

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Роль ABC-транспортёров в патогенезе
и терапии онкологических заболеваний*

*Особенности CAR-T-терапии
в комбинации с химио- и лучевой
терапией при лечении солидных опухолей*

*Динамика экспрессии микроРНК
внеклеточных везикул мочи после
радикальной простатэктомии*

*Роль циркулирующих нейтрофилов
в прогрессировании рака почки*

*Особенности транскриптома моноцитов
периферической крови в динамике
неoadъювантной химиотерапии больных
раком молочной железы*



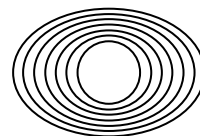
Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук.

Журнал включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор, зарегистрирован в базе данных Scopus, в CrossRef, статьи индексируются с помощью идентификатора цифрового объекта (DOI).

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



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

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

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

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

Цель издания – дать читателям представление об актуальных направлениях современной молекулярной онкологии, ознакомить с наиболее значимыми работами отечественных и зарубежных исследователей в этой области, создать общую площадку, на которой специалисты разных областей, включая онкологов, молекулярных биологов, генетиков, биохимиков, вирусологов, химиотерапевтов, смогут поделиться результатами своих научных исследований.

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

1 ТОМ 11
'24

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

Издатель:
ООО «ИД «АБВ-пресс»
115478 Москва, Каширское шоссе, 24,
стр. 15, www.abvpress.ru

Адрес редакции:
115478 Москва, Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза,
3-й этаж. Тел.: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@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,**
Е.В. Степанова

Служба подписки и распространения
И.В. Шураева, 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.
2024. Том 11. № 1. 1–124.
© Оформление, верстка.
ООО «ИД «АБВ-пресс», 2024
Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562.
Отпечатано в типографии
«Лайдер принт».
105082 Москва, Переведеновский
пер., 13, стр. 16.
Тираж 1000 экз. Бесплатно.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Красильников Михаил Александрович, д.б.н., профессор, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза (НИИ канцерогенеза) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующий отделом экспериментальной биологии опухолей (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

Карамышева Аида Фуадовна, д.б.н., главный научный консультант лаборатории генетики опухолевых клеток отдела молекулярной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

Ковалева Ольга Владимировна, д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (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, главный научный консультант лаборатории онкогеномики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

Сергеева Наталья Сергеевна, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории прогноза эффективности консервативного лечения Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена — филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., директор Департамента комплексных программ и проектов Минобрнауки России (Москва, Россия)

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

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

Щербakov Александр Михайлович, заведующий 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, главный научный консультант лаборатории механизмов химического канцерогенеза отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

Зарилзе Давид Георгиевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом эпидемиологии и профилактики опухолей НИИ клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова 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., главный научный консультант отдела экспериментальной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

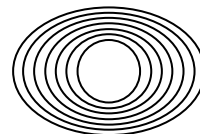
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

The journal is included in the Scientific Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor; it is registered in the Scopus data base, CrossRef, its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

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

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

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



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

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

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

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

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

FOUNDED IN 2014

1 VOL. 11
'24

Founders:

N.N. Blokhin National Medical
Research Center of Oncology,
Ministry of Health of Russia;
PH "ABV-press"

Publisher

PH "ABV-Press" 24 Kashirskoe
Shosse, Bld. 15, Moscow 115478

Editorial Office: Research Institute
of Carcinogenesis, Floor 3, 24
Kashirs-koye Shosse, Bld. 15,
Moscow 115478.
Tel.: +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, E.V. Stepanova

Subscription & Distribution Service
I.V. Shurgaeva, base@abvpress.ru

*The journal was registered at the Federal
Service for Surveillance of Communications,
Information Technologies, and Mass Media
(FTH No. ФЦ77-57560 dated 08 April 2014).*

**If materials are reprinted in whole
or in part, reference must necessarily
be made to the journal "Uspekhi mole-
kulyarnoy 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.
2024. Vol. 11 No. 1. 1–124.

© Design, layout PH "ABV-Press",
2024
Pressa Rossii catalogue index: 93562.

Printed at the Leader Print Ltd
Bld. 16, 13 Perevedenovsky lane,
Moscow 105082.
1000 copies.
Free distribution.

EDITOR-IN-CHIEF

Krasil'nikov, Mikhail A., DSc, PhD, Professor, 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 University 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, Chief Scientific Consultant of the Laboratory of the Genetics of Tumor Cells of the Department of Molecular 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)

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)

Kovaleva, Olga V., DSc, Sr. Researcher of the Laboratory of Regulation of Cellular 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)

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

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

Mazurenko, Natalia N., DSc, PhD, Professor, Chief Scientific Consultant 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., Head of the Laboratory of Oncoproteomics of the Department of Experimental Biology of Tumors of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

Belitsky, Gennady A., MD, PhD, Professor, Chief Scientific Consultant of the Laboratory of Chemical Carcinogenesis Mechanisms 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)

Gurtsevitch, Vladimir E., MD, PhD, Professor, Chief Scientific Consultant 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 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, 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, Chief Scientific Consultant 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)

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 называть «... (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.

Для рассмотрения рукописи редакции требуется письменное согласие каждого автора на обработку и распространение персональных данных в печатном и цифровом виде. Скан подписанного согласия необходимо загрузить как дополнительный файл в разделе «описание» при подаче статьи. Печатный подписанный вариант согласия необходимо отправить на адрес редакции.

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

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

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, полимерная 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.

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

С.В. Бойчук, Т.В. Ивойлова

Роль ABC-транспортёров в поддержании гомеостаза, патогенезе и терапии онкологических заболеваний 8

В.А. Богданова, Л.В. Спирина, С.Ю. Чижевская, И.В. Ковалева, К.В. Никульников

Современные представления о клинко-эпидемических и молекулярно-генетических особенностях меланомы кожи и слизистых 22

М.Р. Халиулин, Р.Н. Сафин, М.А. Кунст, Э.Р. Булатов

Применение Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR-T) в комбинации с химио- и лучевой терапией для лечения солидных опухолей 31

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

К.В. Никульников, В.А. Богданова, Л.В. Спирина, С.Ю. Чижевская, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзонов, В.И. Чернов

Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов, компонентов сигнального пути АКТ/mTOR, рецепторов и лигандов программируемой клеточной гибели ткани меланомы 46

Е.В. Шутко, О.Е. Брызгунова, И.А. Остальцев, С.В. Пак, С.Э. Красильников, П.П. Лактионов, М.Ю. Коношенко

Динамика экспрессии микроРНК внеклеточных везикул мочи больных раком предстательной железы после радикальной простатэктомии 55

М.Р. Патышева, М.Н. Стахеева, Е.С. Григорьева, П.С. Ямщиков, И.В. Ларионова, А.А. Будницкая, Н.А. Тарабановская, Н.В. Чердынцева, Ю.Г. Кжышковска

Фенотипические и транскриптомные особенности моноцитов периферической крови в динамике неoadъювантной химиотерапии больных раком молочной железы 79

Н.А. Персиянцева, С.Ю. Вихрова, М.С. Короткова, Д.Б. Казанский, В.В. Татарский, М.А. Замкова

Снижение способности клеток НСТ116 к выходу из стадии индуцированного терапией старения при увеличении длительности воздействия доксорубицином 90

И.Р. Мягдиева, Т.В. Абакумова, Д.Р. Долгова, О.Ю. Горшков, Т.П. Генинг

Роль циркулирующих нейтрофилов в прогрессировании рака почки 99

А.А. Королева, С.С. Герасимов, Л.Н. Любченко

Генетические факторы тромбоза *FII G20210A, FVG1691A (Arg506Gln)* у больных со злокачественными опухолями торакоабдоминальной локализации 105

G.O. Skryabin, A.A. Beliaeva, A.D. Enikeev, D.V. Bagrov, A.M. Keremet, A.V. Komelkov, D.S. Elkin, D.M. Sylantieva, E.M. Tchekina

Analysis of miRNAs miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p, -135b-5p, -451a, -495-3p and -136-5p in parental ovarian cancer cells and secreted extracellular vesicles 113

REVIEW

*S.V. Boichuk, T.V. Ivoilova***The role of ABC-transporters in homeostasis, cancer pathogenesis and therapy 8***V.A. Bogdanova, L.V. Spirina, S.Yu. Chizhevskaya, I.V. Kovaleva, K.V. Nikulnikov***Contemporary views on the clinical, epidemiological and molecular genetic characteristics of melanoma of the skin and mucous membranes 22***M.R. Khaliulin, R.N. Safin, M.A. Kunst, E.R. Bulatov***The use of T-cells with chimeric antigen receptor (CAR-T) in combination with chemotherapy and radiotherapy for the treatment of solid tumors 31**

EXPERIMENTAL REPORT

*K.V. Nikulnikov, V.A. Bogdanova, L.V. Spirina, S.Yu. Chizhevskaya, I.V. Kondakova, E.L. Choyazonov, V.I. Chernov***Transcriptional, growth factors, components of the AKT/mTOR signaling pathway, receptors and ligands of programmed cell death expression in melanoma 46***E.V. Shutko, O.E. Bryzgunova, I.A. Ostal'cev, S.V. Pak, S.E. Krasi'nikov, P.P. Laktionov, M.Yu. Konoshenko***Dynamics of miRNA expression in urine extracellular vesicles of prostate cancer patients after radical prostatectomy. 55***M.R. Patysheva, M.N. Stakheyeva, E.S. Grigoryeva, P.S. Iamshchikov, I.V. Larionova, A.A. Budnickya, N.A. Tarabanovskaya, N.V. Cherdyntseva, J.G. Kzhyshkowska***Immune-phenotyping and transcriptomic profiling of blood monocytes from patients with breast cancer under neoadjuvant chemotherapy 79***N.A. Persiyantseva, S.Yu. Vikhrova, M.S. Korotkova, D.B. Kazansky, V.V. Tatarsky, M.A. Zamkova***Decreasing the ability of HCT116 cells to escape from therapy induced senescence by increasing the duration of doxorubicin treatment 90***I.R. Magdieva, T.V. Abakumova, D.R. Dolgova, O.Y. Gorshkov, T.P. Gening***The role of circulating neutrophils in the progression of kidney cancer 99***A.A. Korolyova, S.S. Gerasimov, L.N. Lyubchenko***Genetic factors of thrombosis *FII G20210A, FVG1691A (Arg506Gln)* in patients with thoracoabdominal malignant tumors 105***G.O. Skryabin, A.A. Beliaeva, A.D. Enikeev, D.V. Bagrov, A.M. Keremet, A.V. Komelkov, D.S. Elkin, D.M. Sylantieva, E.M. Tchevkina***Analysis of miRNAs miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p, -135b-5p, -451a, -495-3p and -136-5p in parental ovarian cancer cells and secreted extracellular vesicles. 113**

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-8-21>

Роль ABC-транспортеров в поддержании гомеостаза, патогенезе и терапии онкологических заболеваний

С.В. Бойчук¹⁻³, Т.В. Ивойлова¹¹ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 420012 Казань, ул. Бултерева, 49;²Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18;³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1**Контакты:** Сергей Васильевич Бойчук boichuksergei@mail.ru

ABC-транспортеры (ATP binding cassette (ABC) transporters), АТФ-зависимые транспортеры – белки, играющие двойную роль в переносе веществ через мембрану. С одной стороны, они транспортируют питательные вещества и другие молекулы внутрь клетки, поставляя необходимые нутриенты, с другой, экскретируют некоторые эндогенные и экзогенные субстраты из клетки, поддерживая их гомеостаз в организме и предотвращая агрессивные воздействия внешней среды. ABC-транспортеры, исходя из своих функций, играют большую роль в патогенезе различных метаболических нарушений. Кроме того, накоплено много данных об участии этих белков в онкогенезе за счет их вклада в инициацию, прогрессию, инвазию и метастазирование опухолей, а также в развитие фенотипа множественной лекарственной устойчивости. В настоящее время данные белки являются привлекательными терапевтическими мишенями, воздействие на которые способно существенным образом повысить эффективность противоопухолевой терапии и улучшить прогноз пациентов с онкологическими заболеваниями, в том числе рецидивирующих, метастатических и неоперабельных форм. В обзоре представлена информация о лекарственных препаратах как являющихся субстратами для ABC-транспортеров, так и оказывающих влияние на их функциональную активность, а также результаты клинических испытаний по изучению эффективности использования этих ингибиторов в практической онкологии.

Ключевые слова: ABC-транспортеры, множественная лекарственная устойчивость, химиотерапия, таргетная терапия**Для цитирования:** Бойчук С.В., Ивойлова Т.В. Роль ABC-транспортеров в поддержании гомеостаза, патогенезе и терапии онкологических заболеваний. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):8–21. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-8-21>

The role of ABC-transporters in homeostasis, cancer pathogenesis and therapy

S.V. Boichuk¹⁻³, T.V. Ivoilova¹¹Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 49 Butlerova St., Kazan 420012, Russia;²Research Laboratory “Biomarker”, Institute of Fundamental Medicine and Biology of the Kazan Federal University; 18 Kremlevskaya St., Kazan 420008, Russia;³Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; Bld. 1, 2/1 Barricadnaya St., Moscow 125993, Russia**Contacts:** Sergey Vasilyevich Boychuk boichuksergei@mail.ru

ABC transporters (ATP Binding Cassette (ABC) transporters) are proteins, which play a dual role in the substances transport across the membrane. On the one hand, they transport nutrients and other molecules inside the cell to supply the necessary nutrients, on the other hand, these proteins excrete some endogenous and exogenous substrates from the cell to maintain their homeostasis in the body and prevent from effects of aggressive environment. ABC transporters play a role in the pathogenesis of various metabolic disorders. In addition, a large amount of evidence has been accumulated about the participation of these proteins in oncogenesis because of their involvement into initiation, progression, invasion and metastasis of tumors, as well as development of multidrug resistance phenotype. Currently, these proteins are attractive therapeutic targets, influence on which can significantly increase the effectiveness of anticancer therapy and improve the prognosis of patients with oncological diseases, including recurrent, metastatic and inoperable forms.

The review provides information on drugs that affect the functional activity of ABC transporters and the mechanisms of their action, and also presents the results of clinical trials of these inhibitors.

Keywords: ABC-transporters, multidrug resistance, chemoresistance, target therapy

For citation: Boichuk S.V., Ivoilova T.V. The role of ABC-transporters in homeostasis, cancer pathogenesis and therapy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(1):8–21. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-8-21>

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в последнее время в диагностике и терапии онкологических заболеваний (разработка и внедрение эффективных методов их профилактики, а также ранней диагностики и терапии), они по-прежнему остаются одной из самых распространенных причин смерти в России.

