выявлена достоверная сильная (по шкале Чеддока) прямая корреляция между относительными уровнями опухолеассоциированных микроРНК в экзосомах плазмы крови и экзосомах асцитической жидкости ($R = 0,7995$ и $R = 0,9983$ для miR-24 и для miR-101 соответственно).

Не выявлено взаимосвязи между уровнями miR-24 и miR-101 в экзосомах плазмы крови и асцитической жидкости с возрастом, семейным анамнезом, объемом асцита и PCI у больных РЯ, однако уровень miR-101 в экзосомах асцитической жидкости коррелировал со стадией по FIGO ($p = 0,03$) (табл. 3 и 4).

Логистический регрессионный анализ был выполнен для оценки возможности использования уровня микроРНК в экзосомах плазмы крови для прогнозирования риска развития РЯ. В первую регрессионную модель в качестве предикторов включены возраст, наличие в семейном анамнезе РЯ или РЯ в сочетании с раком молочной железы, а также уровни miR-24 и miR-101 в плазме крови. Также была построена вторая прогностическая модель, включающая меньшее количество анализируемых параметров (без учета возраста), но обладающая более высокой чувствительностью.

Обе модели оказались статистически значимыми. Чувствительность первой модели составила 80 %, специфичность – 77 %, статистическая значимость – $p = 0,001$; $\chi^2 = 19,927$. Чувствительность второй модели оказалась равной 87 %, специфичность – 79 %, статистическая значимость – $p = 0,000$; $\chi^2 = 19,412$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя основным источником онкогенеза являются злокачественные клетки, их взаимодействие с микроокружением опухоли имеет решающее значение для прогрессирования от одиночной опухолевой массы до отдаленных метастазов. Экзосомы опухолевого происхождения опосредуют ЭМП, пролиферацию и повышенную подвижность раковых клеток, а также стимулируют ангиогенез и ускользание от иммунного ответа [23–25]. Поскольку доля экзосомальной ДНК незначительна [16], ключевую роль в трансформации экзосомами клеток-реципиентов отводят РНК и белкам в их составе [26, 27]. Предположительно, рибонуклеиновые кислоты (длинная некодирующая РНК и микроРНК) действуют на клетку-мишень совместно с биологически активными белками, однако в литературе до сих пор отсутствуют данные о синергетическом действии опухолеассоциированных РНК и белков в составе экзосом.

Таблица 4. Уровень miR-101 в экзосомах плазмы и асцитической жидкости больных раком яичников в зависимости от клинических параметров, медиана [27–75 %]

Table 4. miR-101 levels in exosomes from plasma and ascitic fluid of patients with ovarian cancer depending on clinical characteristics, median [27–75 %]

Показатель Parameter	Уровень miR-101 в экзосомах плазмы miR-101 level in plasma exosomes	<i>p</i>	Уровень miR-101 в экзосомах асцитической жидкости miR-101 level in ascitic fluid exosomes	<i>p</i>
Возраст, лет: Age, years: <56 (<i>n</i> = 10) ≥56 (<i>n</i> = 10)	7,0 [6,4; 7,7] 7,3 [6,1; 7,8]	0,89	6,8 [5,7; 7,2] 6,9 [6,4; 8,1]	0,42
Стадия по классификации FIGO: FIGO stage: IIВ–IIАВ (<i>n</i> = 5) IIIС (<i>n</i> = 15)	7,3 [5,8; 7,8] 7,0 [6,4; 7,6]	0,94	5,4 [3,5; 6,1] 7,1 [6,5; 7,4]	0,03
Рак яичников в семейном анамнезе: Ovarian cancer in family history: есть (<i>n</i> = 4) present (<i>n</i> = 4) нет (<i>n</i> = 16) absent (<i>n</i> = 16)	6,7 [5,7; 7,6] 7,2 [6,4; 7,2]	0,63	7,1 [7,0; 7,2] 6,67 [5,9; 7,5]	0,63
Объем асцитической жидкости, мл: Ascitic fluid volume: <200 (<i>n</i> = 5) 200–1000 (<i>n</i> = 5) >1000 (<i>n</i> = 10)	6,5 [6,0; 6,9] 6,9 [6,1; 7,8] 7,6 [5,8; 7,7]	0,53	6,1 [5,5; 6,8] 7,6 [6,7; 8,6] 7,2 [6,3; 7,4]	0,14
Индекс перитонеального канцероматоза, у. е.: Peritoneal cancer index, с. u.: ≤9 (<i>n</i> = 10) >9 (<i>n</i> = 10)	7,0 [6,4; 7,8] 7,2 [6,0; 7,7]	0,80	6,7 [5,7; 8,0] 7,1 [6,8; 7,3]	0,44

Согласно базе данных Exocarta (www.exocarta.org, данные на 18.03.2023), экзосомы участвуют в транспорте 2838 микроРНК. При исследовании механизмов канцерогенеза было показано, что повышенная экспрессия miR-101 значительно снижает способность клеток РЯ к пролиферации и инвазии *in vitro* путем ингибирования *SOC2*, который является геном-супрессором и регулирует процессы клеточной пролиферации и апоптоза [28]. Кроме того, продемонстрировано, что факторы транскрипции ZEB1 и ZEB2 также являются мишенями miR-101 и их взаимодействие подавляет ген Е-кадгерина. Это приводит к подавлению ЭМП, клеточной миграции и инвазии [13, 29]. При РЯ характерна пониженная экспрессия этой микроРНК [30], что коррелирует с низкой дифференцировкой опухоли и резистентностью к цисплатину [31].

MiR-24-3p также играет большую роль в пролиферации, инвазии и миграции клеток карциномы человека [32]. С помощью анализа *in silico* путем интеграции данных о взаимодействиях микроРНК и мишени, белок-белковых взаимодействиях и связях генов с заболеваниями была выявлена ассоциация между РЯ и экспрессией miR-24. В частности, повышенная экспрессия miR-24 в клетках ассоциируется со значительной индукцией клеточного апоптоза [33]. В дальнейших

исследованиях с помощью биоинформатического анализа было установлено, что miR-24 способствует резистентности клеток РЯ к цисплатину, опосредуя модули связанных с резистентностью к этому препарату генов культуры клеток OVCAR-8R, которые участвуют в процессах, тесно связанных с апоптозом, клеточным циклом и адгезией [14]. В прошлом году было обнаружено, что miR-24 способна подавлять метастазирование РЯ, поскольку действует на ЭМП клеток опухоли [34]. Несмотря на значительное число исследований, посвященных роли miR-24-3p в канцерогенезе и уровню ее экспрессии в экзосомах, данные литературы о наличии этой микроРНК в экзосомах плазмы крови и асцитической жидкости пациенток с РЯ немногочисленны.

Настоящее исследование показало, что экзосомы как асцитической жидкости, так и плазмы крови больных РЯ несут опухолеспецифические микроРНК. Сравнительный анализ miR-24-3p и miR-101 в экзосомах этих биологических жидкостей показал возможность выявления РЯ до развития асцита, что позволит в дальнейшем использовать данные экзосомальные маркеры крови для ранней диагностики и оценки эффективности противоопухолевой терапии с помощью жидкой биопсии.

Построенные для прогнозирования риска развития РЯ регрессионные модели оказались статистически значимыми. Мы рассматриваем полученные результаты по использованию микроРНК в экзосомах плазмы крови для прогнозирования риска развития РЯ как предварительные, однако весьма обнадеживающие. В перспективе оценка уровней miR-24-3p и miR-101 в экзосомах плазмы крови может быть применена для прогнозирования риска возникновения РЯ в общей популяции женщин с учетом и без учета возраста в дополнение к тестированию на мутации BRCA1/BRCA2, особенно при наличии в семейном анамнезе РЯ или рака молочной железы в сочетании с РЯ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего исследования выявлено достоверное изменение уровней опухолеассоциированных микроРНК в составе экзосом плазмы крови больных РЯ по сравнению с этим показателем у ЗЖ. Показана прямая достоверная корреляция уровней miR-24-3p и miR-101 в экзосомах крови с уровнем этих микроРНК в экзосомах асцитической жидкости онкологических больных, что указывает на перспективность экзосомальных miR-101 и miR-24-3p для диагностики РЯ методом жидкостной биопсии. Полученные результаты расширяют наше понимание биологии канцерогенеза и являются еще одним шагом на пути к разработке новых методов диагностики и лечения РЯ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ding H., Zhang J., Zhang F. et al. Nanotechnological approaches for diagnosis and treatment of ovarian cancer: a review of recent trends. *Drug Deliv* 2022;29(1):3218–32. DOI: 10.1080/10717544.2022.2132032
- Bhardwaj B., Thankachan S., Venkatesh T. et al. Liquid biopsy in ovarian cancer. *Clinica Chimica Acta* 2020;510:28–34. DOI: 10.1016/j.cca.2020.06.047
- Guo L., Guo N. Exosomes: potent regulators of tumor malignancy and potential bio-tools in clinical application. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015;95(3):346–58. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.04.002
- Tenchov R., Sasso J.M., Wang X. et al. Exosomes-Nature's lipid nanoparticles, a rising star in drug delivery and diagnostics. *ACS Nano* 2022;16(11):17802–46. DOI: 10.1021/acsnano.2c08774
- Yunusova N., Kolegova E., Sereda E. et al. Plasma exosomes of patients with breast and ovarian tumors contain an inactive 20S proteasome. *Molecules* 2021;26(22):6965. DOI: 10.3390/molecules26226965
- Tutanov O., Orlova E., Proskura K. et al. Proteomic analysis of blood exosomes from healthy females and breast cancer patients reveals an association between different exosomal bioactivity on non-tumorigenic epithelial cell and breast cancer cell migration *in vitro*. *Biomolecules* 2020;10(4):495. DOI: 10.3390/biom10040495
- Ye S.B., Li Z.L., Luo D.H. et al. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* 2014;5(14):5439–52. DOI: 10.18632/oncotarget.2118
- Xia Y., Hu X., Di K. et al. Combined detection of exosome concentration and tumor markers in gastric cancer. *J Biomed Nanotechnol* 2020;16(2):252–8. DOI: 10.1166/jbn.2020.2887
- Yunusova N., Patysheva M., Molchanov S. et al. Metalloproteinases at the surface of small extracellular vesicles in advanced ovarian cancer: Relationships with ascites volume and peritoneal canceromatosis index. *Clin Chim Acta* 2019;494:116–22. DOI: 10.1016/j.cca.2019.03.1621
- Joyce D.P., Kerin M.J., Dwyer R.M. Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for breast cancer. *Int J Cancer* 2016;139(7):1443–8. DOI: 10.1002/ijc.30179
- Kalra H., Drummen G.P., Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci* 2016;17(2):170. DOI: 10.3390/ijms17020170
- Yang D., Sun Y., Hu L. et al. Integrated analyses identify a master microRNA regulatory network for the mesenchymal subtype in serous ovarian cancer. *Cancer Cell* 2013;23(2):186–99. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.12.020
- Braga E.A., Fridman M.V., Kushlinskii N.E. Molecular mechanisms of ovarian carcinoma metastasis: key genes and regulatory microRNAs. *Biochemistry (Mosc)* 2017;82(5):529–41. DOI: 10.1134/S0006297917050017
- Liu W., Wang S., Zhou S. et al. A systems biology approach to identify microRNAs contributing to cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Mol Biosyst* 2017;13(11):2268–76. DOI: 10.1039/c7mb00362e
- Konoshenko M., Sagaradze G., Orlova E. et al. Total blood exosomes in breast cancer: potential role in crucial steps of tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 2020;21(19):7341. DOI: 10.3390/ijms21197341
- Tutanov O., Shtam T., Grigor'eva A. et al. Blood plasma exosomes contain circulating DNA in their crown. *Diagnostics (Basel)* 2022;12(4):854. DOI: 10.3390/diagnostics12040854
- Konoshenko M.Y., Bryzgunova O.E., Lekchnov E.A. et al. The influence of radical prostatectomy on the expression of cell-free MiRNA. *Diagnostics (Basel)* 2020;10(8):600. DOI: 10.3390/diagnostics10080600
- Tamkovich S., Tutanov O., Efimenko A. et al. Blood circulating exosomes contain distinguishable fractions of free and cell-surface-associated vesicles. *Curr Mol Med* 2019;19(4):273–85. DOI: 10.2174/1566524019666190314120532
- Zhang W., Ou X., Wu X. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: a potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis. *Int J Oncol* 2019;54(5):1719–33. DOI: 10.3892/ijo.2019.4742
- Hagrass H.A., Sharaf S., Pasha H.F. et al. Circulating microRNAs – a new horizon in molecular diagnosis of breast cancer. *Genes Cancer* 2015;6(5–6):281–7. DOI: 10.18632/genesandcancer.66
- Bryzgunova O.E., Zaripov M.M., Skvortsova T.E. et al. Comparative study of extracellular vesicles from the urine of healthy individuals and prostate cancer patients. *PLoS One* 2016;11(6):e0157566. DOI: 10.1371/journal.pone.0157566
- McDermott A.M., Kerin M.J., Miller N. Identification and validation of miRNAs as endogenous controls for RQ-PCR in blood specimens for breast cancer studies. *PLoS One* 2013;8(12):e83718. DOI: 10.1371/journal.pone.0083718
- Matsumoto Y., Kano M., Murakami K. et al. Tumor-derived exosomes influence the cell cycle and cell migration of human esophageal cancer cell lines. *Cancer Sci* 2020;111(12):4348–58. DOI: 10.1111/cas.14660
- Pathania A.S., Prathipati P., Challagundla K.B. New insights into exosome mediated tumor-immune escape: Clinical perspectives

- and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2021;1876(2):188624. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188624
25. Paskesh M.D.A., Entezari M., Mirzaei S. et al. Emerging role of exosomes in cancer progression and tumor microenvironment remodeling. *J Hematol Oncol* 2022;15(1):83. DOI: 10.1186/s13045-022-01305-4
 26. Sahebi R., Langari H., Fathinezhad Z. et al. Exosomes: new insights into cancer mechanisms. *J Cell Biochem* 2020;121(1):7–16. DOI: 10.1002/jcb.29120
 27. Yi Y., Wu M., Zeng H. et al. Tumor-derived exosomal non-coding rnas: the emerging mechanisms and potential clinical applications in breast cancer. *Front Oncol* 2021;11:738945. DOI: 10.3389/fonc.2021.738945
 28. Zheng H.B., Zheng X.G., Liu B.P. miRNA-101 inhibits ovarian cancer cells proliferation and invasion by down-regulating expression of SOCS-2. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(11):20263–70.
 29. Liang H., Yu T., Han Y. et al. LncRNA PTAR promotes EMT and invasion-metastasis in serous ovarian cancer by competitively binding miR-101-3p to regulate ZEB1 expression. *Mol Cancer* 2018;17(1):119. DOI: 10.1186/s12943-018-0870-5
 30. Xu Y., Xu L., Zheng J. et al. MiR-101 inhibits ovarian carcinogenesis by repressing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Open Bio* 2017;7(9):1258–66. DOI: 10.1002/2211-5463.12257
 31. Liu L., Guo J., Yu L. et al. miR-101 regulates expression of EZH2 and contributes to progression of and cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol* 2014;35(12):12619–26. DOI: 10.1007/s13277-014-2585-6
 32. Wang H., Chen C., Ding K. et al. MiR-24-3p as a prognostic indicator for multiple cancers: from a meta-analysis view. *Biosci Rep* 2020;40(12):BSR20202938. DOI: 10.1042/BSR20202938
 33. Yuan D., Cui X., Wang Y. et al. Enrichment analysis identifies functional microRNA-disease associations in humans. *PLoS One* 2015;10(8):e0136285. DOI: 10.1371/journal.pone.0136285
 34. Lin H., Xu X., Chen K. et al. LncRNA CASC15, MiR-23b cluster and SMAD3 form a novel positive feedback loop to promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in ovarian cancer. *Int J Biol Sci* 2022;18(5):1989–2002. DOI: 10.7150/ijbs.67486

Вклад авторов

Е.И. Джугашвили: получение экспериментальных данных, обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи;
 Н.В. Юнусова: разработка концепции исследования, получение экспериментальных данных, написание текста статьи;
 А.И. Яловая, А.Е. Григорьева: получение экспериментальных данных;
 Е.Е. Середа: статистический анализ данных;
 Л.А. Коломиец: подбор пациентов для включения в исследование;
 С.Н. Тамкович: разработка концепции исследования, получение экспериментальных данных, редактирование.

Authors' contribution

E.I. Dzhugashvili: obtaining experimental data literature review on the topic of the article, article writing;
 N.V. Yunusova: development of the research concept, obtaining experimental data, article writing;
 A.I. Yalovaya, A.E. Grigorieva: obtaining experimental data;
 E.E. Sereda: statistical data analysis;
 L.A. Kolomiets: selection of patients for inclusion in the study;
 S.N. Tamkovich: development of the research concept, obtaining experimental data, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.И. Джугашвили / E.I. Dzhugashvili: <https://orcid.org/0000-0003-0465-3124>
 Н.В. Юнусова / N.V. Yunusova: <https://orcid.org/0000-0003-4595-4177>
 А.Е. Григорьева / A.E. Grigorieva: <https://orcid.org/0000-0001-9853-223X>
 Е.Е. Середа / E.E. Sereda: ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7752-9346>
 Л.А. Коломиец / L.A. Kolomiets: <https://orcid.org/0000-0002-6854-8940>
 С.Н. Тамкович / S.N. Tamkovich: <https://orcid.org/0000-0001-7774-943X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках проекта базового бюджетного финансирования Минобрнауки России № 121030200173-6 «Диагностика и терапия онкологических заболеваний».

Funding. The work was carried out within the framework of the basic budget financing project of the Ministry of Education and Science of Russia No. 121030200173-6 “Diagnosis and therapy of oncological diseases”.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный медицинский исследовательский центр Российской академии наук» (протокол № 2 от 15.01.2020).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the ethics of Scientific Research Institute of Oncology of the Tomsk National Medical Research Center of the Russian Academy of Sciences (protocol No. 2 от 15.01.2020).

The patients gave written informed consent to the publication of their data.

Статья поступила: 16.12.2022. **Принята к публикации:** 04.04.2023.

Article submitted: 16.12.2022. **Accepted for publication:** 04.04.2023.

Идентификация предиктивных маркеров в спинномозговой жидкости больных глиобластомой

Н.Е. Арноцкая, Т.И. Кушнир, И.А. Кудрявцев, А.А. Митрофанов, А.Х. Бекашев, В.Е. Шевченко

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Введение. Глиобластома (ГБ) пока неизлечима, несмотря на достижения в терапии других злокачественных солидных опухолей. Тактика лечения ГБ основывается исключительно на гистопатологических признаках, томографической визуализации опухоли и ее геномном анализе (соматические мутации в генах изоцитратдегидрогеназы, статус метилирования промотора гена O^6 -метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы). Для адаптации лечения к самой последней эволюции опухоли молекулярная информация должна поступать регулярно на протяжении всего курса терапии. Однако опухолевая ткань часто недоступна для диагностики при прогрессировании заболевания. В связи с этим актуальной становится разработка менее инвазивных методов, например анализа протеома биологических жидкостей пациентов. Особый интерес представляет спинномозговая жидкость (СМЖ) – важный источник биомаркеров заболевания для мониторинга наличия и прогрессирования заболевания.

Цель исследования – идентификация протеомных предиктивных биомаркеров в СМЖ больных ГБ.

Материалы и методы. В ходе исследования были использованы образцы СМЖ пациентов, протеомная масс-спектрометрия высокого разрешения, современные биохимические методы и биоинформатические технологии.

Результаты. Впервые проведен анализ протеомов образцов СМЖ больных ГБ, полученных до и спустя 7 дней после удаления первичной опухоли. Идентифицированы потенциальные биомаркеры ГБ. После их валидации с использованием открытых баз данных отобраны 11 протеомных предиктивных маркеров ГБ (S100A9, S100A8, PLA2G15, PRIB, LTBP2, VIM, LAMB1, STC1, NRP1, COL6A1, HSPA5) и проведена оценка их роли в молекулярных механизмах глиоматоза.

Заключение. Предложенная панель протеомных предиктивных биомаркеров СМЖ больных ГБ может в дальнейшем использоваться при разработке тест-систем для оценки эффективности терапии и раннего выявления рецидивов заболевания.

Ключевые слова: глиобластома, протеом, спинномозговая жидкость, масс-спектрометрия

Для цитирования: Арноцкая Н.Е., Кушнир Т.И., Кудрявцев И.А. и др. Идентификация предиктивных маркеров в спинномозговой жидкости больных глиобластомой. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):117–25. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-117-125

Identification of predictive markers in the cerebrospinal fluid of patients with glioblastoma

N.E. Arnotskaya, T.I. Kushnir, I.A. Kudryavtsev, A.A. Mitrofanov, A.Kh. Bekyashev, V.E. Shevchenko

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

Contacts: Valery Evgenievich Shevchenko vshev2015@yandex.ru

Introduction. Glioblastoma (GB) is not yet curable despite recent advances in the treatment of other malignant solid tumors. The management of GB is based solely on histopathological features, imaging of the tumor and its genomic analysis (somatic mutations in the isocitrate dehydrogenase genes, methylation status of the O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter). To adapt the treatment to the most recent tumor evolution, molecular information should be received regularly throughout the course of therapy. However, tumor tissue is often not available for diagnosis as the disease progresses. In this regard, the development of less invasive methods, such as analysis of the proteome of biological fluids of patients, is of particular interest. Cerebrospinal fluid (CSF) is an important source disease biomarkers to monitor the presence and progression of the disease.

Aim. To identify proteomic predictive biomarkers in the CSF of patients with GB.

Materials and methods. During the study, samples of patients' CSF samples, high-resolution proteomic mass spectrometry, modern biochemical methods and bioinformatic technologies were used.

Results. For the first time, the analysis of proteomes of CSF samples of patients with GB obtained before and 7 days after the removal of the primary tumor was carried out. Potential biomarkers of GB have been identified. After their validation using open databases, 11 proteomic predictive markers of GB (S100A9, S100A8, PLA2G15, PPIB, LTBP2, VIM, LAMB1, STC1, NRP1, COL6A1, HSPA5) were selected and their role in the molecular mechanisms of gliomagenesis was assessed.

Conclusion. The proposed panel of proteomic predictive CSF biomarkers in GB patients can be further used in the development of test systems for assessing the effectiveness of therapy and early detection of disease relapses.