К наиболее серьезным проблемам в области химио- и таргетной терапии пациентов с онкологическими заболеваниями относится развитие множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) злокачественных опухолей, обуславливающей невосприимчивость опухолевых клеток к широкому спектру препаратов, имеющих различные структуры и, следовательно, механизмы действия. Устойчивость новообразований к препаратам может быть первичной (т. е. формироваться в опухоли до начала проведения терапии) или вторичной (являться результатом воздействия на опухолевые клетки химио-, радио- и таргетных препаратов). В настоящее время известны несколько молекулярных механизмов, играющих роль в развитии фенотипа МЛУ, в числе которых активация процессов репарации ДНК [1–3], стимуляция системы внутриклеточной детоксикации [1, 3], развитие эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [1, 4], усиление АТФ-зависимого (АТФ — аденозинтрифосфат) обратного транспорта лекарственных средств из клетки [1, 2, 5–7] и др.

Последний из вышеназванных молекулярных механизмов реализуется за счет активации транспортных белков — ABC-транспортёров (ATP binding cassette (ABC) transporters), или АТФ-зависимых транспортеров. Эти белки также участвуют в предотвращении агрессивных воздействий внешней среды на клетку, поэтому их экспрессия и функциональная активность наиболее выражены в тканях, потенциально сильнее подверженных этим воздействиям, а именно в клетках эпителия дыхательного, желудочно-кишечного тракта, печени и почек [8, 9]. В настоящее время фенотип МЛУ ассоциируют с активацией как минимум 15 ABC-транспортёров, среди которых наиболее изучены белки ABCB1/MDR1 (multidrug resistance 1 — белок МЛУ 1), ABCC1/MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1 — белок, ассоциированный с МЛУ 1) и ABCG2/BCRP1 (breast cancer resistance protein 1 — белок устойчивости рака молочной железы) [1, 2, 6, 7].

КЛАССИФИКАЦИЯ, ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ АВС-ТРАНСПОРТЕРОВ

Классификация. Согласно классификации, которая учитывает нуклеотидную последовательность, структурную схожесть и порядок доменов, транспортеры подразделяют на 7 подсемейств: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF и ABCG. Выделяют также 8-е подсемейство — ABCN, однако его представители у млекопитающих не обнаружены [8].

Среди АВС-транспортёров можно выделить экспортеры, осуществляющие перенос токсинов, лекарственных препаратов и липидов из клетки [6, 8, 9, 12], и импортеры, переносящие питательные вещества и другие молекулы во внутриклеточное пространство [6, 8, 9, 10]. Экспортеры, субстратом которых обычно являются липофильные молекулы, встречаются как у прокариот, так и у эукариот. В человеческом организме эти белки ответственны за экспорт липидов, жирных кислот и холестерина [11]. АВС-транспортёры, осуществляющие импорт питательных веществ и других молекул, обнаруживаются преимущественно у прокариот, где опосредуют усвоение необходимых нутриентов, таких как аминокислоты, сахара и незаменимые металлы, которые сильно различаются по размеру и химической природе [11]. Импортеры дополнительно могут быть разделены на 2 класса (I и II) в зависимости от особенностей структуры и транспортного механизма. Кроме того, дополнительно выделяют импортеры класса III, включающие в себя родственное семейство транспортеров так называемых факторов энергетической связи (energy-coupling factor (ECF) transporters), участвующих в переносе витаминов, являющихся ко-факторами для многих энергетических внутриклеточных процессов [12].

Физиологические функции. 13 представителей подсемейства ABCA функционируют преимущественно как транспортеры стероидов, липидов и липидоподобных соединений и непосредственно взаимодействуют с аполипопротеинами в процессе биогенеза липопротеинов [9, 13, 14]. Они остаются сравнительно малоизученными, несмотря на их физиологическую значимость для гомеостаза липидов и холестерина и связь с такими заболеваниями, как болезни Танжера (дисфункция ABCA1) [9, 13, 14], Альцгеймера (дисфункция ABCA2) [9, 15, 16] и ихтиоз Арлекина (мутации ABCA12) [9, 17, 18].

Подсемейство ABCB включает 10 транспортеров, которые имеют широкий спектр субстратов. В основном

представители данного подсемейства являются экспортерами лекарственных препаратов, в том числе противоопухолевых, способствуя развитию в опухоли фенотипа МЛУ [9]. Кроме того, нарушения экспрессии генов семейства *ABCB* могут быть связаны с прогрессирующим семейным внутрипеченочным холестазом [19] и другими тяжелыми заболеваниями печени [20], поскольку они играют большую роль в процессе детоксикации желчных кислот. Мутации *ABCB1* характерны для универсального наследственного дисхроматоza [21] и гемолитической болезни плода и новорожденного [22], что связано с участием продукта экспрессии данного гена в биосинтезе гема. При изменении экспрессии гена *ABCB7*, ответственного за обмен железа в организме, может развиваться X-сцепленная сидеробластная анемия [23, 24].

Подсемейство *ABCC* состоит из 12 генов, кодирующих белки, большинство из которых ассоциировано с фенотипом МЛУ. Например, транспортер *ABCC2* участвует в транспорте конъюгированных лекарственных средств и токсинов в желчь и мочу [25], а мутации в этом гене ассоциированы с синдромом Дубина–Джонсона — заболеванием печени, характеризующимся гипербилирубинемией [9]. Дисфункциональные мутантные продукты гена *ABCC8* связаны с гипогликемией и гиперинсулизмом [9], в то время как нарушения в *ABCC9* — с кардиомиопатией [26] и другими заболеваниями, связанными с пороками сердца [27, 28].

Белки *ABCD1*, *ABCD2* и *ABCD3* локализованы исключительно в пероксисомах и участвуют в импорте различных длинноцепочечных жирных кислот [9]. Дисфункция *ABCD1*, импортирующего жирные кислоты с очень длинной цепью, приводит к тяжелому неврологическому состоянию — X-сцепленной адренолейкодистрофии [29, 30]. *ABCD2* выполняет аналогичную с *ABCD1* функцию, однако не связан с развитием указанной выше патологии. *ABCD3* является наиболее функционально отличным из указанных белков, его дисфункция ассоциирована с дефектами синтеза желчных кислот [31]. *ABCD4* первоначально относили к пероксисомальным ABC-транспортерам, однако в настоящее время предполагается, что он локализован в лизосомах и экспортирует из них кобаламин. Мутации в *ABCD4* вызывают дефицит витамина B₁₂ [32, 33].

Подсемейство *ABCG* включает 5 генов, кодирующих транспортеры, которые либо участвуют в гомеостазе липидов, либо опосредуют МЛУ. *ABCG1* и *ABCG4* транспортирует холестерин и сфингомиелин, *ABCG2* — множество лекарственных средств, ураты. Мутации в генах *ABCG5* и *ABCG8* связаны со сидостеролемией — редким рецессивным заболеванием, характеризующимся высоким уровнем стеролов в плазме крови [34].

Физиологическая роль вышеизложенных представителей ABC-транспортеров и их клиническое значение в патогенезе злокачественных новообразований и других заболеваний представлены в табл. 1.

Таблица 1. Физиологические функции и клиническое значение изменений экспрессии различных представителей семейства ABC-транспортеров
Table 1. Physiological functions and clinical significance of changes in expression of ABC transporter family proteins

Транспортер Transporter	Физиологические функции Physiological functions	Клиническое значение Clinical significance	Источник Source
Подсемейство ABCA ABCA subfamily			
ABCA1	Катализирует транслокацию специфических фосфолипидов (преимущественно фосфатидилхолина) из цитоплазмы во внеклеточное пространство Catalyzes translocation of specific phospholipids (primarily phosphatidylcholine) from the cytoplasm to the extracellular space	Снижение экспрессии (характерно для колоректального рака, болезни Танжера) Decreased expression (characteristic of colorectal cancer, Tangier disease)	[13, 14, 35]
ABCA3	Катализирует транспорт фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфоглицерина) из цитоплазмы, участвует в гомеостазе легочного сурфактанта Catalyzes translocation of phospholipids (phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol) from the cytoplasm, participates in pulmonary surfactant homeostasis	Повышение экспрессии ассоциировано с развитием рака поджелудочной железы. Снижение экспрессии ассоциировано с болезнью Альцгеймера, колоректальным раком, нарушениями метаболизма и биохимического состава легочного сурфактанта Increased expression is associated with pancreatic cancer. Decreased expression is associated with Alzheimer's disease, colorectal cancer, abnormal metabolism and biochemical composition of pulmonary surfactant	[15, 16, 35, 36]

Продолжение табл. 1
 Continuation of table 1

Транспортер Transporter	Физиологические функции Physiological functions	Клиническое значение Clinical significance	Источник Source
ABCA4	Катализирует транспорт конъюгатов ретиналь-фосфатидилэтаноламина из просвета в мембранные диски наружного сегмента фоторецептора, где предотвращает образование токсичных веществ Catalyzes transport of retinylidene-phosphatidylethanolamine from the lumen into the membrane disks of the external photoreceptor segment where it prevents formation of toxic compounds	Гиперэкспрессия наблюдается при немелкоклеточном раке легкого. Снижение экспрессии характерно для колоректального рака, болезни Штаргардта Hyperexpression is observed in non-small cell lung cancer. Decreased expression is characteristic of colorectal cancer, Stargardt disease	[35, 37, 38]
ABCA12	Участвует в транспорте липидов из кератиноцитов и, как следствие, в поддержании барьерной функции кожи; играет большую роль в регуляции стимулированной глюкозой секреции инсулина β-клетками Participates in lipid transport from keratinocytes and, as a consequence, in maintaining barrier function of the skin; plays a large role in regulation of glucose-stimulated insulin secretion by β cells	Повышение экспрессии ассоциировано с развитием колоректального рака, рака поджелудочной железы. Мутации, приводящие к дисфункции, ассоциированы с ихтиозом Арлекина Increased expression is associated with colorectal cancer, pancreatic cancer. Mutations leading to its dysfunction are associated with Harlequin ichthyosis	[17, 18, 35, 37, 39]
ABCA13	Участвует в транспорте холестерина Participates in cholesterol transport	Повышение экспрессии ассоциировано с развитием колоректального рака. Снижение экспрессии характерно для рака простаты Increased expression is associated with colorectal cancer. Decreased expression is characteristic of prostatic cancer	[35, 40]
Подсемейство ABCB ABCB subfamily			
ABCB1	Катализирует транспорт фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, β-D-глюкозилцерамида и сфингомиелинов) из цитоплазмы Catalyzes transport of phospholipids (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, β-D-glucosylceramide and sphingomyelins) from the cytoplasm	Повышение экспрессии ассоциировано с развитием колоректального рака, рака яичника, молочной железы, печени. Снижение экспрессии характерно для рака простаты Increased expression is associated with colorectal, ovarian, breast, liver cancers. Decreased expression is characteristic of prostatic cancer	[35, 40–44]
ABCB6	Катализирует транспорт порфиринов из цитоплазмы во внеклеточное пространство Catalyzes transport of porphyrins from the cytoplasm to the extracellular space	Повышение экспрессии ассоциировано с развитием колоректального рака. Снижение экспрессии наблюдается при наследственном универсальном дисхроматозе Increased expression is associated with colorectal cancer. Decreased expression is observed in dyschromatosis universalis hereditaria	[35, 37]
Подсемейство ABCC ABCC subfamily			
ABCC1	Опосредует транспорт глутатиона и глутатионовых конъюгатов, лейкотриена C4, эстрадиол-17-β-о-глюкуронида, метотрексата, противовирусных препаратов и других ксенобиотиков Mediates transport of glutathione and glutathione conjugates, leukotriene C4, estradiol-17-β-o-glucuronide, methotrexate, antiviral drugs, and other xenobiotics	Повышение экспрессии ассоциировано с развитием колоректального рака, глиомы, немелкоклеточного рака легкого, хронического лимфолейкоза, рака молочной железы, яичника, поджелудочной железы Increased expression is associated with colorectal cancer, glioma, non-small cell lung cancer, chronic lymphocytic leukemia, breast, ovarian, pancreatic cancers	[35, 45, 46]
ABCC2	Транспортирует широкий спектр конъюгированных органических анионов, опосредует гепатобилиарную экскрецию моно- и бис-глюкуронидированных молекул билирубина Transports a wide spectrum of conjugated organic anions, mediates hepatobiliary excretion of mono- and bis-glucuronidated bilirubin molecules	Повышение экспрессии ассоциировано с развитием колоректального рака, немелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы. Снижение экспрессии наблюдается при синдроме Дубина–Джонсона Increased expression is associated with development of colorectal cancer, non-small cell lung cancer, pancreatic cancer. Decreased expression is observed in Dubin-Johnson syndrome	[12, 35–37, 41, 47–49]

Окончание табл. 1
End of table 1

Транспортер Transporter	Физиологические функции Physiological functions	Клиническое значение Clinical significance	Источник Source
ABCC7	Играет большую роль в транспорте ионов хлора и гидрокарбонат-ионов и участвует в водно-электролитном обмене Plays a large role in transport of chloride ions and hydrocarbon ions and participates in water and electrolyte exchange	Гиперэкспрессия характерна для немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, пониженная экспрессия — для колоректального рака, рака молочной железы Hyperexpression is characteristic of non-small cell lung cancer, ovarian cancer; decreased expression is characteristic of colorectal cancer, breast cancer	[35, 50–53]
Подсемейство ABCG ABCG subfamily			
ABCG2	Участвует в гомеостазе порфиринов, клеточном экспорте гема, почечной и внепочечной экскрециях уратов, опосредует отток сфингозина из клеток Participates in porphyrin homeostasis, heme cellular export, renal and extrarenal secretion of urates, mediates sphingosine outflow from the cells	Повышение экспрессии наблюдается при раке молочной железы, яичника. Снижение экспрессии характерно для колоректального рака, гиперурикемии Increased expression is observed in breast, ovarian cancers. Decreased expression is characteristic of colorectal cancer, hyperuricemia	[35, 36, 42, 47, 54]

СТРУКТУРА АВС-ТРАНСПОРТЕРОВ

Большинство АВС-транспортеров являются полными транспортерами, имеющими характерную четырехдоменную структуру: 2 трансмембранных домена (TMD1, TMD2) и 2 нуклеотид-связывающих домена (NBD1, NBD2) (рис. 1) [9, 12, 55]. Неполные транспортеры имеют в структуре по одному TMD и NBD, которые собираются в гомодимеры или гетеродимеры и обычно локализуются во внутриклеточных мембранах (лизосомальных, митохондриальных, эндоплазматического ретикулума) [9, 56].

Домены NBD ответственны за связывание и гидролиз АТФ, стимулируя процесс переноса субстрата. Они располагаются в цитоплазме и имеют консервативную структуру у различных представителей, что

свидетельствует об общности механизмов использования АТФ в качестве источника энергии для транспорта веществ через мембрану. TMD образуют сайты связывания лиганда. В отличие от NBD они гетерогенны, что обеспечивает их специфичность к множеству субстратов [9, 12, 55].

ПРИНЦИП РАБОТЫ АВС-ТРАНСПОРТЕРОВ

В связи с тем что процесс переноса субстрата АВС-транспортерами полностью не изучен, выдвигаются гипотезы о трех моделях их работы [38]. С учетом разнообразия этих белков можно предположить, что единого механизма транспортного цикла не существует. Однако понимание данного процесса при конкретных заболеваниях, в патогенезе которых играют роль АВС-

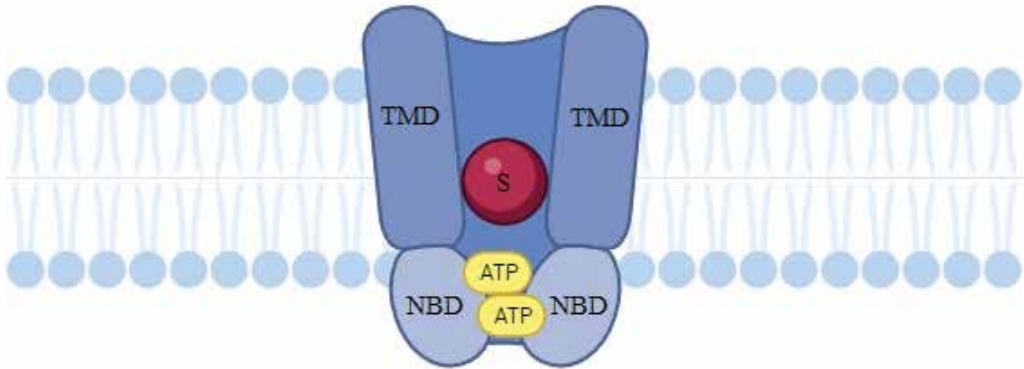


Рис. 1. Структура полного АВС-транспортера. TMD — трансмембранный домен; S — субстрат; NBD — нуклеотид-связывающий домен; АТФ — аденозинтрифосфат
Fig. 1. Structure of a whole ABC transporter. TMD — transmembrane domain; S — substrate; NBD — nucleotide-binding domain; ATP — adenosine triphosphate

транспортёры, безусловно, имеет большое значение для разработки и изучения соединений, оказывающих терапевтический эффект.

Модель «альтернативного доступа» применима для большинства транспортёров, независимо от их структуры [37, 57, 58]. Согласно этой модели они переключаются между двумя конформациями с высоким и низким сродством к субстрату, в которых сайт связывания субстрата TMD обращен либо внутрь клетки, либо во внеклеточное пространство. Для импортёров обращенная наружу конформация обладает более высокой аффинностью к субстрату, поскольку транспорт веществ направлен из внеклеточной жидкости в цитоплазму. У экспортёров, напротив, сродство выше у конформации, обращенной внутрь клетки.

В основе модели «переключения АТФ» лежит последовательное насыщение каждого мономера NBD одной молекулой АТФ с последующим высвобождением одной молекулы фосфорной кислоты и аденозиндифосфата (АДФ), что возвращает белок в исходное свободное состояние [37, 59, 60].

В модели «постоянного контакта» подразумевается, что для каждого NBD существуют закрытое и открытое состояния, последнее из которых может характеризоваться высоким или низким сродством к АТФ в зависимости от состояния второго домена. NBD функционируют противозависимо и остаются в контакте на протяжении всего цикла, изменение конформации при этом происходит за счет перестроек внутри субъединиц NBD. Каталитический цикл согласно этой модели можно описать следующим образом: один сайт, связанный с АТФ, закрывается, а другой находится в свободном состоянии с низкой аффинностью. Происходит гидролиз АТФ до АДФ и фосфорной кислоты, что индуцирует переключение на высокое сродство к АТФ в противоположном домене; происходит присоединение АТФ к пустому NBD, а АДФ и фосфорная кислота высвобождаются, и мономер переходит в свободное низкоаффинное состояние; далее цикл повторяется для противоположного активного центра [37, 59, 61].

Для большинства АВС-транспортёров в транспортном цикле можно выделить следующие общие этапы. Он начинается со связывания субстрата (для экспортёров) или субстрат-связывающего белка (для импортёров) с соответствующим сайтом TMD доменов, обращенного внутрь клетки или из нее. Затем NBDs подвергаются конформационным изменениям, обеспечивая связывание двух молекул АТФ и образование закрытого димера. TMDs открываются, отсоединяя субстрат и осуществляя, таким образом, его перенос через мембрану. Диссоциация димера NBD запускается гидролизом АТФ, что позволяет белку вернуться в исходное состояние [12].

РОЛЬ АВС-ТРАНСПОРТЕРОВ В ОНКОГЕНЕЗЕ

На сегодняшний день активно изучается не только влияние АВС-транспортёров на развитие МЛУ,

но и их потенциальная роль в инициации, прогрессии и метастазировании опухолей.

Существует мнение о том, что снижение уровня экспрессии АВС-транспортёров может угнетать процессы инициации и прогрессии, препятствуя трансформации нормальной клетки в опухолевую и возникновению первичной опухоли. Например, нарушение экспрессии белка Р-гр (ABCB1/MDR1) в мышинной модели *Apc^{Min/+}* коррелирует с уменьшением числа кишечных полипов и частоты встречаемости колоректального рака [62]. Также показано, что ингибирование *ABCC1* препятствует развитию нейробластомы у трансгенных мышей *hNMYC*, а высокая экспрессия генов *ABCC1* и *ABCC4* при низком уровне экспрессии *ABCC3* ассоциирована с неблагоприятным прогнозом для пациентов с той же патологией, не связанным со способностью этих белков выводить противоопухолевые препараты из клеток [63].

Изменение уровня экспрессии АВС-транспортёров может быть также связано с такими характеристиками опухоли, как прогрессия и дифференцировка. Например, при раке молочной железы уровень экспрессии белка *ABCC1* коррелирует с размером опухоли и наличием метастазов. Также значительно чаще повышенная экспрессия *ABCC1*, *ABCC11* и *ABCG2* наблюдается при более агрессивных подтипах этой опухоли [64]. Кроме того, уровень экспрессии *ABCC11* коррелирует с худшими показателями безрецидивной выживаемости, а *ABCG2* — с более тяжелой клинической стадией заболевания и наличием метастазов в лимфатических узлах [65, 66]. Также имеются данные, отражающие взаимосвязь повышенного уровня экспрессии Р-гр с неблагоприятным исходом данного заболевания [67, 68]. Гиперэкспрессия *ABCC1* находится в обратной зависимости от степени дифференцировки и инвазивности, а также размеров гепатоцеллюлярной карциномы [69]. Аналогичная корреляция выявлена для других белков: повышение уровня экспрессии *ABCC10* было менее значительным при гепатоцеллюлярной карциноме с более высокой степенью дифференцировки по сравнению с низкодифференцированной опухолью, а высокие уровни экспрессии *ABCB6* и *ABCC2* наблюдались у пациентов с размером опухоли <3 см [69].

Эпителиально-мезенхимальный переход также способствует прогрессированию опухоли за счет инвазии, метастазирования и развития химиорезистентности. Индукторами этого процесса могут служить гипоксия, цитокины и факторы роста, секретируемые микроокружением опухоли, а также проводимая химиотерапия. Гипоксия воздействует на сигнальный путь транскрипционного ядерного фактора каппа В (NF-κB), способствуя активации и транслокации NF-κB в ядро, что имеет решающее значение не только для индукции и поддержания ЭМП, но и для регуляции экспрессии *ABCB1* [70]. Кроме того, имеются данные о взаимосвязи ЭМП с функциональной активностью АВС-транспортёров. В частности, показано, что

трансформирующий фактор роста β (TGF- β), являющийся одним из самых распространенных индукторов ЭМП, способен активировать экспрессию ABC-транспортёров. Это может способствовать аутокринной или паракринной регуляции опухоли и развитию фенотипа МЛУ [71]. В свою очередь, индукция ЭМП зачастую приводит к повышению уровня транскрипции *ABCC3*, также связанного с фенотипом МЛУ [71].

Влияние ABC-транспортёров на инвазивные характеристики опухолевых клеток и их способность к миграции было показано в отношении *ABCA1*, *ABCB1*, *ABCB5*, *ABCE1* и *ABCG2*. Например, подавление экспрессии гена *ABCA1* ингибирует пролиферацию и миграцию клеток в группе клеточных линий рака яичника человека. Это позволяет предположить, что выявление *ABCA1* характеризует злокачественный фенотип клеток этой опухоли [69]. Также показано, что гиперэкспрессия *ABCE1* повышает жизнеспособность, инвазивную и метастатическую способность клеток аденокарциномы легкого и снижает экспрессию p27 без существенного влияния на клеточный цикл [72]. В исследовании, проведенном на больных с диссеминированным раком желудка IV стадии с канцероматозом брюшины, выявлена разница в экспрессии некоторых ABC-транспортёров: гиперэкспрессия *ABCG2* характерна для метастазов в лимфатических узлах в отличие от первичной опухоли и канцероматоза, а повышенная экспрессия *ABCC1* — для канцероматоза [73].

ABC-транспортёры играют ключевую роль в развитии МЛУ опухоли, поскольку выводят лекарственные препараты из клетки (рис. 2), снижая их внутриклеточ-

ную концентрацию, что отрицательно сказывается на эффективности проводимой противоопухолевой терапии. Исследование, в котором участвовали пациенты с раком молочной железы ПА–ПВ стадии, показало, что гиперэкспрессия *ABCB1* и *ABCB4* после проведенной химиотерапии связана с низкими показателями безметастатической выживаемости [74]. Очевидно, что высокая экспрессия в опухоли *ABCB1*, являющегося полиспецифическим экспортером большого количества лекарственных веществ и играющего значительную роль в клеточной детоксикации, обуславливает развитие в опухолевых клетках МЛУ на фоне проводимой химиотерапии [75]. Среди субстратов *ABCB1* следует выделить винкалкалоиды, антрациклины, эпиподофиллотоксины, таксаны, а также некоторые ингибиторы тирозинкиназ (иматиниб, дазатиниб) [76]. *ABCC1* также имеет большое значение в развитии МЛУ в опухолевых клетках [9]. Показано, что его субстратами являются преимущественно антрациклины, винкалкалоиды, камптотексин, метотрексат и митоксантрон [76]. *ABCC2*, в свою очередь, участвует в канальцевом транспорте лекарств, в основном находящихся в конъюгированном состоянии [25]. *ABCC4*, *ABCC5* и *ABCC6* также транспортируют противоопухолевые препараты, хотя их роль в развитии МЛУ сравнительно менее изучена. *ABCG2* транспортирует широкий спектр лекарств и влияет на их фармакокинетику. Он играет большую роль в транспорте стеролсульфата и уратов и способствует развитию МЛУ к ингибиторам ДНК-топоизомеразы I типа, тирозинкиназ, антрациклинам, а также аналогам камптотетина в различных типах опухолей [76, 77].

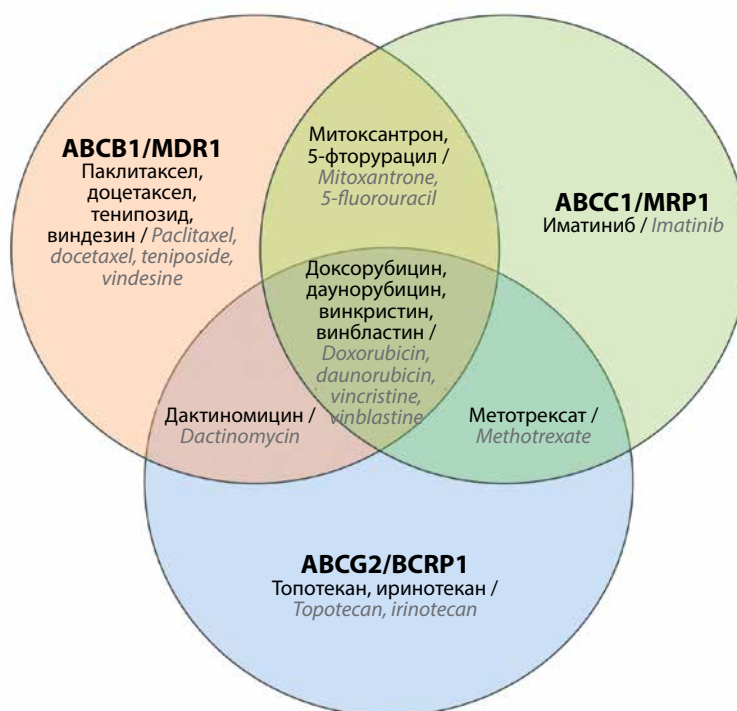


Рис. 2. Некоторые противоопухолевые препараты, выступающие субстратами наиболее изученных представителей ABC-транспортёров
Fig. 2. Selected antitumor drugs serving as substrates to the most studied ABC transporter proteins

АВС-ТРАНСПОРТЕРЫ
В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

На основании описанных выше функций АВС-транспортёров и их роли как в онкогенезе, так и в формировании МЛУ, особый интерес представляют разработка и последующее внедрение в клиническую практику специфических ингибиторов, воздействующих на АВС-транспортёры и способных модулировать чувствительность опухолевых клеток к экскретируемым лекарственным препаратам. Можно выделить несколько способов подавления активности данных белков: ингибирование непосредственно белка-транспортёра путем блокировки сайта связывания или нарушения гидролиза АТФ; блокировка факторов транскрипции, регулирующих его экспрессию; блокировка сигнальных путей, индуцированных транспортёром, и др. [6]. В настоящее время разработаны 4 поколения ингибиторов АВС-транспортёров.

К препаратам 1-го поколения относятся циклоспорин А и верапамил. Эти лекарственные средства, продемонстрировавшие высокую эффективность *in vitro*, были протестированы на мышиных моделях чувствительных и резистентных клеток лимфомы Р338 и лимфоцитарного лейкоза L1210. К сожалению, они не показали аналогичных результатов *in vivo* из-за низкой аффинности к ингибируемым белкам и высокой токсичности, что сделало невозможным их применение в клинической практике [6, 78].

Препараты 2-го поколения – вальсподар, бирикодар – проявляли высокую активность и специфичность по отношению к АВСВ1, при этом они являлись субстратом для других транспортёров (АВСС1 и АВСГ2), что приводило к значительным фармакокинетическим изменениям (в том числе при взаимодействии с другими химиотерапевтическими препаратами) и непредсказуемым побочным эффектам [78]. К примеру, исследование с участием пациентов с раком яичника и первичным раком брюшины продемонстрировало, что комбинированное применение вальсподара и паклитаксела не улучшало показатели

общей выживаемости и оказывало больший токсический эффект [79]. Аналогично комбинированное применение бирикодара с такими противоопухолевыми препаратами, как винкристин и паклитаксел, не показало хороших результатов [80].

Ингибиторы 3-го поколения, к которым относятся тариквидар, зосукидар, элакридар и ланикидар, проявляли высокую аффинность к АВСВ1 и оказывали меньшее влияние на фармакокинетику. Их применение приводило к повышению чувствительности опухолевых клеток, однако клинические исследования не показали значительного улучшения при применении комбинации препаратов 3-го поколения и химиопрепаратов [81]. Например, исследования тариквидара были прекращены из-за его высокой токсичности [82], а результаты, полученные в III фазе клинических испытаний зосукидара, не продемонстрировали положительного эффекта у пациентов с острым миелолейкозом [83].