Keywords: glioblastoma, proteome, cerebrospinal fluid, mass spectrometry

For citation: Arnotskaya N.E., Kushnir T.I., Kudryavtsev I.A. et al. Identification of predictive markers in the cerebrospinal fluid of patients with glioblastoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(2): 117–25. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-117-125

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее распространенная и агрессивная первичная опухоль головного мозга глиобластома (ГБ) пока неизлечима, несмотря на достижения в терапии других злокачественных солидных опухолей. Общая выживаемость пациентов с этой патологией остается на уровне 15–20 мес [1]. Диагностика ГБ и последующая тактика ее лечения долгое время основывались исключительно на гистопатологических признаках. Полногеномный анализ глиом выявил знаковые соматические мутации в генах изоцитратдегидрогеназы (IDH) [2], идентифицировал транскрипционно и эпигенетически определенные подмножества глиом [3] и пролил свет на их мутационный ландшафт [4]. Тем не менее статус метилирования промотора гена *MGMT* (O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза) остается основным параметром, определяющим тактику лечения больных глиомами, и предиктором их выживаемости [5]. Однако метилирование ДНК *MGMT* может быть прогностическим биомаркером для ответа на лечение только у пациентов с ГБ классического подтипа [6].

Терапия ГБ начинается с нейрохирургической резекции опухоли с последующими лучевой терапией и введением темозоломида [6]. Несмотря на этот режим, данная опухоль практически всегда рецидивирует, что связано с различными механизмами резистентности к терапии [7]. Для того чтобы адаптировать лечение к самой последней эволюции опухоли, молекулярная информация должна поступать регулярно на протяжении всего курса терапии. Однако опухолевая ткань часто недоступна для диагностики при прогрессировании ГБ, так как повторные операции трудно-выполнимы, сопряжены с риском и часто не приносят пользы больному с точки зрения выживаемости по сравнению с удалением первичной опухоли [8].

В связи с вышесказанным необходимо разработать менее инвазивные методы, например анализ протеома биологических жидкостей пациентов. Однако идентификация белковых маркеров часто затрудняется использованием антител, которые позволяют одновременно обнаруживать только ограниченное количество белков. Протеомная масс-спектрометрия (МС) стала мощной технологией, преодолевшей эти ограничения.

Данный метод позволяет идентифицировать и количественно определять тысячи белков в однократном эксперименте [9]. Протеомная МС уже использовалась при открытии предиктивных биомаркеров некоторых онкологических заболеваний, таких как гепатоцеллюлярная карцинома [10] и рак яичников [11].

Особый интерес представляют проксимальные жидкости, такие как спинномозговая жидкость (СМЖ) и кистозная жидкость, являющиеся важным источником биомаркеров заболевания для мониторинга наличия и прогрессирования заболевания. Спинномозговая жидкость — внеклеточная жидкость, циркулирующая в подпаутинном (субарахноидальном) пространстве головного и спинного мозга, желудочках и цистернах головного мозга. Она транспортирует биологические вещества, удаляет отходы и токсины, выделяемые мозгом. Исследование СМЖ имеет большое значение в диагностике многих неврологических заболеваний воспалительной и инфекционной природы, а также ряда опухолевых процессов.

В настоящем исследовании впервые проведен анализ протеомов образцов СМЖ больных ГБ, полученных до и после удаления первичной опухоли. Статистически значимые карты дифференциально экспрессированных белков (ДЭБ) использовались для идентификации потенциальных предиктивных биомаркеров заболевания и оценки их роли в молекулярных механизмах глиомогенеза. После их валидации с использованием открытых баз данных были отобраны 11 протеомных маркеров СМЖ, которые, по нашему мнению, могут применяться для оценки эффективности терапии ГБ и раннего выявления рецидивов заболевания.

Цель исследования — методом протеомной МС высокого разрешения провести картирование протеома СМЖ больных ГБ для идентификации потенциальных предиктивных маркеров заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение клинических образцов. Образцы СМЖ больных ГБ получали в отделении нейрохирургии Научно-исследовательского института клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России. Проводилась люмбальная пункция до удаления первичной опухоли и спустя 7 дней после операции. Клинические данные пациентов, участвовавших в исследовании, представлены в табл. 1.

Приготовление образцов спинномозговой жидкости для масс-спектрометрии. Спинномозговую жидкость центрифугировали при 10000 об./мин в течение 10 мин, аликвотировали и хранили при температуре -80°C . Две объединенные аликвоты СМЖ до (СМЖ_{до}) и после (СМЖ_{после}) хирургического вмешательства готовили из 9 образцов СМЖ, взятых у больных ГБ до и после операции: первая содержала 950 мкг, вторая — 975 мкг белка соответственно. Спинномозговую жидкость подвергали ультрафильтрации для удаления низкомолекулярных соединений ранее описанным методом [12].

Таблица 1. Клинические данные больных глиобластомой (ГБ), участвовавших в исследовании

Table 1. Clinical data of patients with glioblastoma (GB) participating in the study

Пациент Patient	Клинический диагноз Clinical diagnosis	Пол Sex	Возраст Age
1	ГБ левой височной доли головного мозга GB of the left temporal lobe of the brain	М M	58
2	ГБ левой теменно-затылочной области головного мозга GB of the left parieto-occipital region of the brain	Ж F	65
3	ГБ правой височной доли головного мозга GB of the right temporal lobe of the brain	М M	78
4	ГБ правой теменно-затылочной области головного мозга GB of the right parietal-occipital region of the brain	М M	57
5	ГБ правой затылочной доли головного мозга GB of the right occipital lobe of the brain	М M	58
6	ГБ левой лобной доли головного мозга с кровоизлиянием GB of the left frontal lobe of the brain with hemorrhage	Ж F	63
7	ГБ правой лобной доли головного мозга GB of the right frontal lobe of the brain	Ж F	57
8	Анапластическая астроцитома правой лобной доли головного мозга Anaplastic astrocytoma of the right frontal lobe of the brain	Ж F	34
9	ГБ правой лобной доли головного мозга GB of the right frontal lobe of the brain	М M	68

После трипсинолиза объединенных образцов СМЖ [12] их упаривали при $+30^{\circ}\text{C}$ в центрифужном концентраторе Labconco CentriVar (США) и использовали для предварительного фракционирования триптических пептидов.

Фракционирование продуктов трипсинолиза биообразцов. Продукты трипсинолиза образцов СМЖ (100 мкг) растворяли в 50 мкл 0,1 % муравьиной кислоты и фракционировали на колонке Zorbax 300 Extend-C18 ($2,1 \times 500$ мм; 3,5 мкм, Agilent, США) на модульном хроматографе для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) Agilent 1100 (Agilent, США), оборудованном коллектором фракций и ультрафиолетовым (УФ) детектором. Объем введенной пробы составлял 20 мкл, температура колонки — 25°C ; детектирование проводили по УФ-поглощению при длине волны 214, 254 и 280 нм. Подвижная фаза состояла из фаз А (20 мМ NH_4OH , pH 10) и В (20 % фазы А плюс 80 % ацетонитрила). Колонку уравнивали фазой А в течение 30 мин перед вводом образца. Градиент подвижной фазы при скорости потока 300 мкл/мин устанавливали следующим образом: а) от 0 до 5 мин — 0 % фазы В; б) от 5 до 35 мин — от 0 до 35 % фазы В; в) от 35 до 45 мин — от 35 до 100 % фазы В; г) от 45 до 60 мин — 100 % фазы В; д) от 60 до 70 мин — от 100 до 0 % фазы В. Всего было собрано 12 фракций от 0 до 50 мин с интервалами 1,5 и 3 мин. Фракции упаривали досуха при 30°C на центрифужном концентраторе Labconco CentriVar (Labconco, США) и повторно разбавляли 100 мкл 0,1 % муравьиной кислоты для МС-анализа.

Масс-спектрометрический анализ. Анализ триптических пептидов проводили с использованием нано-ВЭЖХ-Dionex Ultimate 3000 и масс-спектрометра LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с источником ионизации NanoSpray [12]. Масс-спектрометрические данные обрабатывали с помощью программ MaxQuant 1.6.17.0 (Biochemistry Computational Systems, Biochemistry Max Planck, Martinsried, Германия) и Perseus 1.6.0.7 (Max Planck Institute of Biochemistry, Германия).

Биоинформатический анализ. Биоинформатический анализ проводили с использованием программы DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <https://david.ncifcrf.gov>), а также открытой базы данных PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). Информацию по экспрессии матричной РНК (мРНК) и белков в опухолевой и нормальной тканях получали из баз «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA), Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (CPTAC) и International Cancer Proteogenome Consortium (ICPC). Анализ данных для группы мРНК в базе TCGA с учетом субтипов ГБ выполняли с помощью программы Glioblastoma BioDiscovery Portal (GBM-BioDP) (<https://gbm-biodp.nci.nih.gov/#genes>). Корреляцию между экспрессией генов и их клинической значимостью анализировали с использованием UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/index.html>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Картирование протеома спинномозговой жидкости больных глиобластомой до и после хирургического вмешательства. Для идентификации потенциальных предиктивных маркеров ГБ в настоящей работе впервые выполнен сравнительный протеомный анализ объединенных образцов СМЖ_{до} и СМЖ_{после} 9 больных ГБ (см. табл. 1), полученных до и после хирургического удаления первичной опухоли. Мы использовали label-free количественный метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием (нано-ВЭЖХ-МС/МС) для панорамного картирования протеомов 2 типов образцов (в триплетах) без предварительного снижения уровней высокопредставленных белков.

Протеомный анализ триптических пептидов 2 образцов СМЖ с использованием программы MaxQuant позволил идентифицировать в общей сложности 911 белков путем сопоставления тандемных (МС/МС) масс-спектров с пептидными последовательностями в базе данных UniProtKB_human с ложным уровнем обнаружения (false discovery rate, FDR) 1 % для тройных повторов 2 видов образцов. В ходе обработки данных с помощью программы Perseus было распознано следующее количество белков: образец 01 (СМЖ_{до}) — 691 белок по 5176 пептидам (2605 уникальных пептидов); образец 02 (СМЖ_{после}) — 837 белков по 5411 пептидам (2787 уникальных пептидов). Из них 69 % протенинов идентифицировали по совпадению 2 и более пептидов и 31 % — по совпадению 1 пептида. Процент сиквенс-покрытия исследуемых белков изменялся от 0,2 до 97,4 %. Коэффициент корреляции Пирсона между образцами СМЖ_{после} и СМЖ_{до} варьировал от 0,81 до 0,90.

Дифференциально экспрессированными оказались 266 протеинов; они присутствовали в обоих образцах СМЖ и имели статистически значимые изменения экспрессии в СМЖ_{до} по сравнению с СМЖ_{после} ($p < 0,05$) с кратностью изменения >2 или $<0,5$. Экспрессия 128 белков была выше, а 138 белков — ниже в СМЖ_{до} по сравнению с СМЖ_{после}. Увеличение экспрессии более чем на порядок наблюдали у 28 ДЭБ, включая HSP90AA1, LTF, GOLPH2, CCDC42, ATL2, ARFIP1 и MERP1. Одновременно снижение экспрессии более чем на порядок отмечали для 31 ДЭБ, включая GPR37, VCAN, F10, SHISA5, MRC1L1, ATP1A3 и TGOLN2.

Результаты биоинформатического анализа. Данные протеомного картирования ДЭБ СМЖ до и после удаления первичной опухоли подвергали сравнительному биоинформатическому анализу. Каждый из 266 ДЭБ классифицировали по клеточной локализации с использованием открытых баз данных, указанных выше. Если один белок был обнаружен более чем в одном клеточном компартменте, он также учитывался. Большую часть ДЭБ составляли сигнальные протеины (63,1 %). Белки СМЖ в основном были локализованы во внеклеточной области (49,4 %), межклеточном пространстве (13 %), экзосомах (43,9 %), лизосомах (32,4 %) и плазматической мембране (37,5 %).

Классификация белков СМЖ по биологическим процессам показала, что большинство протеинов вовлечены в сигнальную трансдукцию (28,1 %), клеточную коммуникацию (27,3 %), рост клеток и их развитие (16,1 %), метаболизм белков (15 %) и общий метаболизм (12,7 %).

Основная часть белков СМЖ выполняла молекулярные функции, проявляя активность клеточных адгезивных молекул (7,9 %), внеклеточных матричных компонентов (6,7 %), рецепторную (6 %) и каталитическую (4,9 %).

Идентификация потенциальных предиктивных маркеров глиобластомы. Проводили сравнительный анализ

Таблица 2. Изменение экспрессии потенциальных предиктивных маркеров спинномозговой жидкости (СМЖ) после хирургического удаления первичной глиобластомы ($p < 0,05$)

Table 2. Changes in the expression of potential predictive cerebrospinal fluid (CSF) markers after surgical removal of the primary glioblastoma ($p < 0.05$)

Ген Gene	Белок Protein	СМЖ _{до} / СМЖ _{после} CSF _{before} / CSF _{after}
<i>S100A9</i>	Протеин S100-A9 Protein S100-A9	13,7
<i>PLA2G15</i>	Группа XV фосфолипаза A2 Group XV phospholipase A2	6,2
<i>PPIB</i>	Пептидил-пролил-цис-транс-изомераза B Peptidyl-prolylcis-trans isomerase B	5,8
<i>LTBP2</i>	Бета-связывающий белок 2 латентного трансформирующего фактора роста Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	4,2
<i>VIM</i>	Виментин Vimentin	3,1
<i>LAMB1</i>	Субъединица ламинина бета-1 Laminin subunit beta-1	2,6
<i>STC1</i>	Станниокальцин-1 Stanniocalcin-1	2,6
<i>S100A8</i>	Протеин S100-A8 Protein S100-A8	2,2
<i>NRP1</i>	Нейропилин-1 Neuropilin-1	2,2
<i>COL6A1</i>	Цепь коллагена альфа-1 (VI) Collagen alpha-1 (VI) chain	1,8
<i>HSPA5</i>	Белок 78 кДа, регулируемый глюкозой 78 kDa glucose-regulated protein	1,5

Примечание. СМЖ_{до} — образцы СМЖ, взятые до операции; СМЖ_{после} — образцы СМЖ, взятые после операции.

Note. CSF_{before} — CSF samples taken before surgery; CSF_{after} — CSF samples taken after surgery.

протеомных карт СМЖ больных ГБ, полученных до удаления первичной опухоли и спустя 7 дней после операции. Повышенное внимание уделяли 128 ДЭБ, экспрессия которых снижалась после хирургического вмешательства. Дополнительную фильтрацию кандидатных протеинов осуществляли с учетом их участия в патогенезе ГБ или других злокачественных новообразований (PubMed), уровней этих белков и экспрессии их мРНК в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью головного мозга, взятой в районе первичной опухоли (базы TCGA, CPTAC, ICPC), а также клинической значимости. В результате были отобраны 11 кандидатных маркеров, включая 9 ДЭБ и COL6A1, HSPA5, данные по которым представлены в табл. 2. Проведенный анализ показал, что уровни 3 белков из этого списка (S100A9, PLA2G15, PPIB) в СМЖ больных ГБ после удаления опухоли снижались более чем в 5 раз.

Для оценки клинической значимости панели генов, кодирующих группу потенциальных предиктивных маркеров ГБ (S100A9, PLA2G15, PPIB, LTBP2, VIM, LAMB1, STC1, S100A8, NRP1, COL6A1, HSPA5), с помощью программы GBM-BioDP строили кривые Каплана–Майера для 4 субтипов ГБ (классического, мезенхимального, пронеурального и нейрального) на основе мультигенного прогностического индекса отношения рисков (ОР) (отношения риска события в определенный момент времени (t) в одной и другой группах) (рис. 1). Показатель относится к методам оценки выживаемости и оценивается при проведении регрессионного анализа. Отношение рисков связано с вероятностью того, что событие, не произошедшее к определенному моменту времени, случится в следующий интервал времени. Вероятность того, что событие в одной группе наступит раньше, чем в другой, может быть рассчитана на основании показателя ОР по формуле:

$$p = \text{OP} / (1 + \text{OP}).$$

Согласно данным, представленным на рис. 1, для всех субтипов ГБ наблюдаются статистически значимые значения HR с диапазоном изменения величин от 1,84 до 8,38, что указывает на достоверное увеличение показателей общей выживаемости больных ГБ при снижении мультигенного параметра.

ОБСУЖДЕНИЕ

На протяжении последних лет СМЖ активно изучается как перспективный источник биомаркеров глиом [13]. Протеомный анализ ликвора дал много полезной информации о потенциальных маркерах этих заболеваний, однако, к сожалению, большинство из них оказались низкоспецифичными и не нашли применения в клинической практике [14]. Описанная ситуация оправдывает необходимость продолжения исследований в данном направлении и поиска причин отрица-

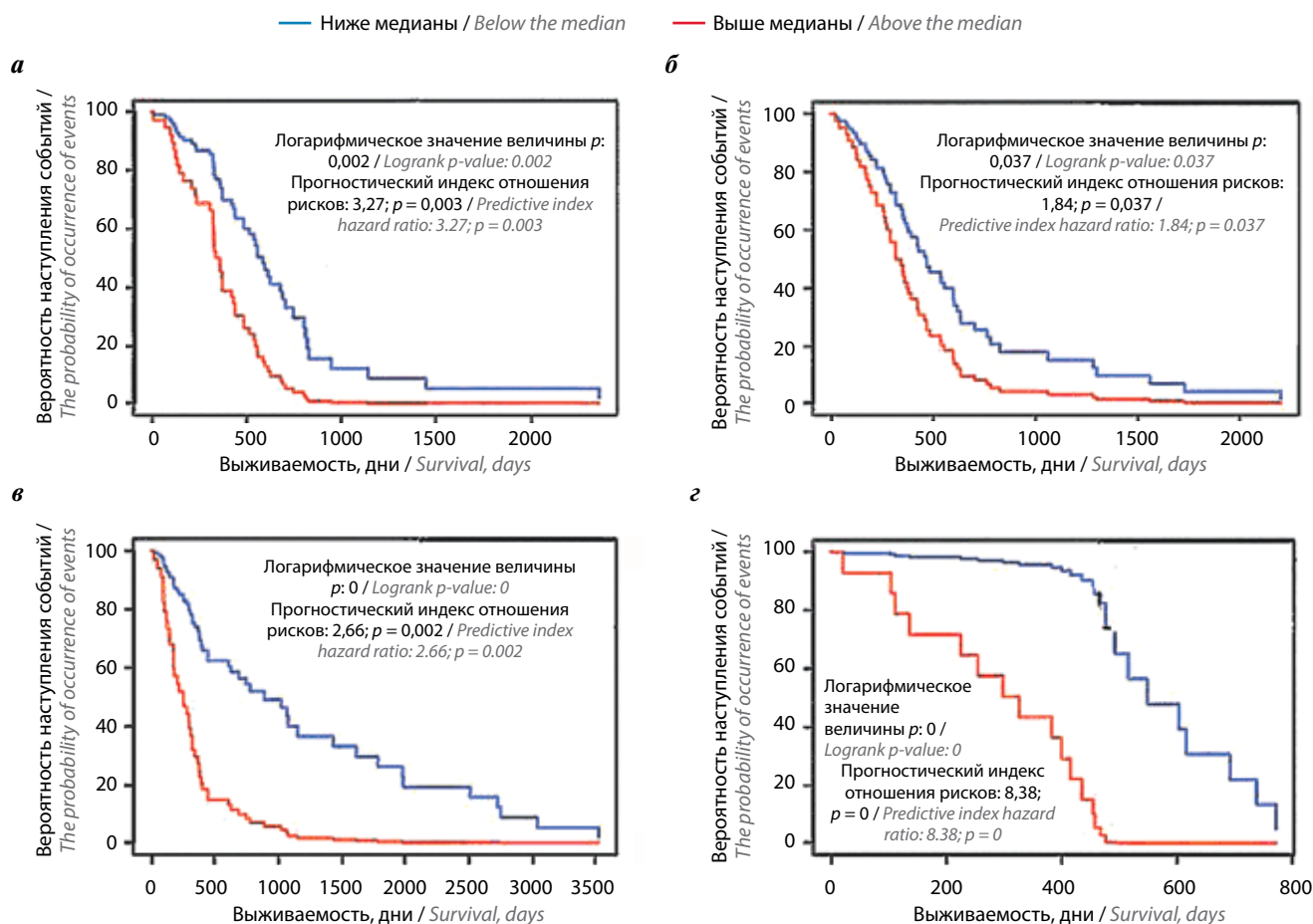
тельного результата. Анализ литературы показал, в частности, что во всех более ранних работах в качестве контроля использовались образцы ликвора от больных неонкологическими патологиями, а вектор исследований в основном был направлен на идентификацию диагностических биомаркеров глиом.

В данном исследовании впервые выполнен сравнительный протеомный анализ СМЖ больных ГБ до и после хирургического удаления первичной опухоли. Такой подход позволяет более точно обнаруживать ДЭБ, имеющие отношение к опухолевому процессу, и формировать панель предиктивных маркеров. Полученные результаты указывают на значительные изменения в протеомном составе СМЖ пациентов спустя 7 дней после оперативного вмешательства, что подтверждается довольно большим количеством ДЭБ. Из 911 идентифицированных протеинов 14 % снижали экспрессию, а 15 % – повышали ($p < 0,05$) более чем в 2 раза. Важно отметить, что внеклеточные белки составляли основную часть протеома СМЖ человека. Большая часть ДЭБ (55,4 %) участвовала в сигнальной трансдукции и клеточной коммуникации.

При идентификации потенциальных предиктивных маркеров основное внимание уделялось ДЭБ, уровни которых снижались после удаления первичной опухоли. В процессе отбора кандидатных белков проводили их многоступенчатую фильтрацию с применением открытых баз данных. Во-первых, оставили группу белков, уровни которых были значительно повышены в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью головного мозга (базы CPTAC и ICPC). Во-вторых, из полученного списка отобрали только белки с увеличенной экспрессией их мРНК в опухолевой ткани по отношению к норме (база TCGA). В-третьих, исключили протеины, для мРНК которых кривые Каплана–Майера статистически значимо не показывали увеличение показателей общей выживаемости больных ГБ. В результате получили список из 11 потенциальных предиктивных маркеров ГБ (S100A9, PLA2G15, PPIB, LTBP2, VIM, LAMB1, STC1, S100A8, NRP1, COL6A1, HSPA5).

Мультигенный анализ клинической значимости полученной тест-системы, по данным TCGA (AgilentG4502A_07_1/2; 497 больных ГБ), выполнили с помощью программы GBM-BioDP с использованием модели пропорциональных интенсивностей Кокса. Согласно данным, представленным на рис. 1, снижение в опухоли экспрессии мРНК, отвечающих перечисленным выше белкам, приводит к увеличению показателей общей выживаемости пациентов с ГБ. Наибольший эффект наблюдался у больных с пронеуральным и нейральным субтипами ГБ.

Согласно данным, представленным в табл. 2, при удалении первичной опухоли уровни белков S100A8 и S100A9 в СМЖ больных ГБ снижались в 2,2 и 13,7 раза соответственно. Экспрессия S100A8/A9 значительно увеличена в мезенхимальном субтипе ГБ и в подгруппе



Анализ выживаемости 497 больных с классическим (а), мезенхимальным (б), пронеуральным (в) и нейральным (з) субтипами глиобластомы на основе мультигенного прогностического индекса отношения рисков с использованием данных по матричным РНК потенциальных предиктивных маркеров из базы «Атлас ракового генома» (<https://gbm-biopd.nci.nih.gov/#genes>)

Survival analysis of 497 patients with classical (a), mesenchymal (b), proneural (v), and neural (z) subtypes of glioblastoma based on the multigenic prognostic index Hazard ratio using matrix RNA data of potential predictive markers from The Cancer Genome Atlas Database (<https://gbm-biopd.nci.nih.gov/#genes>)

дикого типа IDH1, более агрессивном и с плохим прогнозом [15]. Концентрации S100A8/9 повышены в сыворотке крови больных ГБ, но только уровни S100A8 коррелировали с выживаемостью пациентов [15]. S100A8/A9 высоко экспрессируются в опухолевых стволовых клетках и стимулируют миграцию и инвазию клеток глиомы [15].