К ингибиторам 4-го поколения относят препараты натурального происхождения, характеризующиеся низкой токсичностью и хорошей переносимостью. Например, куркумин и его производные характеризуются лучшей пероральной доступностью и меньшей токсичностью по сравнению с препаратами предшествующих поколений. Доказано, что он может способствовать преодолению МЛУ, опосредованной АВСВ1, АВСС1 и АВСГ2, и повышать эффективность противоопухолевой терапии [84]. Флавоноиды также являются представителями ингибиторов АВС-транспортёров 4-го поколения. В основе их ингибирующего действия лежит множество механизмов: блокировка сайта связывания лекарственного препарата (нобилетин), нарушение гидролиза АТФ (кверцетин), снижение экспрессии АВС-транспортёров (икаритин) [85].

Ниже представлены основные ингибиторы АВС-транспортёров, подавляющие активность 3 основных представителей, для которых клиническая значимость в формировании МЛУ злокачественных опухолей считается доказанной (табл. 2).

Таблица 2. Ингибиторы наиболее изученных представителей АВС-транспортёров

Table 2. Inhibitors of the most studied ABC transporter proteins

Транспортер Transporter	Ингибитор Inhibitor	Источник Source
АВСВ1	Нарингенин, кверцетин, верапамил, хинин, сангвинарин, берберин, резерпин, бальзаминол, валсподар (PSC833), иматиниб, циклоспорин, тариквидар Naringenin, quercetin, verapamil, quinine, sanguinarine, berberine, reserpine, balsaminol, valsopodar (PSC833), imatinib, cyclosporine, tariquidar	[68–101]
АВСС1	Тимосапонин А-III, кризин, лейкотриен С4, пробенецид, сунитиниб, хинин, хинидин Timosaponin A-III, chrysin, leukotriene C4, probenecid, sunitinib, quinine, quinidine	[90, 102]
АВСГ2	Нарингенин, кризин, иматиниб, элакридар, тариквидар, бирикодар, силимарин, кверцетин, gefитиниб, эрлотиниб, акситиниб, Ко-143 Naringenin, chrysin, imatinib, elacridar, biricodar, silymarin, quercetin, gefitinib, erlotinib, axitinib, Co-143	[100, 102]

Ингибиторы ABCB1. Еще в 1981 г. было обнаружено, что ABCB1-опосредованную лекарственную устойчивость опухолевых клеток *in vitro* можно обратить вспять, если применить соответствующие ингибиторы, такие как верапамил [86]. Показано, что данный препарат может конкурентно ингибировать транспортную функцию P-гр, не прерывая гидролиз АТФ, и увеличивать внутриклеточное накопление многих противоопухолевых препаратов для преодоления МЛУ [87]. Широко тестируемым соединением 2-го поколения, ингибирующим активность транспортера ABCB1, является PSC-833 (валсподар). Наиболее значимый результат исследований с использованием PSC-833 — возможность уменьшения терапевтической дозы противоопухолевых средств, применяемых в комбинации с ним (на 25 % для этопозида и на 66 % для паклитаксела), что, безусловно, является важным шагом к минимизации системных побочных эффектов при проведении комбинированной терапии. Тем не менее нельзя исключать тот факт, что снижение дозы противоопухолевого препарата может повлечь за собой уменьшение его концентрации в опухоли, что даже при полном ингибировании активности P-гр способно снизить терапевтический эффект [76].

В настоящее время с учетом особенностей предыдущих двух поколений ингибиторов ABC-транспортеров разрабатываются препараты 3-го поколения. К ним относится тариквидар, который кроме P-гр также связывает ABCG2 [86]. Кроме того, он способен ингибировать АТФазную активность P-гр [87]. Ингибирующие эффекты тариквидара на P-гр значительно превосходят таковые у препаратов 1-го и 2-го поколений по результативности и продолжительности действия [87]. Среди препаратов 4-го поколения с целью обнаружения у них ингибирующего действия на P-гр особое внимание исследователи уделяют продуктам природного происхождения — флавоноидам, алкалоидам, кумаринам и другим классам соединений [87].

Ингибиторы ABCC1. Флавоноиды, особенно их димеры, могут обладать ингибирующей активностью в отношении ABCC1 [88]. Кроме того, показано, что они повышают внутриклеточную концентрацию 6-карбоксифлуоресцеин диацетата и доксорубина в клеточной линии остеосаркомы U2OS с гиперэкспрессией ABCC1 [89]. Также обнаружено, что тимосапонин способствует преодолению МЛУ, опосредованной как P-гр, так и ABCC1 посредством регуляции сигнального пути PI3K/Akt [90, 91]. Новое производное, названное LSS-11, действует как мощный ингибитор ABCB1 и ABCC1 посредством влияния на сигнальные пути DR5 и STAT3 и подавления экспрессии генов указанных белков [92].

Ингибиторы ABCG2. В настоящее время разработано большое количество аналогов тариквидара, ингибитора P-гр 3-го поколения, которые регулируют ABCG2-опосредованный выброс лекарственных средств, предположительно за счет ингибирования

гидролиза АТФ. Например, препараты UR-MB108 и UR-MB136 являются мощными ингибиторами ABCG2 [92]. Также на основе препарата Ко-143, ингибитора ABCC1 и ABCG2, разрабатываются более специфические ингибиторы, оказывающие влияние только на ABCG2 [78, 93].

НЕКЛАССИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ ABC-ТРАНСПОРТЕРОВ

Помимо классических ингибиторов ABC-транспортеров в настоящее время имеются экспериментальные данные о способности других лекарственных веществ оказывать так называемый офф-таргетный эффект (кроме своего основного терапевтического эффекта) и ингибировать функцию ABC-транспортеров, а также в ряде случаев являться их субстратами.

Ингибиторы рецепторных и нерецепторных тирозинкиназ. Одной из наиболее распространенных и изученных групп химических соединений, оказывающих данный офф-таргетный эффект в отношении ABC-транспортеров, являются ингибиторы рецепторных и нерецепторных тирозинкиназ [81]. Действительно, ингибиторы тирозинкиназ представляют собой эффективные конкурентные ингибиторы каталитического домена тирозиновых протеинкиназ, подавляющие связывание АТФ. Эти лекарственные препараты снижают активность рецептора и, как следствие, активацию нижележащих сигнальных путей, ухудшая пролиферацию и способствуя гибели опухолевых клеток. Они могут подавлять активность ABC-транспортеров, имеющих аналогичный сайт связывания АТФ в своей структуре.

Например, такие ингибиторы тирозинкиназы BCR-ABL, как иматиниб и нилотиниб, взаимодействуют с белками ABCB1, ABCC1 и ABCG2, изменяя их регуляцию и способствуя восстановлению чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам [103]. Исследования ингибиторов рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) — гефитиниба и эрлотиниба — показали, что эти препараты помогают преодолеть лекарственную устойчивость, опосредованную переносчиками ABCB1 и ABCG2 [104]. В исследованиях *in vitro* ингибиторов тирозинкиназных рецепторов факторов роста эндотелия сосудов (VEGFR) было продемонстрировано, что такие препараты, как мотесаниб, вандетаниб, сорафениб, влияют на активность ABCB1 и повышают цитотоксичность в отношении раковых клеток [104]. Результаты исследований нашей научной группы также продемонстрировали высокую способность инфигратиниба (BGJ 398) вызывать ресенсиализацию различных типов опухолевых клеток с фенотипом МЛУ к действию таких химиопрепаратов, как доксорубин и паклитаксел [81]. Известно, что данный препарат в настоящее время успешно применяется в терапии пациентов с некоторыми злокачественными новообразованиями, характеризующимися aberrантной активацией сигнального пути рецепторов

фактора роста фибробластов (FGFR) вследствие наличия активирующих мутаций в одном из 4 типов FGFR. Например, он используется у больных с холангиокарциномой, при которой частота активирующей мутации FGFR2 колеблется от 7 до 15 % [81].

Антиэстрогенные препараты. Кроме того, показано влияние некоторых антиэстрогенных препаратов на функциональную активность ABC-транспортёров. Большая часть исследований в данном направлении посвящена тамоксифену. В ранних испытаниях, проведенных на клеточных линиях рака шейки матки KB3-1 и KBV-1, являющихся резистентными к винбластину, продемонстрировано, что этот препарат, связываясь с P-gp, может снижать экскрецию винбластина и способствовать накоплению его внутри клетки, повышая тем самым эффективность химиопрепаратов [105]. Аналогичные результаты получены на клеточной линии холангиокарциномы человека QBC939, резистентной к адриамицину. В данном исследовании показано, что применение тамоксифена способствовало снижению экспрессии P-gp, повышению внутриклеточной концентрации доксорубина и усилению эффекта не только доксорубина, но и некоторых других препаратов, например митомицина [106]. В ходе еще одного исследования были получены результаты, свидетельствующие о воздействии тамоксифена не только на P-gp, но и на MRP1. По мнению авторов, это приводит к нарушению взаимодействия противоопухолевых препаратов и транспортёров и, как следствие, к ингибированию связанных механизмов МЛУ. При этом эффект антиэстрогенного препарата снижается за счет его инактивации при конкурентном связывании с ABC-транспортёрами на пути к клеточным мишеням [107].

В недавно опубликованном исследовании, проведенном на клеточной линии яичников китайского хомяка CHO^RC5, резистентной к колхицину, и рака молочной железы человека MDA-Doxo⁴⁰⁰, устойчивой к доксорубину в концентрации 400 нмоль, получены аналогичные результаты, подтверждающие эффективность тамоксифена как ингибитора ABCB1 [108]. Способность этого лекарственного средства повышать чувствительность химиорезистентных опухолевых клеток к химиопрепаратам, в частности доксорубину, была показана на ксенографтных моделях колорек-

тального рака, что подтверждалось значительным уменьшением размеров перевиваемых опухолей в группе экспериментальных животных, получавших вышеуказанную комбинированную терапию. Важно отметить, что эффективность данной терапии не зависела от уровня экспрессии эстрогеновых рецепторов, что косвенно подтверждало офф-таргетный эффект тамоксифена в химиосенсилизации данных злокачественных новообразований [109].

В клиническом исследовании, в котором принимали участие пациенты с распространенными формами немелкоклеточного рака легкого, показано снижение уровня экспрессии P-gp в опухолевой ткани на фоне проведенной комбинированной терапии (доцетаксел и тамоксифен). Важно подчеркнуть, что в группе больных, получавших данную терапию, у которых в опухолях наблюдалось снижение уровня экспрессии P-gp, отмечено существенное увеличение продолжительности как безрецидивного периода, так и показателей общей выживаемости. Это подтверждает патогенетическую роль ингибирования активности ABC-транспортёров для сенсилизации злокачественных новообразований к используемым в настоящее время химиопрепаратам [110].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, подавление активности ABC-транспортёров в настоящее время по-прежнему рассматривается в качестве одного из перспективных подходов как для повышения эффективности противоопухолевой терапии у пациентов с неоперабельными, рецидивирующими и метастатическими опухолями, так и для минимизации системных побочных эффектов проводимой химио- и таргетной терапии. Несмотря на существенный прогресс в понимании фундаментальных механизмов и принципов работы ABC-транспортёров, а также механизмов сенсилизации опухолей к химиопрепаратам различных групп, отсутствие клинически значимых результатов комбинированного использования вышеуказанных лекарственных средств является мощным стимулом для поиска новых эффективных соединений, оказывающих селективное воздействие на функцию данных переносчиков. Также это подтверждает многообразие молекулярных механизмов формирования химиорезистентности опухолей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Housman G., Byler S., Heerboth S. et al. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)* 2014;6(3):1769–92. DOI: 10.3390/cancers6031769
2. Rueff J., Rodrigues A.S. Cancer drug resistance: a brief overview from a genetic viewpoint. *Methods Mol Biol* 2016;1395:1–18. DOI: 10.1007/978-1-4939-3347-1_1
3. Ставровская А.А., Генс Г.П. Новое в изучении множественной лекарственной устойчивости клеток рака молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии* 2015;2(1):39–51. DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.039–051
4. Stavrovskaya A.A., Guens G.P. News in the studies of multidrug resistance of breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2015;2(1):39–51. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.039–051
5. Deng J., Bai X., Feng X. et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway alleviates ovarian cancer chemoresistance through