Гипоксия идентифицирована как новый регулятор экспрессии S100A8/A9. В отличие от S100A8, уровни S100A9 и фактора, индуцируемого гипоксией, 1- α (hypoxia-induced factor-1 α , HIF-1 α) заметно коррелировали со временем до рецидива [16].

LYPLA3. Этот белок кодируется геном *PLA2G15*, участвует в метаболизме липидов, обладает кальций-независимой активностью, опосредует внутри- и внеклеточную передачу сигналов и влияет на различные онкогенные процессы, включая миграцию клеток, инвазию, пролиферацию и ангиогенез [17]. J.E. Jang и соавт. обнаружили, что NFATC3-PLA2G15 FT (транскрипт слияния) регулирует клеточную пролиферацию в качестве гена-драйвера в клеточных линиях колорек-

тального рака, однако функциональные механизмы этого процесса пока не раскрыты [17].

PP1B. Данный белок регулирует свойства глиальных клеток, ускоряя в них превращение транс-конформации в цис-конформацию протеинов, таких как GFAP и NDRG2, что приводит к изменению активности глиальных клеток [18]. В базах данных TCGA, Lembrandt и Severance отмечено увеличение экспрессии PP1B в зависимости от степени злокачественности глиомы. Клетки U87 и TS15–88 имели высокий уровень PP1B, коррелирующий с пролиферацией клеток ГБ. Также этот маркер регулирует рост глиомасфер через процесс убиквитинирования с помощью лигазы E3 [18].

LTBP2. Этот протеин является членом суперсемейства белков внеклеточного матрикса фибриллин/LTBP [19], играет большую роль в клеточной адгезии [20] и может косвенно модулировать активность трансформирующего фактора роста β (transforming growth factor- β , TGF- β), высвобождая LTBP1 из микрофибрилл. Участие LTBP2 в патогенезе злокачественных

опухолей остается неясным. Предложены молекулярные механизмы, объясняющие роль этого маркера как в развитии опухоли, так и в подавлении ее роста [19]. Показано, что экспрессия LTBP2 повышается в тканях и клеточных линиях рака желудка и связана с глубиной инвазии опухоли и стадией метастазирования. Кроме того, снижение экспрессии LTBP2 в клетках рака желудка эффективно подавляет их пролиферацию, миграцию, инвазию и эпителиально-мезенхимальный переход, супрессирует активность GSH и GPX4, приводя к ферроптозу [21].

Виментин. В настоящее время виментин (VIM) рассматривается как маркер высокоагрессивных и метастатических форм почти всех видов рака. Более высокая экспрессия VIM связана с прогрессированием ГБ и снижением показателей выживаемости у пациентов. Активация этого белка наблюдалась в классическом и мезенхимальном подтипах ГБ, а переходы от классической к мезенхимальной ГБ коррелировали с более высокой экспрессией VIM и повышенной пролиферацией и миграцией клеток опухоли [22]. Подавление экспрессии VIM снижало инвазию и миграцию опухолевых клеток, действуя как регулятор AXL рецептора тирозинкиназы [23].

Гипоксия вызывает изменения в локализации сети промежуточных филаментов VIM [24], а экспрессия HIF-1 α положительно коррелирует с уровнями маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (LOX и VIM) в клетках ГБ [25].

LAMB1. Этот белок участвует во многих биологических процессах, включая клеточную адгезию, дифференцировку, миграцию, передачу сигналов и метастазирование [26]. LAMB1 высоко экспрессирован в глиомах высокой степени злокачественности, что предполагает его участие в прогрессировании опухолевого процесса [27]. Этот белок взаимодействует с интегринами на поверхности опухолевых клеток [28], способствуя их адгезии и миграции. Кроме того, LAMB1 влияет на экспрессию факторов роста и промоторов инвазии, таких как фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), TGF- β и матриксная металлопротеиназа 2 (MMP-2), что усиливает процессы ангиогенеза и инвазии [27].

STC1. Этот гликопротеин связан с ангиогенезом, клеточной пролиферацией, инвазией, метастазированием, апоптозом и воспалением [29, 30]. Повышенная экспрессия STC1, наблюдаемая при ГБ, способствует прогрессированию заболеваний [30]. Кроме того, экспрессия STC1 увеличивается в условиях гипоксии, а HIF1- α активирует STC1 в опухолевых клетках [31, 32]. Концентрация этого гликопротеина в СМЖ при ГБ выше, чем при глиоме низкой степени злокачественности [32]. Сообщается, что STC1 активирует сигнальный каскад PI3K (phosphoinositide-3-kinase, фосфоинозитид-3-киназа)/Akt и JNK [33].

NRP1. Этот белок высоко экспрессируется в клетках ГБ [34], и его повышенная экспрессия связана с плохим прогнозом у пациентов [35]. NRP1 регулирует

ангиогенез и действует как корецептор для TGF- β , фактора роста тромбоцитов (platelet-derived growth factor) и нейротрофического фактора глиальной клеточной линии (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) [34]. GDNF увеличивает экспрессию мРНК и белка NRP1 и способствует прогрессированию ГБ [34]. Сообщается, что субпопуляция клеток NRP1+ демонстрирует повышенную экспрессию маркеров плюрипотентности и высокие способности клеток к миграции и самообновлению. Помимо этого, NRP1 является прямой мишенью HIF-1 α , повышающего экспрессию E-кадгерина, MMP-2 и VIM в условиях гипоксии [36].

COL6A1. Этот белок участвует в миграции и инвазии опухолевых клеток [37, 38], а его экспрессия в глиоме значительно выше, чем в окружающих нормальных тканях [38]. COL6A1 связан с ангиогенезом в условиях гипоксической микросреды через VEGF и сигнальный путь PI3K/Akt [37, 38]. Под контролем P4HA1 в условиях гипоксии COL6A1 повышает экспрессию CD31 и дифференцировку опухолевых стволовых клеток в эндотелиальные клетки в опытах *in vitro* и *in vivo*. Предполагается, что сигнальный путь P4HA1/COL6A1 является адаптивным ответом на гипоксическую микросреду [37].

HSPA5. Данный белок индуцирует окислительный стресс, гипоксию [39] и способствует агрессивному росту и радиорезистентности ГБ. HSPA5 может активировать онкогенные пути, участвуя в регуляции пролиферации, апоптоза и подвижности опухолевых клеток [40]. По сравнению с первичными глиомами этот белок высоко экспрессирован в рецидивирующих глиомах и, как полагают, является потенциальным предиктивным маркером [39]. Таргетирование HSPA5 подавляет самообновление и радиорезистентность опухолевых стволовых клеток (особенно мезенхимального подтипа) *in vitro* и *in vivo*, что сопровождается подавлением путей STAT3, ядерного фактора каппа-би (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) и C/EBP β [40].

На основе полученных результатов можно сделать вывод о том, что СМЖ является уникальным биологическим объектом для открытия протеомных маркеров ГБ. Удаление первичной опухоли приводит к изменению протеомного ландшафта СМЖ больных ГБ, что может успешно использоваться для идентификации потенциальных предиктивных маркеров заболевания, играющих важную роль в глиомогенезе. Биоинформатический комплексный анализ протеомных карт СМЖ, полученных на разных этапах терапии ГБ, представляет новые возможности для оценки эффективности терапии и предсказания рецидива заболевания. Открытые протеомные и геномные базы облегчают отбор и валидацию потенциальных биомаркеров ГБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спинномозговая жидкость — уникальный источник биомаркеров ГБ для мониторинга наличия и про-

грессирования заболевания. В настоящем исследовании впервые проведено картирование протеома СМЖ больных ГБ до и после хирургического удаления первичной опухоли. В целом идентифицированы 911 протеинов, 266 из которых являлись ДЭБ. Полученные результаты указывают на значительные изменения в протеомном составе СМЖ больных ГБ после оперативного вмешательства, что может успешно использоваться для иден-