- reversing epithelial-mesenchymal transition and decreasing cancer stem cell marker expression. *BMC Cancer* 2019;19(1):618. DOI: 10.1186/s12885-019-5824-9
5. Stefan S.M. Multi-target ABC transporter modulators: what next and where to go? *Future Med Chem* 2019;11(18):2353–8. DOI: 10.4155/fmc-2019-0185
 6. Juan-Carlos P.M., Perla-Lidia P.P., Stephanie-Talia M.M. et al. ABC transporter superfamily. An updated overview, relevance in cancer multidrug resistance and perspectives with personalized medicine. *Mol Biol Rep* 2021;48(2):1883–901. DOI: 10.1007/s11033-021-06155-w
 7. Robey R.W., Pluchino K.M., Hall M.D. et al. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer* 2018;18(7):452–64. DOI: 10.1038/s41568-018-0005-8
 8. Смирнов Л.П. АТФ-связывающие транспортные белки семейства abc (ATP-binding cassette transporters, abc). Номенклатура, структура, молекулярное разнообразие, функция, участие в функционировании системы биотрансформации ксенобиотиков. Труды Карельского научного центра РАН 2020;3:5–19. DOI: 10.17076/eb1044
 - Smirnov L.P. ATP-binding transport proteins of the abc family (ATP-binding cassette transporters, abc). Nomenclature, structure, molecular diversity, function, participation in the functioning of the xenobiotic biotransformation system. *Trudy Karel'skogo nauchnogo centra RAN = Proceedings of the Karelian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences* 2020;3:5–19. (In Russ.). DOI: 10.17076/eb1044
 9. Alam A., Locher K.P. Structure and mechanism of human ABC transporters. *Annu Rev Biophys* 2023;52:275–300. DOI: 10.1146/annurev-biophys-111622-091232
 10. Thomas C., Tampé R. Structural and mechanistic principles of ABC transporters. *Annu Rev Biochem* 2020;89:605–36. DOI: 10.1146/annurev-biochem-011520-105201
 11. Rees D.C., Johnson E., Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(3):218–27. DOI: 10.1038/nrm2646
 12. Wilkens S. Structure and mechanism of ABC transporters. *Fl1000Prime Rep* 2015;7:14. DOI: 10.12703/P7-14
 13. Fitzgerald M.L., Mujawar Z., Tamehiro N. ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. *Atherosclerosis* 2010;211(2):361–70. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.011
 14. Yan-Charvet L., Wang N., Tall A.R. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(2):139–43. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.179283
 15. Davis W. Jr. The ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) overexpression modulates sphingosine levels and transcription of the amyloid precursor protein (APP) Gene. *Curr Alzheimer Res* 2015;12(9):847–59. DOI: 10.2174/156720501209151019105834
 16. Michaki V., Guix F.X., Vénnekens K. et al. Down-regulation of the ATP-binding cassette transporter 2 (Abca2) reduces amyloid- β production by altering Nicastrin maturation and intracellular localization. *J Biol Chem* 2012;287(2):1100–11. DOI: 10.1074/jbc.M111.288258
 17. Hovnanian A. Harlequin ichthyosis unmasked: a defect of lipid transport. *J Clin Invest* 2005;115(7):1708–10. DOI: 10.1172/JCI25736
 18. Thomas A.C., Cullup T., Norgett E.E. et al. ABCA12 is the major harlequin ichthyosis gene. *J Invest Dermatol* 2006;126(11):2408–13. DOI: 10.1038/sj.jid.5700455
 19. de Vree J.M., Jacquemin E., Sturm E. et al. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(1):282–7. DOI: 10.1073/pnas.95.1.282
 20. Zhang Y., Li F., Patterson A.D. et al. Abcb11 deficiency induces cholestasis coupled to impaired β -fatty acid oxidation in mice. *J Biol Chem* 2012;287(29):24784–94. DOI: 10.1074/jbc.M111.329318
 21. Zhang C., Li D., Zhang J. et al. Mutations in ABCB6 cause dyschromatosis universalis hereditaria. *J Invest Dermatol* 2013;133(9):2221–8. DOI: 10.1038/jid.2013.145
 22. Helias V., Saison C., Ballif B.A. et al. ABCB6 is dispensable for erythropoiesis and specifies the new blood group system Langereis. *Nat Genet* 2012;44(2):170–3. DOI: 10.1038/ng.1069
 23. Bekri S., Kispal G., Lange H. et al. Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood* 2000;96(9):3256–64.
 24. Maguire A., Hellier K., Hammans S. et al. X-linked cerebellar ataxia and sideroblastic anaemia associated with a missense mutation in the ABC7 gene predicting V411L. *Br J Haematol* 2001;115(4):910–7. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2001.03015.x
 25. Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204(3):216–37. DOI: 10.1016/j.taap.2004.10.012
 26. Bienengraeber M., Olson T.M., Selivanov V.A. et al. ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *Nat Genet* 2004;36(4):382–7. DOI: 10.1038/ng1329
 27. Singareddy S.S., Roessler H.I., McClenaghan C. et al. ATP-sensitive potassium channels in zebrafish cardiac and vascular smooth muscle. *J Physiol* 2022;600(2):299–312. DOI: 10.1113/JP282157.
 28. van Bon B.W., Gilissen C., Grange D.K. et al. Cantú syndrome is caused by mutations in ABCC9. *Am J Hum Genet* 2012;90(6):1094–101. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.04.014
 29. Engelen M., Kemp S., de Visser M. et al. X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:51. DOI: 10.1186/1750-1172-7-51
 30. Kemp S., Wanders R.J. X-linked adrenoleukodystrophy: very long-chain fatty acid metabolism, ABC half-transporters and the complicated route to treatment. *Mol Genet Metab* 2007;90(3):268–76. DOI: 10.1016/j.ymgme.2006.10.001
 31. Ferdinandusse S., Jimenez-Sanchez G., Koster J. et al. A novel bile acid biosynthesis defect due to a deficiency of peroxisomal ABCD3. *Hum Mol Genet* 2015;24(2):361–70. DOI: 10.1093/hmg/ddu448
 32. Coelho D., Kim J.C., Miousse I.R. et al. Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nat Genet* 2012;44(10):1152–5. DOI: 10.1038/ng.2386
 33. Deme J.C., Hancock M.A., Xia X. et al. Purification and interaction analyses of two human lysosomal vitamin B12 transporters: LMBD1 and ABCD4. *Mol Membr Biol* 2014;31(7–8):250–61. DOI: 10.3109/09687688.2014.990998
 34. Lu K., Lee M.H., Hazard S. et al. Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *Am J Hum Genet* 2001;69(2):278–90. DOI: 10.1086/321294
 35. Hlavata I., Mohelnikova-Duchonova B., Vaclavikova R. et al. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* 2012;27(2):187–96. DOI: 10.1093/mutage/ger075
 36. Mohelnikova-Duchonova B., Brynychova V., Oliverius M. et al. Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and nonneoplastic tissues. *Pancreas* 2013;42(4):707–16. DOI: 10.1097/MPA.0b013e318279b861
 37. Moore J.M., Bell E.L., Hughes R.O. et al. ABC transporters: human disease and pharmacotherapeutic potential. *Trends Mol Med* 2023;29(2):152–72. DOI: 10.1016/j.molmed.2022.11.001
 38. Zhao X., Guo Y., Yue W. et al. ABCC4 is required for cell proliferation and tumorigenesis in non-small cell lung cancer. *Onco Targets Ther* 2014;7:343–51. DOI: 10.2147/OTT.S56029
 39. Zheng S., Liu D., Wang F. et al. ABCA12 promotes proliferation and migration and inhibits apoptosis of pancreatic cancer cells through the AKT signaling pathway. *Front Genet* 2022;13:906326. DOI: 10.3389/fgene.2022.906326

40. Demidenko R., Razanauskas D., Daniunaite K. et al. Frequent down-regulation of ABC transporter genes in prostate cancer. *BMC Cancer*. 2015;15:683. DOI: 10.1186/s12885-015-1689-8
41. Andersen V., Svenningsen K., Knudsen L.A. et al. Novel understanding of ABC transporters ABCB1/MDR/P-glycoprotein, ABCC2/MRP2, and ABCG2/BCRP in colorectal pathophysiology. *World J Gastroenterol* 2015;21(41):11862–76. DOI: 10.3748/wjg.v21.i41.11862
42. Begicevic R.R., Falasca M. ABC transporters in cancer stem cells: beyond chemoresistance. *Int J Mol Sci* 2017;18(11):2362. DOI: 10.3390/ijms18112362
43. Bradley G., Sharma R., Rajalakshmi S. et al. P-glycoprotein expression during tumor progression in the rat liver. *Cancer Res* 1992;52(19):5154–61.
44. Skinner K.T., Palkar A.M., Hong A.L. Genetics of ABCB1 in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023;15(17):4236. DOI: 10.3390/cancers15174236
45. Abe T., Mori T., Wakabayashi Y. et al. Expression of multidrug resistance protein gene in patients with glioma after chemotherapy. *J Neurooncol* 1998;40(1):11–8. DOI: 10.1023/a:1005954406809
46. Kunická T., Souček P. Importance of ABCB1 for cancer therapy and prognosis. *Drug Metab Rev* 2014;46(3):325–42. DOI: 10.3109/03602532.2014.901348
47. Andersen V., Vogel L.K., Kopp T.I. et al. High ABCC2 and low ABCC2 gene expression are early events in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *PLoS One* 2015;10(3):e0119255. DOI: 10.1371/journal.pone.0119255
48. Cervenková L., Vycital O., Bruha J. et al. Protein expression of ABCC2 and SLC22A3 associates with prognosis of pancreatic adenocarcinoma. *Sci Rep* 2019;9(1):19782. DOI: 10.1038/s41598-019-56059-w
49. Chen Y., Zhou H., Yang S. et al. Increased ABCC2 expression predicts cisplatin resistance in non-small cell lung cancer. *Cell Biochem Funct* 2021;39(2):277–86. DOI: 10.1002/cbf.3577
50. Li J., Zhang J.T., Jiang X. et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator as a biomarker in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2015;46(5):2107–15. DOI: 10.3892/ijo.2015.2921
51. Wu Z., Peng X., Li J. et al. Constitutive activation of nuclear factor κB contributes to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and promotes human cervical cancer progression and poor prognosis. *Int J Gynecol Cancer* 2013;23(5):906–15. DOI: 10.1097/IGC.0b013e318292da82
52. Xu J., Yong M., Li J. et al. High level of CFTR expression is associated with tumor aggression and knockdown of CFTR suppresses proliferation of ovarian cancer in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 2015;33(5):2227–34. DOI: 10.3892/or.2015.3829
53. Zhang J.T., Jiang X.H., Xie C. et al. Downregulation of CFTR promotes epithelial-to-mesenchymal transition and is associated with poor prognosis of breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833(12):2961–9. DOI: 10.1016/j.bbamer.2013.07.021
54. Theodoulou F.L., Kerr I.D. ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochem Soc Trans* 2015;43(5):1033–40. DOI: 10.1042/BST20150139
55. Linton K.J. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* 2007;22:122–30. DOI: 10.1152/physiol.00046.2006
56. Литвяков Н.В., Цыганов М.М. Клинические исследования вклада ABC-транспортеров в реализацию фенотипа множественной лекарственной устойчивости рака молочной железы. *Вопросы онкологии* 2016;62(1):45–52. Litvyakov N.V., Tsyganov M.M. Clinical studies of the contribution of ABC transporters to the realization of the phenotype of multidrug resistance of breast cancer. *Voprosy onkologii = Issues of Oncology* 2016;62(1):45–52. (In Russ.).
57. Badiee S.A., Isu U.H., Khodadadi E. et al. The alternating access mechanism in mammalian multidrug resistance transporters and their bacterial homologs. *Membranes* 2023;13(6):568. DOI: 10.3390/membranes13060568
58. Shaikh S., Wen P.C., Enkavi G. et al. Capturing functional motions of membrane channels and transporters with molecular dynamics simulation. *J Comput Theor Nanosci* 2010;7(12):2481–500. DOI: 10.1166/jctn.2010.1636
59. George A.M., Jones P.M. Perspectives on the structure-function of ABC transporters: the Switch and Constant Contact models. *Prog Biophys Mol Biol* 2012;109(3):95–107. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2012.06.003
60. Higgins C.F., Linton K.J. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11(10):918–26. DOI: 10.1038/nsmb836
61. Jones P.M., George A.M. Mechanism of the ABC transporter ATPase domains: catalytic models and the biochemical and biophysical record. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013;48(1):39–50. DOI: 10.3109/10409238.2012.735644
62. Mochida Y., Taguchi K., Taniguchi S. et al. The role of P-glycoprotein in intestinal tumorigenesis: disruption of mdr1a suppresses polyp formation in Apc(Min/+) mice. *Carcinogenesis* 2003;24(7):1219–24. DOI: 10.1093/carcin/bgg073
63. Henderson M.J., Haber M., Porro A. et al. ABCC multidrug transporters in childhood neuroblastoma: clinical and biological effects independent of cytotoxic drug efflux. *J Natl Cancer Inst* 2011;103(16):1236–51. DOI: 10.1093/jnci/djr256
64. Yamada A., Ishikawa T., Ota I. et al. High expression of ATP-binding cassette transporter ABCC11 in breast tumors is associated with aggressive subtypes and low disease-free survival. *Breast Cancer Res Treat* 2013;137(3):773–82. DOI: 10.1007/s10549-012-2398-5
65. Omran O.M. The prognostic value of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) expression in breast carcinomas. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2012;31(4):367–76. DOI: 10.1615/jenvironpatholtoxicoloncol.2013006767
66. Xiang L., Su P., Xia S. et al. ABCG2 is associated with HER-2 expression, lymph node metastasis and clinical stage in breast invasive ductal carcinoma. *Diagn Pathol* 2011;6:90. DOI: 10.1186/1746-1596-6-90
67. Liu T., Li Z., Zhang Q. et al. Targeting ABCB1 (MDR1) in multi-drug resistant osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system to reverse drug resistance. *Oncotarget* 2016;7(50):83502–13. DOI: 10.18632/oncotarget.13148
68. Serra M., Pasello M., Manara M.C. et al. May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group I treatment protocol. *Int J Oncol* 2006;29(6):1459–68.
69. Nobili S., Lapucci A., Landini I. et al. Role of ATP-binding cassette transporters in cancer initiation and progression. *Semin Cancer Biol* 2020;60:72–95. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.08.006
70. Jiang Z.S., Sun Y.Z., Wang S.M. et al. Epithelial-mesenchymal transition: potential regulator of ABC transporters in tumor progression. *J Cancer* 2017;8(12):2319–27. DOI: 10.7150/jca.19079
71. Stewart T.A., Azimi I., Thompson E.W. et al. A role for calcium in the regulation of ATP-binding cassette, sub-family C, member 3 (ABCC3) gene expression in a model of epidermal growth factor-mediated breast cancer epithelial-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;458(3):509–14. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.01.141
72. Tian Y., Tian X., Han X. et al. Expression of ATP binding cassette E1 enhances viability and invasiveness of lung adenocarcinoma cells in vitro. *Mol Med Rep* 2016;14(2):1345–50. DOI: 10.3892/mmr.2016.5388
73. Цыганов М.М., Цыденова И.А., Маркович В.А. и др. Экспрессионная гетерогенность генов семейства ABC-транспортеров и генов химиочувствительности в опухоли желудка, канцероматозе и метастазах в лимфатические узлы. *Успехи молекулярной онкологии* 2022;9(4):78–88. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-78-88
Tsyganov M.M., Tsydenova I.A., Markovich V.A. et al. Expression heterogeneity of ABC-transporter family genes and chemosensitivity genes in gastric tumor, carcinomatosis and lymph node metastases.

- Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2022;9(4):78–88. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-78-88
74. Цыганов М.М., Ибрагимова М.К., Певзнер А.М. и др. Анализ экспрессии генов семейства ABC-транспортеров в опухоли молочной железы: связь с эффективностью химиотерапии и прогнозом заболевания. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(2):29–38. DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-2-29-38
 - Tsyganov M.M., Ibragimova M.K., Pevzner A.M. et al. Gene expression analysis of ABC transporter family in breast tumors: relationship with chemotherapy effect and disease prognosis. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2020;7(2):29–38. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-2-29-38
 75. Durmus S., Hendriks J.J., Schinkel A.H. Apical ABC transporters and cancer chemotherapeutic drug disposition. Adv Cancer Res 2015;125:1–41. DOI: 10.1016/bs.acr.2014.10.001
 76. Leonard G.D., Fojo T., Bates S.E. The role of ABC transporters in clinical practice. Oncologist 2003;8(5):411–24. DOI: 10.1634/theoncologist.8-5-411
 77. Mo W., Zhang J.T. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. Int J Biochem Mol Biol 2012;3(1):1–27.
 78. Xiao H., Zheng Y., Ma L. et al. Clinically-relevant ABC transporter for anti-cancer drug resistance. Front Pharmacol 2021;12:648407. DOI: 10.3389/fphar.2021.648407
 79. Lhomme C., Joly F., Walker J.L. et al. Phase III study of valspodar (PSC 833) combined with paclitaxel and carboplatin compared with paclitaxel and carboplatin alone in patients with stage IV or suboptimally debulked stage III epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer. J Clin Oncol 2008;26(16):2674–82. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.9807
 80. Adamska A., Falasca M. ATP-binding cassette transporters in progression and clinical outcome of pancreatic cancer: What is the way forward? World J Gastroenterol 2018;24(29):3222–38. DOI: 10.3748/wjg.v24.i29.3222
 81. Boichuk S., Dunaev P., Mustafin I. et al. Infigratinib (BGJ 398), a Pan-FGFR inhibitor, targets P-glycoprotein and increases chemotherapeutic-induced mortality of multidrug-resistant tumor cells. Biomedicines 2022;10(3):601. DOI: 10.3390/biomedicines10030601
 82. Tamaki A., Ierano C., Szakacs G. et al. The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. Essays Biochem 2011;50(1):209–32. DOI: 10.1042/bse0500209
 83. Cripe L.D., Uno H., Paietta E.M. et al. Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999. Blood 2010;116(20):4077–85. DOI: 10.1182/blood-2010-04-277269
 84. Xu T., Guo P., He Y. et al. Application of curcumin and its derivatives in tumor multidrug resistance. Phytother Res 2020;34(10):2438–58. DOI: 10.1002/ptr.6694
 85. Gonçalves B.M.F., Cardoso D.S.P., Ferreira U.M.J. Overcoming multidrug resistance: flavonoid and terpenoid nitrogen-containing derivatives as ABC transporter modulators. Molecules 2020;25(15):3364. DOI: 10.3390/molecules25153364
 86. Kelly R.J., Draper R., Chen C.C. et al. A pharmacodynamic study of docetaxel in combination with the P-glycoprotein antagonist tariquidar (XR9576) in patients with lung, ovarian, and cervical cancer. Clin Cancer Res 2011;17(3):569–80. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1725
 87. Palmeira A., Sousa E., Vasconcelos M.H. et al. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. Curr Med Chem 2012;19(13):1946–2025. DOI: 10.2174/092986712800167392
 88. Dury L., Nasr R., Lorendeau D. et al. Flavonoid dimers are highly potent killers of multidrug resistant cancer cells overexpressing MRP1. Biochem Pharmacol 2017;124:10–8. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.10.013
 89. Ni K., Yang L., Wan C. et al. Flavonostilbenes from *Sophora alopecuroides* L. as multidrug resistance associated protein 1 (MRP1) inhibitors. Nat Prod Res 2014;28(23):2195–8. DOI: 10.1080/14786419.2014.930856
 90. Chen J.R., Jia X.H., Wang H. et al. Timosaponin A-III reverses multi-drug resistance in human chronic myelogenous leukemia K562/ADM cells via downregulation of MDR1 and MRP1 expression by inhibiting PI3K/Akt signaling pathway. Int J Oncol 2016;48(5):2063–70. DOI: 10.3892/ijo.2016.3423
 91. Ji L., Liu X., Zhang S. et al. The Novel triazolonephthalimide derivative LSS-11 synergizes the anti-proliferative effect of paclitaxel via STAT3-dependent MDR1 and MRP1 downregulation in chemoresistant lung cancer cells. Molecules 2017;22(11):1822. DOI: 10.3390/molecules22111822
 92. Antoni F., Bause M., Scholler M. et al. Tariquidar-related triazoles as potent, selective and stable inhibitors of ABCG2 (BCRP). Eur J Med Chem 2020;191:112133. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112133
 93. Weidner L.D., Zoghbi S.S., Lu S. et al. The inhibitor Ko143 is not specific for ABCG2. J Pharmacol Exp Ther 2015;354(3):384–93. DOI: 10.1124/jpet.115.225482
 94. Tsuruo T., Iida H., Tsukagoshi S. et al. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. Cancer Res 1981;41(5):1967–72.
 95. Wang L., Sun Y. Efflux mechanism and pathway of verapamil pumping by human P-glycoprotein. Arch Biochem Biophys 2020;696:108675. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108675
 96. Borska S., Chmielewska M., Wysocka T. et al. In vitro effect of quercetin on human gastric carcinoma: targeting cancer cells death and MDR. Food Chem Toxicol 2012;50(9):3375–83. DOI: 10.1016/j.fct.2012.06.035
 97. Chen Y.Y., Chang Y.M., Wang K.Y. et al. Naringenin inhibited migration and invasion of glioblastoma cells through multiple mechanisms. Environ Toxicol 2019;34(3):233–9. DOI: 10.1002/tox.22677
 98. Eid S.Y., El-Readi M.Z., Wink M. Synergism of three-drug combinations of sanguinarine and other plant secondary metabolites with digitonin and doxorubicin in multi-drug resistant cancer cells. Phytomedicine 2012;19(14):1288–97. DOI: 10.1016/j.phymed.2012.08.010
 99. Jain S., Laphookhieo S., Shi Z. et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by siphonane triterpenoids. J Nat Prod 2007;70(6):928–31. DOI: 10.1021/np0605889
 100. Pires M.M., Emmert D., Hrycyna C.A. et al. Inhibition of P-glycoprotein-mediated paclitaxel resistance by reversibly linked quinine homodimers. Mol Pharmacol 2009;75(1):92–100. DOI: 10.1124/mol.108.050492
 101. Zhang Y., Guo L., Huang J. et al. Inhibitory effect of berberine on broiler P-glycoprotein expression and function: *in situ* and *in vitro* studies. Int J Mol Sci 2019;20(8):1966. DOI: 10.3390/ijms20081966
 102. Choi Y.H., Yu A.M. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. Curr Pharm Des 2014;20(5):793–807. DOI: 10.2174/138161282005140214165212
 103. Beretta G.L., Cassinelli G., Pennati M. et al. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: the dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents. Eur J Med Chem 2017;142:271–89. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.07.062
 104. Kathawala R.J., Gupta P., Ashby C.R. Jr. et al. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. Drug Resist Updat 2015;18:1–17. DOI: 10.1016/j.drug.2014.11.002
 105. Callaghan R., Higgins C.F. Interaction of tamoxifen with the multidrug resistance P-glycoprotein. Br J Cancer 1995;71(2):294–9. DOI: 10.1038/bjc.1995.59
 106. Liu Z.H., Ma Y.L., He Y.P. et al. Tamoxifen reverses the multi-drug-resistance of an established human cholangiocarcinoma cell line in combined chemotherapeutics. Mol Biol Rep 2011;38(3):1769–75. DOI: 10.1007/s11033-010-0291-z

107. Богуш Т.А., Дудко Е.А., Богуш Е.А. и др. Молекулярные мишени тамоксифена, отличные от эстрогеновых рецепторов. Антибиотики и химиотерапия 2012;57(1–2):50–8.
108. Bogush T.A., Dudko E.A., Bogush E.A. et al. Molecular targets of tamoxifen other than estrogen receptors. Antibiotiki i himioterapiya = Antibiotics and Chemotherapies 2012;57(1–2):50–8. (In Russ.).
109. Bakadlag R., Limniatis G., Georges G. et al. The anti-estrogen receptor drug, tamoxifen, is selectively lethal to P-glycoprotein-expressing multidrug resistant tumor cells. BMC Cancer 2023;23(1):24. DOI: 10.1186/s12885-022-10474-x
110. Shen L.Z., Hua Y.B., Yu X.M. et al. Tamoxifen can reverse multidrug resistance of colorectal carcinoma in vivo. World J Gastroenterol 2005;11(7):1060–4. DOI: 10.3748/wjg.v11.i7.1060
111. Wen S., Fu X., Li G. et al. Efficacy of tamoxifen in combination with docetaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer pretreated with platinum-based chemotherapy. Anticancer Drugs 2016;27(5):447–56. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000350

Вклад авторов

С.В. Бойчук, Т.В. Ивойлова: сбор и анализ данных, написание текста статьи, редактирование.

Author's contributions

S.V. Boichuk, T.V. Ivoilova: data collection and analysis, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

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

Т.В. Ивойлова / T.V. Ivoilova: <https://orcid.org/0009-0003-4348-9141>

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (РНФ) (грант № 20-15-00001) и в рамках Программы стратегического академического лидерства ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» («Приоритет-2030»).

Funding. The study was carried out with the support of the Russian Science Foundation (grant No. 20-15-00001). The study was performed as a part of Russia Strategic Academic Leadership Program (“Priority-2030”) of Kazan Federal University.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Статья поступила: 17.10.2023. Принята к публикации: 08.11.2023.

Article submitted: 17.10.2023. Accepted for publication: 08.11.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-22-30>

Современные представления о клинко-эпидемических и молекулярно-генетических особенностях меланомы кожи и слизистых

В.А. Богданова¹, Л.В. Спирина^{1,2}, С.Ю. Чижевская^{1,2}, И.В. Ковалева^{1,2}, К.В. Никульников²

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2;

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

Контакты: Людмила Викторовна Спирина spirinalvl@mail.ru

Меланома кожи и слизистых остается глобальной медицинской проблемой, что обусловлено ростом распространенности этого заболевания и отсутствием адекватных молекулярно-генетических маркеров его диагностики и прогноза течения. Развитие молекулярных подходов в лечении данного вида опухоли связано с выявлением мутаций, а также с разработкой иммунотерапевтических и таргетных препаратов, способных повысить эффективность лечения пациентов с данной патологией. Однако гетерогенность механизмов развития опухоли и формирование резистентности представляют проблему. Стоит отметить наличие множества эпигенетических факторов, являющихся перспективными маркерами развития, диагностики и прогноза эффективности лечения меланомы кожи и слизистых. В настоящем обзоре собрана актуальная на данный момент информация о молекулярных механизмах заболевания, обусловленных генетическими особенностями опухоли и биологическими причинами резистентности к терапии. Особый интерес представляет перекрест сигнальных путей, связанных с меланоцит-индуцирующим транскрипционным фактором (melanocyte inducing transcription factor, MITF), который ассоциирован с транскрипционными и ростовыми факторами, а также представляет собой мишень эпигенетической регуляции с помощью микроРНК и длинных некодирующих РНК.

Ключевые слова: меланома кожи, MAPK, BRAF, аутофагия, меланоцитиндуцирующий транскрипционный фактор, микроРНК, длинные некодирующие РНК

Для цитирования: Богданова В.А., Спирина Л.В., Чижевская С.Ю. и др. Современные представления о клинко-эпидемических и молекулярно-генетических особенностях меланомы кожи и слизистых. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):22–30. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-22-30>

Contemporary views on the clinical, epidemiological and molecular genetic characteristics of melanoma of the skin and mucous membranes

V.A. Bogdanova¹, L.V. Spirina^{1,2}, S.Yu. Chizhevskaya^{1,2}, I.V. Kovaleva^{1,2}, K.V. Nikulnikov²

¹Siberian State Medical University, Ministry of Health of the Russia; 2 Moskovsky Tract, Tomsk 634050, Russia;

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

Contacts: Lyudmila Viktorovna Spirina spirinalvl@mail.ru

Melanoma of the skin and mucous membranes remains a global medical problem, which is associated with the increasing prevalence of this disease and the lack of adequate molecular genetic markers for its diagnosis and prognosis. The development of molecular approaches in the treatment of this type of tumor is associated with the identification of mutations, and with the development of immunotherapeutic and targeted drugs that can improve the effectiveness of treatment of patients with this pathology. However, the heterogeneity of the mechanisms of tumor development and the formation of resistance are a problem. It is worth noting the presence of many epigenetic mechanisms that are promising markers of the development, diagnosis and prognosis of the effectiveness of treatment of melanoma of the skin and mucous membranes. This review contains up-to-date information on the molecular mechanisms of the disease associated with the genetic characteristics of the tumor and biological factors of resistance to therapy. Of particular

interest is the intersection of signaling pathways associated with melanocyte-inducing transcription factor (MITF), which is associated with transcription and growth factors, and is a target of epigenetic regulation using microRNAs and long non-coding RNAs.

Keywords: melanoma of the skin, MAPK, BRAF, autophagy, melanocyte-inducing transcription factor, microRNAs, long non-coding RNAs

For citation: Bogdanova V.A., Spirina L.V., Chizhevskaya S.Yu. et al. Contemporary views on the clinical, epidemiological and molecular genetic characteristics of melanoma of the skin and mucous membranes. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(1):22–30. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-22-30>

ВВЕДЕНИЕ

Меланома — наиболее агрессивная форма рака кожи, возникающая в результате злокачественной трансформации меланоцитов. Она занимает особое место среди злокачественных опухолей кожи и является социально значимой проблемой в связи с высоким уровнем летальности, что обусловлено большим метастатическим потенциалом опухоли и низкой эффективностью терапии на поздних стадиях заболевания [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире регистрируются в среднем 132 тыс. случаев меланомы. Самому большому риску заболеваемости меланомой кожи (МК) подвержены жители Австралии и Новой Зеландии, что связывают с расположением этих стран вблизи экватора, тонким озоновым слоем над ними и светлым цветом кожи у населения [2]. В России в 2021 г. выявлены 11 412 случаев меланомы (4588 мужчин, 6824 женщины). Также зарегистрированы 3217 случаев смерти (1548 мужчин, 1669 женщин).

Меланома кожи — мультифакторное заболевание, обусловленное экологическими, фенотипическими, генетическими и другими факторами риска [3]. В мире происходят глобальные атмосферные изменения, по причине которых увеличивается воздействие ультрафиолетового (УФ) излучения на кожу. С этим фактом связывают рост заболеваемости меланомой во многих европейских странах; она входит в десятку наиболее часто выявляемых злокачественных новообразований [4].

Меланин — высокомолекулярный пигмент, не только определяющий цвет кожи, но и защищающий ее от А- и В-спектров УФ-излучения [5–7]. Известно, что это излучение вызывает как гибель, так и злокачественную трансформацию клеток кожи и считается первостепенным фактором риска развития меланомы [8–13]. В ряде эпидемиологических исследований показано наличие связи между пигментными характеристиками и риском возникновения данной патологии. Так, например, к возникновению меланомы больше предрасположены люди со светлой кожей [14], у которых меньше меланина и, соответственно, слабее защита от УФ-излучения, в отличие от людей с темной кожей [15].

На данный момент существенных различий в генетической предрасположенности к меланоме у мужчин и женщин не выявлено. Предполагают гендерные

различия в отношении факторов риска, которые объясняются разными образом жизни и поведенческими привычками мужчин и женщин [16]. Так, согласно данным литературы, женщины с МК имеют лучший прогноз, чем мужчины, поскольку, как правило, в отличие от них ведут более здоровый образ жизни и чаще проходят медицинские осмотры, а ранняя диагностика и начало лечения определяют эффективность терапии [16].

К основным факторам риска развития меланомы относят возраст. Согласно статистическим данным, заболеваемость меланомой неуклонно растет и достигает пика на 7-м и 8-м десятилетиях жизни [16]. В РФ средний возраст больных с впервые установленным диагнозом «меланома кожи» составляет 62 года.

Меланома может развиваться из доброкачественных невусов или *de novo*. С учетом высокой частоты встречаемости доброкачественных невусов потенциал злокачественной трансформации этих поражений, к счастью, низок [17]. Между тем невусы, как и меланома, в основном характеризуются наличием мутации в гене *BRAF*, что свидетельствует об этиологической значимости данного фактора [18].

В настоящее время все больше внимания уделяют генетическим факторам [19]. Примерно в 10 % случаев меланомы носят семейный характер, при этом около трети семей, у членов которых выявлено это заболевание, имеют мутацию в гене *CDKN2A* [20]. У носителей мутации высокопенетрантного гена *RBI* риск развития меланомы в течение жизни в 4 раза выше, чем в общей популяции [21].

Известно, что однонуклеотидные замены в структуре гена *MITF* связаны с 5-кратным возрастанием риска развития МК [5]. Кроме того, выделены несколько ключевых вариантов генов пигментации, к которым относят *MC1R* (melanocortin 1 receptor), *ASIP* (agouti signaling protein), *TYR* (tyrosinase), *SLC45A* (solute carrier family 45 member 2), ассоциирующиеся с повышенным риском возникновения данной опухоли [6]. Существуют 2 полиморфных варианта генов на хромосоме 20q11.22, транскрипция которых регулируется генами *PIGU* (phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class U) и *MYH7B* (myosin heavy chain 7B). Ген *PIGU* участвует в контроле клеточного цикла, а *MYH7B* достоверно связан с развитием невусов. Оба этих гена ассоциированы с риском развития меланомы [7].

Более 50 % всех случаев МК имеют активирующие мутации в *BRAF*, примерно 15–25 % – в *NRAS*, 19 % – мутации рецептора *ERBB4* (erb-b2 receptor tyrosine kinase 4) [8]. Ген *BRAF* (7q34) кодирует серин-треониновую киназу, в случае мутации которой происходит гиперактивация митоген-активированных протеинкиназ MEK и ERK [9]. Мутантный белок bRAF отвечает за гиперактивацию каскада MAPK, а также способствует выживанию меланомы с помощью регуляции экспрессии и функционирования проапоптотических и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 (BIM, BCL-2, BAD) и MCL-1 [10]. При меланоме на участке кожи, не подверженном хроническому солнечному повреждению, мутация *BRAF* зафиксирована в 59 % случаев, а при хронической инсоляции – в 11 %. При акральной меланоме мутацию данного гена обнаруживают в 23 % случаев, при меланоме слизистых оболочек – в 11 % [11]. Интересен тот факт, что мутация *BRAF* выявляется в 70 % случаев беспигментной меланомы, при этом в 89 % из них толщина опухоли составляет <1 мм. Современные методы секвенирования позволили открыть новые мутантные продукты *BRAF*. Согласно полученным данным, в результате хромосомных транслокаций, в которые включен ген *BRAF*, образуются слитные белки, изменяющие эффективность применения таргетных препаратов [12].

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ МЕЛАНОМЫ КОЖИ

Молекулярные механизмы развития меланомы кожи крайне гетерогенны и связаны с вовлеченностью большого количества регуляторных факторов. К ним относят гиперактивацию сигнального каскада RAS-MAPK, опосредованного наличием генетических мутаций его компонентов, а также биологические особенности универсальных путей программируемой гибели клетки и аутофагии [13].

Гиперактивация сигнального пути RAS-MAPK наблюдается в 90 % случаев МК. В нормальной клетке этот сигнал стимулируется митогенами, гормонами или нейротрансмиттерами, связывающимися с тирозин-киназными рецепторами, которые димеризуются и активируют ГТФазу RAS. В результате в клетке увеличивается уровень активной формы нуклеотид-связывающего белка RAS [22]. Он запускает активацию MAPK-каскада серин/треонин киназ RAF, MEK1/2 и ERK1/2. Последние регулируют экспрессию генов, вовлеченных в клеточную пролиферацию, дифференцировку и выживание, путем фосфорилирования транскрипционных факторов, например, ETS, ELK-1, MYC, или опосредованно влияют на такие молекулы, как p90-RSK.

В настоящее время все большее значение приобретает изучение процесса аутофагии, который обуславливает не только гибель поврежденных клеток, но и их сохранение. С одной стороны, аутофагия препятствует накоплению токсичных клеточных компонентов,

тем самым отрицательно влияя на онкогенез, с другой стороны, на поздних стадиях развития опухолей, таких как меланома, она способствует ее выживанию в условиях гипоксии и дефицита питательных веществ [23].

Интересно, что мутационный статус гена *BRAF* при меланоме по-разному влияет на аутофагию. Так, по данным исследований, проводимых на мышах, было обнаружено, что она способствует росту данной опухоли при наличии мутации *BRAF* [24]. В то же время отмечено, что аутофагия подавляет онкогенез у пациентов с *BRAF*-положительной МК [25]. При лечении пациентов с меланомой высокоспецифическими ингибиторами *BRAF* аутофагия последовательно индуцировалась [26]. Было выдвинуто предположение, что она способствует развитию резистентности опухолевых клеток при лечении ингибиторами *BRAF* [25]. Следовательно, ингибирование процессов аутофагии может стать ключевым моментом в терапии пациентов с МК.

Аутофагия регулируется сложным сигнальным каскадом, который включает в себя убиквитиноподобные системы конъюгации, регуляторные белки аутофагии и инактивацию мишени рапамицина млекопитающих (mammalian target of rapamycin, mTOR) [27].

На сегодняшний день LC3 и Beclin 1 относят к потенциальным прогностическим биомаркерам меланомы. При индукции аутофагии LC3 конъюгируется с фосфатидилэтаноламином (PE) и образует мембраносвязанную форму LC3-II [28]. Повышенная иммуногистохимическая экспрессия LC3 показана при злокачественных меланоммах по сравнению с доброкачественными невусами [29] и связана с метастазированием опухоли и худшими исходами [30]. Хотя экспрессия LC3 является показателем статуса аутофагии при меланоме, важно отметить, что превращение LC3-I в LC3-II является динамическим процессом, что ограничивает возможность рассмотрения эндогенной экспрессии LC3 в качестве точного биомаркера статуса аутофагии [31].

Исследования показали, что у пациентов с низкой экспрессией Beclin 1 наблюдается высокий риск образования отдаленных метастазов [27, 30]. В то же время имеются противоречивые данные о сверхэкспрессии данного белка при прогрессировании меланомы, что ставит под сомнение его значимость как надежного прогностического биомаркера [29].

Не менее значимой в процессе аутофагии является секвестосома 1/SQSTM1 (p62). Она представляет собой каркасный белок, который переносит убиквитинированные белки в аутофагосому и разрушается вместе с другим ее содержимым при слиянии с лизосомой. Таким образом, нарушение аутофагии связано с накоплением p62 и является ключевым моментом начала опухолеобразования [32]. И наоборот, низкий уровень p62 характерен для реактивации аутофагии, которая наблюдается при меланоммах поздних стадий и способствует повышению выживаемости опухоли.

Установлено, что постепенное увеличение экспрессии p62 характерно для меланомы ранней стадии, но впоследствии уровень данного белка снижается при прогрессировании опухоли и ее метастазировании, что согласуется с реактивацией аутофагии и ее парадоксальной ролью при меланоме [32]. Помимо этого, показано значительное повышение риска метастазирования при опухолях T2N0M0 стадии с низкой экспрессией p62 по сравнению с опухолями с его высокой экспрессией [33]. Более того, не выявлено никакой связи p62 с глубиной инвазии (по Бреслоу) или изъязвлением опухоли. В совокупности эти данные подчеркивают, что p62 является новым независимым прогностическим биомаркером меланом, который дает возможность осуществить более раннее терапевтическое вмешательство и снизить риск прогрессирования заболевания [27].

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МАРКЕРЫ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ МЕЛАНОМ КОЖИ

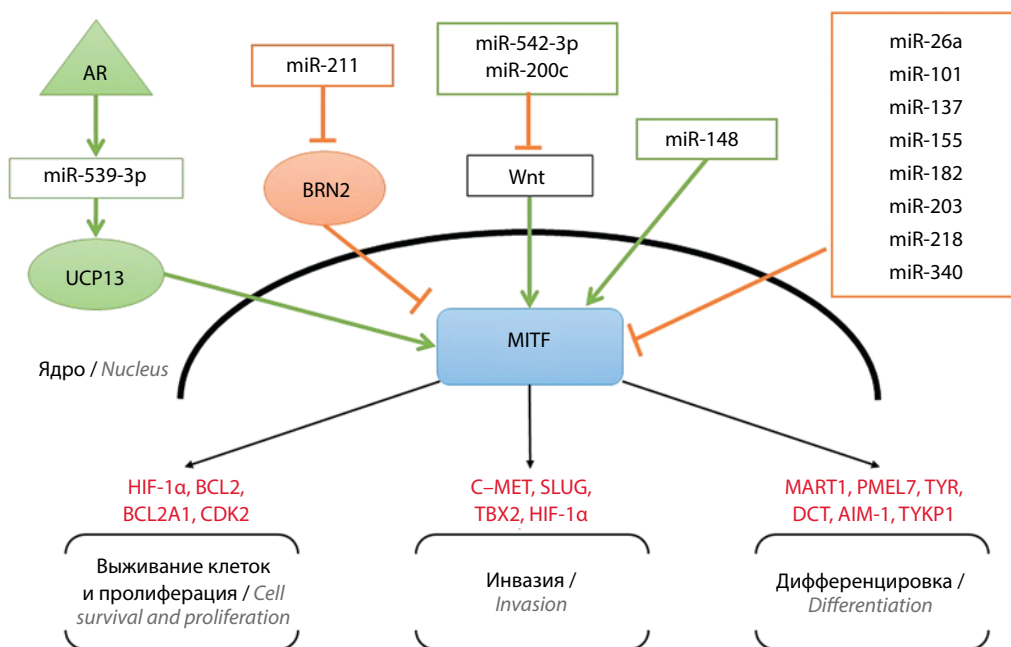
Как и при многих видах рака, ранняя диагностика и соответствующее лечение в значительной степени определяют прогноз и выживаемость пациентов с МК и слизистых. Поэтому в настоящее время особый интерес вызывает открытие прогностических биомаркеров, в роли которых могут выступать любые диагностические показатели, позволяющие выявить заболевание или оценить риски его возникновения. Определение биомаркеров поможет стратифицировать пациентов при установлении первоначального диагноза в зависимости от возможных исходов заболевания, а также выделить группы высокого риска прогрессирования меланомы для раннего начала адъю-

вантной терапии с целью предотвращения развития метастазов.

Стоит отметить, что собрано много данных об особенностях регуляции процесса онкогенеза при развитии меланомы микроРНК (miRNA) и длинными некодирующими РНК (lncRNA). Одним из ключевых механизмов возникновения меланом является активация MITF. Он представляет собой главный регулятор не только дифференцировки, пролиферации и выживаемости меланоцитов, но и меланомогенеза [34]. Описаны несколько видов микроРНК, которые участвуют в его регуляции (см. рисунок).

Так, давно известен факт, что miRNA-148 и miRNA-137 представляют собой дополнительный подход в регуляции экспрессии фактора MITF в меланоцитах и клетках меланомы [35, 36]. В клеточных линиях меланомы, а также в образцах тканей часто амплифицируется и активируется miRNA-182 [37]. Замечено, что сверхэкспрессия этой микроРНК стимулирует миграцию и выживание клеток меланомы путем прямого подавления экспрессии MITF и FOXO3 (forkhead box O3). Также, помимо MITF, miRNA-182 подавляет экспрессию BCL2, циклина D2 и функционирует как мощный опухолевый супрессор в клетках увеальной меланомы [38].

Известно, что miRNA-218 путем связывания с 3'-нетранслируемой областью (3'-UTR) матричной РНК (мРНК) снижает синтез белка MITF, продукцию тирозиназы и стимулирует меланогенез кожи. Аналогично miRNA-340 за счет взаимодействия с двумя сайтами-мишенями на мРНК MITF 3'-UTR приводит к ее деградации, с последующим снижением синтеза соответствующего белка [37].



МикроРНК, способные регулировать меланоцит-индуцирующий транскрипционный фактор (MITF). HIF-1α — фактор, индуцируемый гипоксией 1-α
MicroRNA capable of regulating melanocyte inducing transcription factor (MITF). HIF-1α — hypoxia-inducible factor 1-α

Кроме того, продемонстрировано, что miRNA-26a и miRNA-101 способны ингибировать инвазию и пролиферацию клеток меланомы, нацеливаясь на MITF [37], а miRNA-26 значительно замедляет рост опухолей меланомы *in vivo* [39]. При этом изменение экспрессии MITF не связано с особенностями агрессивного роста меланом и невусов. Также показано, что miRNA-203 является распространенной опухоле-супрессивной микроРНК при меланоме [40].

Интересным является тот факт, что изменение транскрипционной активности генов-мишеней miRNA-211, таких как *APIS2*, *SOX11*, *IGFBP5* и *SERINC3*, способно усиливать инвазивные свойства опухоли [41]. Отмечают, что более низкие уровни miRNA-211 наблюдались в высокоинвазивных клеточных линиях меланомы по сравнению с менее инвазивными. Продemonстрировано, что miRNA-211 ингибирует миграцию и инвазию клеток меланомы [37]. Она также индуцирует потерю клеточной адгезии путем прямой регуляции мРНК NUAК1 — киназы, связанной с АМФ-активируемой протеинкиназой, которая экспрессируется при многих видах рака [42]. Кроме того, miRNA-211 играет большую роль в регуляции POU3F2 — фактора транскрипции домена POU, более известного как BRN2, хорошо зарекомендовавшего себя репрессора MITF, что позволяет предположить дальнейшее косвенное влияние miRNA-211 на развитие метастазирования меланомы [37].

Обнаружено, что некоторые микроРНК играют роль в эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП). Так, miR-200с, хорошо зарекомендовавшая себя как центральный регулятор ЭМП, оказалась полезной в его ингибировании при экспериментальной вакцинации против меланомы [37].

Аналогичным образом miR-542-3p является другим ключевым регулятором ЭМП. Обнаружено, что уровень miR-542-3p в клетках меланомы сильно снижен по сравнению со здоровыми клетками. Дополнительное введение miR-542-3p ингибировало ЭМП и образование метастазов, вероятно, путем трансляционного ингибирования фактора PIM1 — хорошо известного промотора роста и распространения рака [37].

Показано, что подавление изоформы MITF MITF-M воспалительными стимулами частично обусловлено усилением регуляции miRNA-155. Так, данная микроРНК модулировала индуцированное интерлейкином-1β (IL-1β) подавление экспрессии MITF-M в клетках меланомы. Это может представлять собой новый механизм выхода меланомы из-под иммунного надзора в воспалительной микросреде [43].

Обнаружено, что у пациентов с AR-положительной меланомой (AR — рецептор андрогена) показатели выживаемости были хуже по сравнению с больными AR-отрицательной меланомой. Это объясняют тем, что AR может способствовать метастазированию меланомы через изменение сигнала miRNA-539-3p/USP13/MITF/AXL [44].

Известно, что MITF является основным регулятором развития меланоцитов и критическим фактором в меланомогенезе. Меланоцит-индуцирующий транскрипционный фактор и связанные с ним транскрипционные факторы TFEB и TFE3 играют большую роль в регуляции реакции аутофагии, вызванной голоданием, при меланоме [45].

Помимо этого, по данным интегративного анализа прогноз пациентов с метастатической МК связан с аномальной экспрессией 5 lncRNA, 7 mRNA, а также 5 miRNA (табл. 1, 2) [46]. Так, высокие уровни экспрессии мРНК CCR9 (рецептора бета-хемокинов) и CNR2 (связанного с G-белком рецептора, GPCR) положительно коррелировали с улучшением показателей выживаемости пациентов с метастатической меланомой. В то же время в тканях метастатической меланомы выявлены низкие уровни экспрессии ESRP2 (РНК-связывающего белка hnRNP) и DIRAS2, которые положительно коррелировали с увеличением показателей выживаемости больных [46].