тификации потенциальных предиктивных маркеров. В результате комплексного биоинформатического анализа ДЭБ с использованием открытых баз данных предложена основа для создания тест-системы из 11 потенциальных предиктивных маркеров ГБ (S100A9, PLA2G15, PPIB, LTBP2, VIM, LAMB1, STC1, S100A8, NRP1, COL6A1, HSPA5) для оценки эффективности терапии и предсказания рецидива заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987–96. DOI: 10.1056/NEJMo a043330
2. Yan H., Parsons D.W., Jin G. et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009;360(8):765–73. DOI: 10.1056/nejmo a0808710
3. Sturm D., Witt H., Hovestadt V. et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 2012;22(4):425–37. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.08.024
4. Brennan C.W., Verhaak R.G.W., McKenna A. et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013;155(2):462–77. DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.034
5. Wick A., Kessler T., Platten M. et al. Superiority of temozolomide over radiotherapy for elderly patients with RTK II methylation class, MGMT promoter methylated malignant astrocytoma. *Neurooncol* 2020;22(8):1162–72. DOI: 10.1093/neuonc/noaa033
6. Weller M., van den Bent M., Preusser M. et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;18(3):170–86. DOI: 10.1038/s41571-020-00447-z
7. Sørensen M.D., Fosmark S., Hellwege S. et al. Chemoresistance and chemotherapy targeting stem-like cells in malignant glioma. *Adv Exp Med Biol* 2015;853:111–38. DOI: 10.1007/978-3-319-16537-0
8. Sastry R.A., Shankar G.M., Gerstner E.R. et al. The impact of surgery on survival after progression of glioblastoma: a retrospective cohort analysis of a contemporary patient population. *J Clin Neurosci* 2018;53:41–7. DOI: 10.1016/j.jocn.2018.04.004
9. Aebersold R., Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 2016;537(7620):347–55. DOI: 10.1038/nature19949
10. Jiang Y., Sun A., Zhao Y. et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma. *Nature* 2019;567(7747):257–61. DOI: 10.1038/s41586-019-0987-8
11. Coscia F., Lengyel E., Duraiswamy J. et al. Multi-level proteomics identifies CT45 as a chemosensitivity mediator and immunotherapy target in ovarian cancer. *Cell* 2014;175(1):159–70. DOI: 10.1016/j.cell.2018.08.065
12. Bryukhovetskiy A., Shevchenko V., Kovalev S. et al. To the novel paradigm of proteome-based cell therapy of tumors: through comparative proteome mapping of tumor stem cells and tissuespecific stem cells of humans. *Cell Transplant* 2014;23(Suppl. 1):151–70. DOI: 10.3727/096368914X684907
13. Shen F., Zhang Y., Yao Y. et al. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid: toward the identification of biomarkers for gliomas. *Neurosurg Rev* 2014;37(3):367–80. DOI: 10.1007/s10143-014-0539-5
14. Schmid D., Warnken U., Latzer P. et al. Diagnostic biomarkers from proteomic characterization of cerebrospinal fluid in patients with brain malignancies. *J Neurochem* 2021;158(2):522–38. DOI: 10.1111/jnc.15350
15. Wang H., Mao X., Ye L. et al. The role of the S100 protein family in glioma. *J Cancer* 2022;13(10):3022–30. DOI: 10.7150/jca.73365
16. Grebhardt S., Veltkamp C., Ströbel P. et al. Hypoxia and HIF-1 increase S100A8 and S100A9 expression in prostate cancer. *Int J Cancer* 2012;131(12):2785–94. DOI: 10.1002/ijc.27591
17. Jang J.E., Kim H.P., Han S.W. et al. NFATC3-PLA2G15 fusion transcript identified by RNA sequencing promotes tumor invasion and proliferation in colorectal cancer cell lines. *Cancer Res Treat* 2019;51(1):391–401. DOI: 10.4143/crt.2018.103
18. Oh Y., Lee E.H., Kang S.G. PPIB is overexpressed in glioblastoma and regulates tumor growth by inducing self-ubiquitination by E3 ligase, Smurf2. *Brain Tumor Res Treat* 2022;10:S255. DOI: 10.14791/btrt.2022.10.F-1443
19. Zhao J., Liu X., Cong K. et al. The prognostic significance of LTBP2 for malignant tumors: Evidence based on 11 observational studies. *Medicine* 2022;101(17):e29207. DOI: 10.1097/MD.00000000000029207
20. Wang J., Liang W.J., Min G.T. et al. LTBP2 promotes the migration and invasion of gastric cancer cells and predicts poor outcome of patients with gastric cancer. *Int J Oncol* 2018;52(6):1886–98. DOI: 10.3892/ijo.2018.4356
21. Wang T.A., Zhou Z., Wang C. et al. LTBP2 knockdown promotes ferroptosis in gastric cancer cells through p62-keap1-Nrf2 pathway. *BioMed Res Int* 2022;2022:1–15. DOI: 10.1155/2022/6532253
22. Li Q., Aishwarya S., Li J.P. et al. Gene expression profiling of glioblastoma to recognize potential biomarker candidates. *Front Genet* 2022;13:832742. DOI: 10.3389/fgene.2022.832742
23. Lin H., Hong Y., Huang B. et al. Vimentin overexpressions induced by cell hypoxia promote vasculogenic mimicry by renal cell carcinoma cells. *BioMed Res Int* 2019;2019:1–13. DOI: 10.1155/2019/7259691
24. Liu T., Guevara O.E., Warburton R.R. et al. Regulation of vimentin intermediate filaments in endothelial cells by hypoxia. *Am J Physiol* 2010;299(2):363–73. DOI: 10.1152/ajpcell.00057.2010
25. Srivastava C., Irshad K., Dikshit B. et al. FAT1 modulates EMT and stemness genes expression in hypoxic glioblastoma. *Int J Cancer* 2018;142(4):805–12. DOI: 10.1002/ijc.31092
26. Li Y., Deng G., Qi Y. et al. Bioinformatic profiling of prognosis-related genes in malignant glioma microenvironment. *Med Sci Monit* 2020;26:e924054-1. DOI: 10.12659/MSM.924054
27. Chen T.Y., Liu Y., Chen L. et al. Identification of the potential biomarkers in patients with glioma: a weighted gene co-expression network analysis. *Carcinogenesis* 2020;41(6):743–50. DOI: 10.1093/carcin/bgz194
28. Virga J., Bognár L., Hortobágyi T. et al. Prognostic role of the expression of invasion-related molecules in glioblastoma. *J Neurol Surg A: Cent Eur Neurosurg* 2017;78(1):12–9. DOI: 10.1055/s-0036-1584920
29. Zhang F., Wang X., Bai Y. et al. Development and validation of a hypoxia-related signature for predicting survival outcomes in patients with bladder cancer. *Front Genet* 2021;12:670384. DOI: 10.3389/fgene.2021.670384
30. Xiong Y., Wang Q. STC1 regulates glioblastoma migration and invasion via the TGFβ/SMAD4 signaling pathway. *Mol Med Rep* 2019;20(4):3055–64. DOI: 10.3892/mmr.2019.10579

31. Yeung H.Y., Lai K.P., Chan H.Y. et al. Hypoxia-inducible factor-1-mediated activation of stanniocalcin-1 in human cancer cells. *Endocrinology* 2005;146(11):4951–60. DOI: 10.1210/en.2005-0365
32. Sakata J., Sasayama T., Tanaka K. et al. MicroRNA regulating stanniocalcin-1 is a metastasis and dissemination promoting factor in glioblastoma. *J Neurooncol* 2019;142:241–51. DOI: 10.1007/s11060-019-03113-2
33. Ma X., Gu L., Li H. et al. Hypoxia-induced overexpression of stanniocalcin-1 is associated with the metastasis of early stage clear cell renal cell carcinoma. *J Transl Med* 2015;13(1):1–14. DOI: 10.1186/s12967-015-0421-4
34. Sun S., Lei Y., Li Q. et al. Neuropilin-1 is a glial cell line-derived neurotrophic factor receptor in glioblastoma. *Oncotarget* 2017;8(43):74019–35. DOI: 10.18632/oncotarget.18630
35. Liu Y., Liu Y., Gao Y. et al. H19-and hsa-miR-338-3p-mediated NRP1 expression is an independent predictor of poor prognosis in glioblastoma. *PloS One* 2021;16(11):e0260103. DOI: 10.1371/journal.pone.0260103
36. Fu R., Du W., Ding Z. et al. HIF-1 α promoted vasculogenic mimicry formation in lung adenocarcinoma through NRP1 upregulation in the hypoxic tumor microenvironment. *Cell Death Dis* 2021;12(4):394. DOI: 10.1038/s41419-021-03682-z
37. Han X., Wang Q., Fang S. et al. P4HA1 Regulates CD31 *via* COL6A1 in the Transition of Glioblastoma Stem-Like Cells to Tumor Endothelial Cells. *Front Oncol* 2022;12:836511. DOI: 10.3389/fonc.2022.836511
38. Lin H., Yang Y., Hou C. et al. Identification of COL6A1 as the key gene associated with antivascular endothelial growth factor therapy in glioblastoma multiforme. *Genet Test Mol Biomarkers* 2021;25(5):334–45. DOI: 10.1089/gtmb.2020.0279
39. Wen X., Chen X., Chen X. Increased expression of GRP78 correlates with adverse outcome in recurrent glioblastoma multiforme patients. *Turk Neurosurgery* 2020;30(1):11–6. DOI: 10.5137/1019-5149.jtn.21840-17.4
40. Chen Z., Wang H., Zhang Z. et al. Cell surface GRP78 regulates BACE2 *via* lysosome-dependent manner to maintain mesenchymal phenotype of glioma stem cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2021;40(1):1–17. DOI: 10.1186/s13046-020-01807-4

Вклад авторов

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

Authors' contributions

N.E. Arnotskaya: obtaining mass spectrometric data, editing editing.
 T.I. Kushnir: statistical data analysis;
 I.A. Kudryavtsev: preparation of samples for analysis;
 A.A. Mitrofanov: review of publications on the topic of the article;
 A.Kh. Bekyashev: scientific editing;
 V.E. Shevchenko: developing the research design, analysis of the received data, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.Е. Арноцкая / N.E. Arnotskaya: <https://orcid.org/0000-0002-0154-8604>
 Т.И. Кушнир / T.I. Kushnir: <https://orcid.org/0000-0001-9626-6847>
 И.А. Кудрявцев / I.A. Kudryavtsev: <https://orcid.org/0000-0001-7588-1066>
 А.А. Митрофанов / A.A. Mitrofanov: <https://orcid.org/0000-0002-4125-7342>
 А.Х. Бекашев / A.Kh. Bekyashev: <https://orcid.org/0000-0002-4160-9598>
 В.Е. Шевченко / V.E. Shevchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>

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

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

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 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 gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 19.04.2023. **Принята к публикации:** 29.05.2023.
Article submitted: 19.04.2023. **Accepted for publication:** 29.05.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-126-131



Взаимосвязь хинолоновых регуляторов *Pseudomonas aeruginosa* и уровня иммуноглобулинов в крови больных раком легких

А.В. Шестопалов^{1,2}, О.И. Кит³, В.В. Давыдов¹, Я.М. Байзыанова¹, Е.Ю. Златник³, И.А. Новикова³,
А.Б. Сагакянц³, С.А. Апполонова², Н.Е. Москалева², С.А. Румянцев^{1,2}

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

²Центр цифровой и трансляционной биомедицины ООО «Центр молекулярного здоровья»; Россия, 117218 Москва, Нахимовский проспект, 32, стр. 1;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037 Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63

Контакты: Вадим Вячеславович Давыдов vaddavydov@mail.ru

Введение. Большой интерес у исследователей в области онкологии вызывает вопрос о роли микроорганизмов в развитии злокачественных новообразований.

Цель исследования – изучить содержание 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолона (PQS) и 2-гептил-4-хинолона (HHQ), продуцируемых *Pseudomonas aeruginosa*, в крови больных раком легких и проанализировать взаимосвязь этого показателя с изменением уровня иммуноглобулинов и фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) в крови.

Материалы и методы. Выполнены количественное определение PQS и HHQ в крови больных с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также анализ иммуноглобулинов класса G (IgG), секреторного иммуноглобулина A (s-IgA) и VEGF с помощью твердофазного иммуноферментного анализа.

Результаты. Исследования показали, что уровень PQS в крови больных раком легких в 2 раза выше, чем у обследованных контрольной группы. На фоне данного сдвига наблюдаются снижение уровня иммуноглобулинов IgG, а также повышение содержания s-IgA и VEGF в крови.

Заключение. У больных раком легких происходит повышение уровня PQS в крови, что формирует предпосылки для отягощения течения основного заболевания и ухудшения его прогноза.

Ключевые слова: рак легких, 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон, 2-гептил-4-хинолон, цитокины, иммуноглобулины, *Pseudomonas aeruginosa*, кворум-сенсинг

Для цитирования: Шестопалов А.В., Кит О.И., Давыдов В.В. и др. Взаимосвязь хинолоновых регуляторов *Pseudomonas aeruginosa* и уровня иммуноглобулинов в крови больных раком легких. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):126–31. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-126-131

Interrelation between *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal and the level of immunoglobulins in the blood of patients with lung cancer

A.V. Shestopalov^{1,2}, O.I. Kit³, V.V. Davydov¹, Ya.M. Baizyanova¹, E.Yu. Zlatnik³, I.A. Novikova³, A.B. Sagakyants³,
S.A. Appolonova², N.E. Moskaeva², S.A. Rumyantsev^{1,2}

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

²Center of Digital and Translational Biomedicine, Center of Molecular Health; Bld. 1, 32 Nakhimovskii prospekt, Moscow 117218, Russia;

³National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 14th Line, Rostov-on-Don 344037, Russia

Contacts: Vadim Vyacheslavovich Davydov vaddavydov@mail.ru

Introduction. Researchers in the field of oncology have a significant interest in the role of microorganisms in development of malignant neoplasms.

Aim. To study the levels of 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS) and 2-heptyl-4-quinolone (HHQ) produced by *Pseudomonas aeruginosa* in the blood of patients with lung cancer and to analyze the relation between their changes and changes in the level of immunoglobulins and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the blood of patients with lung cancer.

Materials and methods. PQS and HHQ were quantified in the blood of patients using high performance liquid chromatography. The levels of immunoglobulins G (IgG), secretory immunoglobulin A (s-IgA), and VEGF in the blood were determined using ELISA.

Results. Analysis have shown that the level of PQS in the blood of patients with lung cancer is 2-fold higher than in the control group. This change is accompanied by a decrease in the level of immunoglobulins IgG, as well as an increase in the content of s-IgA and growth factor VEGF in the blood.

Conclusion. PQS level in the blood of patients with lung cancer is elevated creating conditions aggravating the course of the main disease and worsening its prognosis.

Keywords: lung cancer, 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, 2-heptyl-4-quinolone, cytokines, immunoglobulins, *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing

For citation: Shestopalov A.V., Kit O.I., Davydov V.V. et al. Interrelation between quinolone signal of *Pseudomonas aeruginosa* and the level of immunoglobulins in the blood of patients with lung cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(2):126–31. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-126-131

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно проводятся исследования, связанные с выяснением роли микрофлоры в развитии злокачественных новообразований у человека [1–4]. Одним из микроорганизмов, способствующих возникновению данной патологии, является *Pseudomonas aeruginosa*. Эта бактерия проявляет тропность к бронхам, в связи с чем играет большую роль в развитии внутрибольничных пневмоний [5, 6]. Доказано также участие *Pseudomonas aeruginosa* в формировании хронической обструктивной болезни легких [7] как одного из предраковых заболеваний [8, 9].

В процессе метаболизма триптофана у *Pseudomonas aeruginosa* синтезируются 2-гептил-4-хинолон (HHQ) и 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон (PQS). Эти метаболиты выступают в роли хинолиновых регуляторов и играют важную роль в формировании социального поведения бактерий (кворум-сенсинга) и, как следствие, в образовании бактериальных пленок [10, 11]. Они выступают в качестве индуктора целого ряда генов и обеспечивают повышение вирулентности микроорганизма, а также усиление его негативного эффекта на организм-хозяина. Следствием этого становятся угнетение иммунной системы и формирование воспалительных изменений в бронхах [12–14]. Однако, несмотря на все эти хорошо известные факты, до сих пор все еще не предприняты попытки оценить характер изменений уровней хинолоновых регуляторов *Pseudomonas aeruginosa* HHQ и PQS в крови больных раком легких и провести всесторонний анализ таких сдвигов с изменением уровня иммуноглобулинов и фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) в крови. Изучению этих вопросов и посвящено настоящее исследование.

Цель исследования — изучить содержание PQS и HHQ, продуцируемых *Pseudomonas aeruginosa*, в крови больных немелкоклеточным раком легких (НМРЛ) и проанализировать взаимосвязь этих показателей с изменением уровня иммуноглобулинов и VEGF в крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в 2020–2022 гг. в Национальном медицинском исследовательском центре

онкологии Минздрава России (Ростов-на-Дону). В исследование включены 40 больных НМРЛ (22 мужчины и 18 женщин; средний возраст $62,1 \pm 6,4$ года) и 23 здоровых донора (7 мужчин, 16 женщин; средний возраст $40,4 \pm 4,1$ года). Первая стадия НМРЛ диагностирована у 4 пациентов, II стадия — у 11, III стадия — у 15, IV стадия — у 10. Все больные получали комплексное противоопухолевое лечение по стандартным протоколам.

Критериями включения в группу больных НМРЛ были возраст 18–80 лет, отсутствие инфекционных заболеваний и приема антибактериальных и пробиотических препаратов в течение последних 3 мес.

Пациенты с НМРЛ не включались в исследование при их тяжелом общем состоянии вследствие основного заболевания или осложнений, вызванных им, наличии инфекционных заболеваний в течение последних 3 мес и приеме антибактериальных и пробиотических препаратов в течение последних 3 мес.

Критериями включения в группу условно здоровых доноров были возраст 18–80 лет, отсутствие инфекционных, иммунопатологических и онкологических заболеваний, приема антибактериальных и пробиотических препаратов в течение последних 3 мес, беременности и кормления грудью.

После формирования списка донорам и больным присваивали порядковый номер, пробам — лабораторный номер. Образцы сывороток хранились до момента исследования в биобанке Национального медицинского исследовательского центра онкологии Минздрава России при -80°C .

Для определения содержания PQS и HHQ к 300 мкл плазмы крови добавляли внутренний стандарт 4-гидрокси-2-метил-хинолон до концентрации 2 нг/мл (6 мкл раствора в ацетонитриле с концентрацией 100 нг/мл) и 1 мл 0,5 М карбонатного буфера (pH 10). После перемешивания экстрагировали смесью 1 мл этилацетата и 1 мл диэтилового эфира в течение 10 мин. Центрифугировали 5 мин при 3000 об./мин и отбирали верхний органический слой. Пробу выпаривали досуха при температуре 60°C в токе азота. Сухой остаток смешивали с 100 мкл смеси пропилового ангидрида и пиридина в соотношении 3:2, после чего нагревали при 80°C в течение 30 мин. Полученную смесь выпаривали

при температуре 80 °С. Сухой остаток растворяли в 100 мкл ацетонитрила и анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Хроматографическое разделение проводили при помощи хроматографа Agilent 1200 (Agilent Tech., США) с использованием колонки Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 × 50 мм, 1,8 μm, 80Å). Температура колонки — 40 °С. Подвижная фаза А — 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде, В — ацетонитрил. Градиент подвижной фазы — от 2 % В до 90 % в течение 5 мин и далее до 90 % к 10-й минуте анализа. Скорость потока — 0,3 мл/мин.

Для детектирования использовали масс-спектрометрический детектор с тройным квадруполом Agilent 6465 с источником ионизации «электроспрей» в режиме MRM (положительная область). Характерные масс-спектрометрические переходы: 244,1 → 159,1 (HHQ), 260,1 → 175,1 (PQS), 160,1 → 77,1 (внутренний стандарт). Температура осушающего газа — 300 °С, поток — 8 л/мин, давление в небулайзере — 20 psi.

Для обработки полученных данных использовали программное обеспечение MassHunter (Agilent Tech., США). Калибровочные кривые построены методом внутреннего стандарта. Они были линейны в диапазоне концентраций 1–200 пг/мл для PQS и 10–500 пг/мл для HHQ.

В сыворотке здоровых доноров и больных НМРЛ методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) определяли концентрацию VEGF с использованием тест-систем производства АО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия), а также иммуноглобулинов

класса G (IgG) и секреторного иммуноглобулина A (s-IgA) с применением тест-систем ООО «ХЕМА» (Россия) в соответствии с инструкциями производителей.

При проведении статистического анализа использовали пакеты программ MedCalc и Statistica 13.3 (StatSoft Inc., США). В связи с ненормальным распределением полученных данных (что было установлено с помощью критерия Шапиро–Уилка) результаты исследований представляли в форме медианы (Me) и межквартильного размаха — 25-й и 75-й процентиля (Me (нижний квартиль — верхний квартиль)). Достоверность различий между группами оценивали на основании U-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Для изучения характера взаимосвязей между исследованными показателями использовали корреляционный анализ с вычислением коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные исследования показали, что в крови больных НМРЛ наблюдается уменьшение концентрации IgG на 14 %, а также увеличение уровней s-IgA и VEGF на 125 и 43 % соответственно по сравнению с этими показателями здоровых обследуемых (см. таблицу).

Обнаруженные сдвиги свидетельствуют о том, что в организме больных НМРЛ происходят активные процессы, связанные с ростом злокачественных клеток, воспалением, угнетением гуморального иммунитета и тканевой гипоксией. Все они вполне укладываются в рамки современных представлений о характере изменений со стороны иммунной системы и продукции

Изменение уровней хинолоновых регуляторов Pseudomonas aeruginosa, иммуноглобулинов и фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) в крови больных раком легких

Changes in the levels of quinolone regulators of Pseudomonas aeruginosa and the level of immunoglobulins and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the blood of patients with lung cancer

Показатель Parameter	Контроль, медиана (нижний квартиль : верхний квартиль) Control, median (lower quartile: upper quartile)	Рак легких, медиана (нижний квартиль : верхний квартиль) Tumor of lung median (lower quartile: upper quartile)	p	Корреляционная взаимосвязь с изменением уровня PQS Correlation interrelation with change level of PQS
PQS, пг/мл	9,4 (5 : 23)	18 (10 : 21)	0,02	—
HHQ, пг/мл	10 (10; 21)	10 (10 : 23)	0,9	0,077 0,066
IgG, г/л	20,4 (18 : 22)	17,6 (15 : 20,2)	0,04	0,313 0,027
s-IgA, г/л	3,15 (2,4 : 4,0)	7,1 (4,7 : 11,5)	0,0001	0,722 0,011
VEGF, пг/мл	239 (108 : 409)	344 (23 : 543)	0,0004	0,309 0,071

Примечание. PQS — 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон; HHQ — 2-гептил-4-хинолон; IgG — иммуноглобулины класса G; s-IgA — секреторный иммуноглобулин A. p — достоверность по отношению к контрольной группе.

Note. PQS — 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone; HHQ — 2-heptyl-4-quinolone; IgG — class G immunoglobulins; s-IgA — secretory immunoglobulin A. The p -value in relation to the control group.

проангиогенных факторов при злокачественных новообразованиях [15, 16]. С целью углубления существующих представлений о механизмах формирования подобных изменений при НМРЛ было изучено содержание в крови больных продуктов катаболизма триптофана *Pseudomonas aeruginosa* HHQ и PQS.

Проведенные исследования показали, что содержание HHQ в крови больных НМРЛ не отличается от такового у здоровых обследуемых. В то же время уровень PQS в крови у них в 2 раза выше, чем в контрольной группе.

Согласно современным представлениям HHQ и PQS не продуцируются клетками тканей организма человека. Они являются биологически активными продуктами метаболизма триптофана у *Pseudomonas aeruginosa*. Более того, эти бактерии используют их в качестве аутоиндукторов, которые выступают в роли своеобразного химического сигнала, обеспечивающего межклеточные коммуникации бактерий (кворум-сенсинг) за счет регуляции скорости экспрессии соответствующих генов и связанной с ним регуляции вирулентности микроорганизма и его устойчивости к антибиотикам, а также повреждение тканей организма-хозяина, угнетение его иммунной системы и задержку репарации эпителия дыхательных путей [13, 14, 17]. Об этом, а также о повышении проницаемости сосудов, по-видимому, говорит наблюдаемое увеличение уровней VEGF и s-IgA в сыворотке наряду с неглубоким, хотя и статистически значимым снижением уровня IgG у больных по сравнению с донорами. Судя по таким данным, ответ на *Pseudomonas aeruginosa* у больных происходит преимущественно за счет воспалительной, а не иммунной реакции.

Согласно результатам исследований, активность PQS как аутоиндуктора многократно превышает таковую у HHQ, который, в свою очередь, выступает в качестве предшественника в процессе синтеза PQS [17, 18].

С учетом данных литературы о влиянии PQS на состояние показателей гуморального иммунитета и уровень цито- и хемокинов как факторов воспаления [18, 19] мы провели корреляционный анализ изменений содержания PQS, иммуноглобулинов и VEGF в крови больных НМРЛ. В ходе исследования выявлена существенная корреляция между уровнем PQS и содержанием в крови IgG ($r = 0,313$) и s-IgA ($r = 0,722$). У больных НМРЛ обнаружена умеренная корреляционная связь между уровнями PQS и VEGF ($r = 0,309$).

Установленная обратная корреляционная зависимость между повышением уровня PQS и изменением содержания IgG в крови больных НМРЛ подтверждает известный факт влияния данного бактериального метаболита на иммунный ответ организма-хозяина [17, 18, 20]. В то же время корреляция между уровнями PQS и s-IgA указывает на вероятное участие PQS в регуляции возникновения острой фазы воспаления слизистых оболочек, о чем говорит значительное количество s-IgA в крови, связанное с повышением проницаемо-

сти капилляров и нарушением мукозальных барьеров при НМРЛ. Предположение о возможной роли PQS в развитии воспалительного процесса, в том числе в слизистой бронхов, подтверждается корреляционной взаимосвязью между его уровнем и содержанием VEGF в крови. Более того, возникающий сдвиг со стороны VEGF позволяет думать о существовании определенной зависимости между величиной накопления PQS в крови и выраженностью гипоксии в тканях.

Полученные данные указывают на особую роль PQS в развитии злокачественного процесса в организме. При этом возникает вопрос о причинах повышения уровня данного метаболита в крови больных НМРЛ. Согласно результатам исследования, присутствие подобного сдвига в крови связано с метаболизмом *Pseudomonas aeruginosa* как одного из потенциально патогенных представителей микрофлоры в организме человека. Можно предположить, что при раке легких ее рост усиливается, что отягощает течение основного заболевания.

Известно, что *Pseudomonas aeruginosa* способна образовывать бактериальные пленки в бронхах. Следствием этого являются формирование воспалительных изменений в бронхах, нарушение процессов их регенерации, торможение местной иммунной реакции и злокачественная трансформация клеток бронхиального эпителия [12, 14, 18].

В настоящее время в литературе активно обсуждается вопрос об участии микроорганизмов в развитии злокачественных заболеваний [1–4]. Однако сведения о том, что *Pseudomonas aeruginosa* способствует возникновению опухолевых процессов, отсутствуют. Полученные же нами данные позволяют предположить определенное значение данного микроорганизма в прогрессировании НМРЛ.

Еще одной вероятной причиной увеличения продукции PQS и роста *Pseudomonas aeruginosa* может быть проведение больным НМРЛ химиотерапии. Применение отдельных химиотерапевтических средств, в том числе антибиотиков, способствует развитию устойчивости микроорганизма к их эффекту [21], повышению вирулентности, усилению их роста и формированию в бронхах бактериальных пленок [12, 14, 20]. Одним из последствий этого могут быть описанные изменения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уровень PQS в крови больных НМРЛ в 2 раза превышает таковой у обследованных контрольной группы. На фоне данного сдвига у пациентов выявляется снижение содержания IgG, а также повышение уровней s-IgA и VEGF в крови. Все это отражает вероятный эффект данного бактериального метаболита на иммунный ответ организма-хозяина, его роль в регуляции острой фазы воспаления слизистых оболочек и выраженность тканевой гипоксии при НМРЛ.

С учетом того, что PQS в организме человека синтезируется только в процессе обмена триптофана бак-

териями *Pseudomonas aeruginosa* как постоянными представителями микрофлоры, можно прийти к заключению об усилении их роста в бронхах при НМРЛ. Независимо от причины появления подобного сдвига, его возникновение формирует предпосылки для отягощения течения основного заболевания и ухудшения прогноза. Несомненно, для проверки высказанных предположе-

ний о возможных причинах усиления продукции PQS и соответственно повышения роста *Pseudomonas aeruginosa* в организме больных НМРЛ необходимы специальные исследования. Всестороннее изучение данного вопроса позволит разработать принципиально новые подходы к терапии НМРЛ, поэтому оно станет предметом наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Багиров Н.С., Петухов И.Н., Дмитриев Н.В., Григорьевская З.В. Микробиом и рак: есть ли связь? Обзор литературы. Злокачественные опухоли 2018;3(1):56–69. DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-3s1-56-69
- Bagirov N.S., Petukhov I.N., Dmitriev N.V., Grigorevskaya Z.V. Microbiom and cancer: is there interconnection? Literature review. Zlokachestvennye opukholi = Malignant tumors 2018;3(1):56–69. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-3s1-56-69
- Aadra P.B., Matthew R.R., Scott J.B. The role of the microbiome in cancer development and therapy. CA Cancer J Clin 2017;67(4):326–44. DOI: 10.3322/caac.21398
- Sánchez-Alcoholado L., Ramos-Molina B., Otero A. et al. The Role of the gut microbiome in colorectal cancer development and therapy response. Cancers 2020;12(6):1406. DOI: 10.3390/cancers12061406
- Teles F.R.F., Alawi F., Castilho R.M., Wang Y. Association or causation? Exploring the oral microbiome and cancer links. J Dent Res 2020;99:1411–24. DOI: 10.1177/0022034520945242
- Maurice N.M., Bedi B., Sadikot R.T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections. Am J Respir Cell Mol Biol 2018;58(4):428–39. DOI: 10.1165/rcmb.2017-0321TR
- Riquelme S.A., Liimatta K., Fok Lung T.W. et al. *Pseudomonas aeruginosa* utilizes host-derived itaconate to redirect its metabolism to promote biofilm formation. Cell Metab 2020;31(6):1091–106. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.04.017
- García-Núñez M., Martí S., Puig C. et al. Bronchial microbiome, PA biofilm-forming capacity and exacerbation in severe COPD patients colonized by *P. aeruginosa*. Future Microbiol 2017;12: 379–92. DOI: 10.2217/fmb-2016-0127
- Biswas A., Mehta H.J., Folch E.E. Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: inter-relationships. Curr Opin Pulm Med 2018;24(2):152–60. DOI: 10.1097/MCP.0000000000000451
- Patel B., Priefer R. Impact of chronic obstructive pulmonary disease, lung infection, and/or inhaled corticosteroids use on potential risk of lung cancer. Life Sci 2022;294:120374. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120374
- Montagut E.J., Marco M.P. Biological and clinical significance of quorum sensing alkylquinolones: current analytical and bioanalytical methods for their quantification. Anal Bioanal Chem 2021;413(18):4599–618. DOI: 10.1007/s00216-021-03356-x
- Yang L., Yuan T.J., Wan Y. et al. Quorum sensing: a new perspective to reveal the interaction between gut microbiota and host. Future Microbiol 2022;17:293–309. DOI: 10.2217/fmb-2021-0217
- Liu Y.-C., Hussain F., Negm O. et al. Contribution of the alkylquinolone quorum-sensing system to the interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with bronchial epithelial cells. Front Microbiol 2018;9–11. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03018
- Azam M.W., Khan A.U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. Drug Discov Today 2019;24(1):350–9. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.07.003
- Warrier A., Satyamoorthy K., Murali T.S. Quorum-sensing regulation of virulence factors in bacterial biofilm. Future Microbiol 2021;16:1003–21. DOI: 10.2217/fmb-2020-0301
- Liu C.Y., Xie W.G., Tian J.W., Li J. A comparative study on inflammatory factors and immune functions of lung cancer and pulmonary ground glass attenuation. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2017;21(18):4098–103.
- Abolfathi H., Sheikhpour M., Shahraeini S.S. et al. Studies in lung cancer cytokine proteomics: a review. Expert Rev Proteomics 2021;18(1):49–64. DOI: 10.1080/14789450.2021.1892491
- Rampioni G., Falcone M., Heeb S. et al. Unravelling the genome-wide contributions of specific 2-alkyl-4-quinolones and PqsE to quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Pathog 2016;12(11):e1006029. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006029
- Kim K., Kim Y.U., Koh B.H. et al. HHQ and PQS, two *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecules, down-regulate the innate immune responses through the nuclear factor-kappaB pathway. Immunology 2010;129:578–88. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03160.x
- Hansch G.M., Prior B., Brenner-Weiss G. et al. The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) stimulates chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils. Appl Biomater Funct Mater 2014;12:21–6. DOI: 10.5301/jabfm.5000204
- Lin J., Cheng J., Wang Y., Shen X. The pseudomonas quinolone signal (PQS): not just for quorum sensing anymore. Front Cell Infect Microbiol 2018;8:230. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00230
- Jing Y., Chen X., Li K. et al. Association of antibiotic treatment with immune-related adverse events in patients with cancer receiving immunotherapy. J Immunother Cancer 2022;10(1):e003779. DOI: 10.1136/jitc-2021-003779

Вклад авторов

А.В. Шестопалов: общее руководство исследованием, разработка научной концепции;
О.И. Кит: разработка научной концепции;
В.В. Давыдов: анализ результатов, написание текста статьи;
Я.М. Байзынова: статистическая обработка результатов, оформление иллюстративного материала;
И.А. Новикова: подбор материала для лабораторного исследования;
Е.Ю. Златник: анализ результатов, редактирование;
А.Б. Сагакянц: анализ результатов, статистическая обработка данных, редактирование;
С.А. Апполонова, Н.Е. Москалева: проведение исследования, сбор данных, анализ результатов;
С.А. Румянцев: анализ результатов.

Authors' contributions

A.V. Shestopalov: general guidance of the study, development of a scientific concept;
O.I. Kit: development of a scientific concept;
V.V. Davydov: analysis of results, article writing;
Ya.M. Baizyanova: statistical data processing, prepare illustration for article;
I.A. Novikova: selection of material for laboratory research;
E.Yu. Zlatnik: analysis of results, article editing;
A.B. Sagakyants: analysis of results, statistical data processing, article editing;
S.A. Appolonova, N.E. Moskaeva: research, data collection, analysis of results;
S.A. Rumyantsev: analysis of results.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.В. Шестопалов / A.V. Shestopalov: <https://orcid.org/0000-0002-1428-7706>
О.И. Кит / O.I. Kit: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>
В.В. Давыдов / V.V. Davydov: <https://orcid.org/0000-0002-3347-1832>
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.Б. Сагакянц / A.B. Sagakyants: <https://orcid.org/0000-0003-0874-5261>
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>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Финансирование. Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы по Госконтракту на выполнение научно-исследовательской работы по проекту «Количественное определение метаболитов триптофана, фенольных соединений в сыворотке крови и кале здоровых доноров и больных раком легкого методами высокоэффективной жидкостной хроматографии масс-спектрометрии и газовой хроматографии/масс-спектрометрии» (договор № 397 от 03.09.2020).

Funding. The study was carried out within the framework of research work under the State Contract for the implementation of research work under the project "Quantification of tryptophan metabolites and phenolic compounds in the blood serum and feces of healthy donors and patients with lung cancer by HPLC, mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry" (contract No. 397 of 03.09.2020).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен советом по биоэтике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России (протокол № 44 от 20.12.2019).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of National Medical Research Centre for Oncology (protocol No. 44 of 20.12.2019).

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

Статья поступила: 21.02.2023. **Принята к публикации:** 05.05.2023.

Article submitted: 21.02.2023. **Accepted for publication:** 05.05.2023.

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

1. Общие правила

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

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- название статьи,
- инициалы и фамилии всех авторов,
- ученые степени, звания, должности, место работы каждого из авторов, а также их ORCID (при наличии),
- полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа,
- адрес учреждения (учреждений) с указанием индекса.

Последняя страница должна содержать:

- Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
 - фамилия, имя, отчество полностью,
 - занимаемая должность,
 - ученая степень, ученое звание,
 - персональный международный идентификатор ORCID (подробнее: <http://orcid.org/>),
 - персональный идентификатор в РИНЦ (подробнее: http://elibrary.ru/projects/science_index/author_tutorial.asp),
 - контактный телефон,
 - рабочий адрес с указанием индекса,
 - адрес электронной почты.
- Скан подписей всех авторов статьи.

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

Шрифт – Times New Roman, кегль 14, межстрочный интервал 1,5. Все страницы должны быть пронумерованы. Текст статьи начинается со второй страницы.

4. Объем статей (без учета иллюстраций и списка литературы)

Оригинальная статья – не более 12 страниц (большой объем допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции).

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

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

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

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

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

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

– информированное согласие пациентов (для статей с авторскими исследованиями и описаниями клинических случаев),

– при наличии финансирования исследования – указать его источник (грант и т. д.),

– благодарности (раздел не является обязательным).

7. Иллюстративный материал

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

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

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

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

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

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

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

9. Список литературы

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

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

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

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

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

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

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

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

Общие положения:

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

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

Полная версия требований представлена на сайте журнала.