Обнаружено, что дифференциально экспрессируемые miRNA, такие как miRNA-29с, -100, -142-3p, -150 и -516a-2, были активированы в тканях метастатической меланомы и положительно коррелировали с улучшением показателей выживаемости пациентов. Это указывает на то, что они могут быть ингибирующими факторами метастазирования меланомы [46].

Также у пациентов с метастатической меланомой выявлены 6 дифференциально экспрессируемых lncRNA: AC068594.1, C7orf71, FAM41C, GPC5-AS1, MUC19 и LINC00402. Высокие уровни экспрессии lncRNAs C068594.1 и C7orf71, которые были подавлены при метастатической меланоме, положительно коррелировали с высокими показателями выживаемости. При этом у пациентов с более низкими уровнями экспрессии lncRNA FAM41C наблюдались более высокие показатели выживаемости. Более низкая экспрессия GPC5-AS1 MUC19, которые активировались при метастатической меланоме, и повышенная экспрессия LINC00402 связаны с улучшением показателей выживаемости больных [46].

Кроме того, показано, что KCNQ1OT1 — длинная некодирующая РНК — способна активировать взаимодействие через путь miR-34a/STAT3, способствуя пролиферации, миграции и инвазии клеток меланомы, в том числе их уходу от иммунного надзора [47]. Другая lncRNA — MSC-AS1 — способствует пролиферации клеток меланомы, активируя путь miR-330-3p/YAP1 [48]. При этом показана роль SNHG16-hsa-let-7b-5p-TUBB4A в прогрессировании МК путем модуляции функции митохондрий, влияющей на клеточный метаболизм [49].

Относительно недавно был идентифицирован новый тип lncRNA — BASP1-AS1. Эта lncRNA может способствовать развитию меланомы как *in vivo*, так и *in vitro*. Она активирует пролиферацию, инвазию и миграцию клеток меланомы, регулируя YBX1, и является неблагоприятным

Таблица 1. МикроРНК (miRNA) и их функции
Table 1. MicroRNAs (miRNAs) and their functions

miRNA	Функция Function	Источник Source
miRNA-26a	Ингибирует инвазию и пролиферацию клеток меланомы, изменяя продукцию меланоцит-индуцирующего транскрипционного фактора (MITF) Inhibits melanoma cell invasion and proliferation altering production of melanocyte inducing transcription factor (MITF)	[39]
miRNA-29c	Регулирует факторы транскрипции. Представители группы miRNA-29 могут действовать и как гены-супрессоры, и как гены-индукторы опухолей Regulates transcription factors. Members of miRNA-29 group can serve both as suppressor genes and as tumor inducer genes	[46]
miRNA-100	Ингибирует метастазирование меланомы Inhibits melanoma metastases	[46]
miRNA-101	Ингибирует инвазию и пролиферацию клеток меланомы через MITF Inhibits melanoma cell invasion and proliferation through MITF	[37]
miR-137	Снижает экспрессию MITF в клетках меланомы Decreases MITF expression in melanoma cells	[36]
miR-142-3p	Ингибирует метастазирование меланомы Inhibits melanoma metastases	[46]
miR-148	Снижает экспрессию MITF в клетках меланомы Decreases MITF expression in melanoma cells	[35]
miR-150	Ингибирует метастазирование меланомы Inhibits melanoma metastases	[46]
miR-155	Подавляет продукцию изоформы MITF MITF-M Suppresses production of MITF isoform MITF-M	[43]
miR-182	Снижает продукцию MITF, BCL2 и циклина D2 Decreases MITF, BCL2 and cyclin D2 production	[37, 38]
miR-200c	Выступает центральным регулятором эпителиально-мезенхимального перехода при различных видах рака Serves as the central regulator of epithelial-mesenchymal transition in various cancers	[37]
miR-203	Снижает экспрессию MITF в клетках меланомы Decreases MITF expression in melanoma cells	[40]
miR-211	Ингибирует миграцию и инвазию клеток меланомы, регулирует экспрессию MITF через BRN2 Inhibits melanoma cell migration and invasion, regulates MITF expression through BRN2	[37, 42]
miR-218	Ингибирует миграцию и инвазию клеток меланомы. Подавляет экспрессию MITF. Блокирует синтез тирозиназы и стимулирует меланогенез кожи Inhibits melanoma cell migration and invasion. Suppresses MITF expression. Blocks production of tyrosine kinase and stimulates skin melanogenesis	[37]
miRNA-340	Снижает экспрессию MITF Decreases MITF expression	[37]
miR-516a-2	Ингибирует метастазирование меланомы Inhibits melanoma metastases	[46]
miRNA-539-3p	Способствует метастазированию меланомы Promotes melanoma metastases	[44]
miRNA-542-3p	Ингибирует эпителиально-мезенхимальный переход путем трансляционного ингибирования фактора PIM1 Inhibits epithelial-mesenchymal transition through translational inhibition of PIM1 factor	[37]

Таблица 2. Длинные некодирующие РНК (lncRNA) и их функции
Table 2. Long-noncoding RNAs (lncRNAs) and their functions

lncRNA	Функция Function	Источник Source
AC068594.1	Высокие уровни экспрессии положительно коррелируют с увеличением показателей выживаемости High expression levels positively correlate with survival rates	[46]
C7orf71	Высокие уровни экспрессии положительно коррелируют с увеличением показателей выживаемости High expression levels positively correlate with survival rates	[46]
FAM41C	Низкие уровни экспрессии положительно коррелируют с увеличением показателей выживаемости Low expression levels positively correlate with survival rates	[46]
GPC5-AS1	Низкие уровни экспрессии положительно коррелируют с увеличением показателей выживаемости Low expression levels positively correlate with survival rates	[46]
MUC19	Низкие уровни экспрессии положительно коррелируют с увеличением показателей выживаемости Low expression levels positively correlate with survival rates	[46]
LINC00402	Высокие уровни экспрессии положительно коррелируют с увеличением показателей выживаемости High expression levels positively correlate with survival rates	[46]
KCNQ1OT1	Способствует пролиферации, миграции и инвазии клеток меланомы через miR-34a/STAT3 Promotes melanoma cell proliferation, migration and invasion through miR-34a/STAT3	[47]
MSC-AS1	Способствует пролиферации клеток меланомы, активируя путь miR-330-3p/YAP1 Promotes melanoma cell proliferation through activation of the miR-330-3p/YAP1 pathway	[48]
TUBB4A	Модулирует функции митохондрий, влияющие на клеточный метаболизм через ось SNHG16-hsa-let-7b-5p-TUBB4A Modulates mitochondria functions affecting cell metabolism through the SNHG16-hsa-let-7b-5p-TUBB4A axis	[49]
BASP1-AS1	Способствует пролиферации, инвазии и миграции клеток меланомы через регуляцию YBX1 Promotes melanoma cell proliferation, invasion and migration through YBX1 regulation	[50]

прогностическим показателем и потенциальной терапевтической мишенью при меланоме [50].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, эпидемиологические особенности распространенности МК и слизистых, особенности диагностики этой опухоли и персонифицированного лечения являются актуальными проблемами практической онкологии. При выборе индивидуализированной тактики лечения данной категории пациентов необходимо учитывать значение сигнального каскада MAPK и наличие ключевой мутации гена *BRAF*. Невысокая эффективность терапии и развитие резистентных форм

опухоли привели к активному изучению других онкогенных механизмов, например аутофагии. В настоящий момент становится понятным, что гетерогенность МК и активация других значимых онкогенных механизмов являются причинами низкой результативности лечебных мероприятий. Стоит отметить, что возможность регуляции биологических процессов в развитии меланомы с помощью значимых молекулярных факторов, в частности при участии фактора MITF, а также малых и длинных некодирующих РНК, является более перспективным направлением, чем иммунная и таргетная терапия и классические схемы полихимиотерапии.

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

1. Уфимцева М.А., Шубина А.С., Струин Н.Л. и др. Алгоритм оказания медико-профилактической помощи пациентам групп риска по развитию злокачественных опухолей кожи. *Здравоохранение Российской Федерации* 2017;61(5):257–62. DOI: 10.18821/0044-197X-2017-61-5-257-262
2. Ufimtseva M.A., Shubina A.S., Struin N.L. et al. The algorithm of providing medical preventive care of patients of risk group of development of malignant tumors of skin. *Zdravookhranenie Rossiiskoi Federatsii = Healthcare of the Russian Federation* 2017;61(5):257–62. (In Russ.). DOI: 10.18821/0044-197X-2017-61-5-257-262
3. Saginala K., Barsouk A., Aluru J.S. et al. Epidemiology of melanoma. *Med Sci (Basel)* 2021;9(4):63. DOI: 10.3390/medsci9040063
4. Рыбкина В.Л., Азизова Т.В., Адамова Г.В. Факторы риска развития злокачественных новообразований кожи. *Клиническая дерматология и венерология* 2019;18(5):548–55. DOI: 10.17116/klinderma201918051548
5. Rybkina V.L., Azizova T.V., Adamova G.V. Risk factors of malignant neoplasms of the skin. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya = Russian Journal of Clinical Dermatology and Venereology* 2019;18(5): 548–55. (In Russ.). DOI: 10.17116/klinderma201918051548
6. Karimkhani C., Green A.C., Nijsten T. et al. The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015. *Br J Dermatol* 2017;177(1):134–40. DOI: 10.1111/bjd.15510
7. Abrahamian C., Grimm C. Endolysosomal cation channels and MITF in melanocytes and melanom. *Biomolecules* 2021;11(7):1021. DOI: 10.3390/biom11071021
8. Fesenko D.O., Abramov I.S., Shershov V.E. et al. Multiplex assay to evaluate the genetic risk of developing human melanoma. *Mol Biol (Mosk)* 2018;52(6):997–1005. DOI: 10.1134/S0026898418060071
9. Sabag N., Yakobson A., Retchkiman M. et al. Novel biomarkers and therapeutic targets for melanoma. *Int J Mol Sci* 2022;23(19):11656. DOI: 10.3390/ijms231911656
10. Newton-Bishop J., Bishop D.T., Harland M. Melanoma genomics. *Acta Derm Venereol* 2020;100(11):adv00138. DOI: 10.2340/00015555-3493
11. Lavoie H., Sahmi M., Maisonneuve P. et al. MEK drives BRAF activation through allosteric control of KSR proteins. *Nature* 2018;554(7693):549–53. DOI: 10.1038/nature25478
12. Lattmann E., Levesque M.P. The role of extracellular vesicles in melanoma progression. *Cancers (Basel)* 2022;14(13):3086. DOI: 10.3390/cancers14133086
13. Thatikonda S., Pooladanda V., Tokala R. et al. Niclosamide inhibits epithelial-mesenchymal transition with apoptosis induction in BRAF/ NRAS mutated metastatic melanoma cells. *Toxicol In Vitro* 2023;89:105579. DOI: 10.1016/j.tiv.2023.105579
14. Liu L., Wu Y., Bian C. et al. Heme oxygenase 1 facilitates cell proliferation via the B-Raf-ERK signaling pathway in melanoma. *Cell Commun Signal* 2019;17(1):3. DOI: 10.1186/s12964-018-0313-3
15. Zhao J., Benton S., Zhang B. et al. Benign and intermediate-grade melanocytic tumors with BRAF mutations and spitzoid morphology: a subset of melanocytic neoplasms distinct from melanoma. *Am J Surg Pathol* 2022;46(4):476–85. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001831
16. Berwick M., Buller D.B., Cust A. et al. Melanoma epidemiology and prevention. *Cancer Treat Res* 2016;167:17–49. DOI: 10.1007/978-3-319-22539-5_2
17. Grigalavicius M., Moan J., Dahlback A. et al. Daily, seasonal, and latitudinal variations in solar ultraviolet A and B radiation in relation to vitamin D production and risk for skin cancer. *Int J Dermatol* 2016;55(1):23–8. DOI: 10.1111/ijd.13065
18. D'Ecclesiis O., Caini S., Martinoli C. et al. Gender-dependent specificities in cutaneous melanoma predisposition, risk factors, somatic mutations, prognostic and predictive factors: a systematic review. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18(15):7945. DOI: 10.3390/ijerph18157945
19. Leonardi G.C., Falzone L., Salemi R. et al. Cutaneous melanoma: from pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol* 2018;52(4):1071–80. DOI: 10.3892/ijo.2018.4287
20. Timár J., Ladányi A. Molecular pathology of skin melanoma: epidemiology, differential diagnostics, prognosis and therapy prediction. *Int J Mol Sci* 2022;23(10):5384. DOI: 10.3390/ijms23105384
21. Vizkeleti J., Doma L., Barbai V. et al. Genetic progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2016;35(1):93–107. DOI: 10.1007/s10555-016-9613-5
22. Soura E., Eliades P.J., Shannon K. et al. Hereditary melanoma: update on syndromes and management: genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome. *J Am Acad Dermatol* 2016;74(3):395–410. DOI: 10.1016/j.jaad.2015.08.038
23. Wang L., Lu A.P., Yu Z.L. et al. The melanogenesis-inhibitory effect and the percutaneous formulation of ginsenoside Rb1. *AAPS PharmSciTech* 2014;15(5):1252–62. DOI: 10.1208/s12249-014-0138-3
24. Liu J., Zhang C., Wang J. et al. The regulation of ferroptosis by tumor suppressor p53 and its pathway. *Int J Mol Sci* 2020;21(21):8387. DOI: 10.3390/ijms21218387
25. Xie X., Koh J.Y., Price S. et al. Atg7 overcomes senescence and promotes growth of BRAFV600E-driven melanoma. *Cancer Discov* 2015;5(4):410–23. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-1473
26. Liu H., He Z., Simon H.U. Autophagy suppresses melanoma tumorigenesis by inducing senescence. *Autophagy* 2014;10(2):372–3. DOI: 10.4161/auto.27163
27. Li S., Song Y., Quach C. et al. Transcriptional regulation of autophagy-lysosomal function in BRAF-driven melanoma progression and chemoresistance. *Nat Commun* 2019;10(1):1693. DOI: 10.1038/s41467-019-09634-8
28. Mei X.L., Wei F.L., Jia L.L. et al. An alternative pathway for cellular protection in BRAF inhibitor resistance in aggressive melanoma type skin cancer. *Chem Biol Interact* 2020;323:109061. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109061
29. Tang D.Y., Ellis R.A., Lovat P.E. Prognostic impact of autophagy biomarkers for cutaneous melanoma. *Front Oncol* 2016;6:236. DOI: 10.3389/fonc.2016.00236
30. Ramkumar A., Murthy D., Raja D.A. et al. Classical autophagy proteins LC3B and ATG4B facilitate melanosome movement on cytoskeletal tracks. *Autophagy* 2017;13(8):1331–47. DOI: 10.1080/15548627.2017.1327509
31. Chen M., Li Q., Chen W. et al. Diagnostic and prognostic value of Beclin 1 expression in melanoma: a meta-analysis. *Melanoma Res* 2021;31(6):541–9. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000780
32. Oliveira R.D., Celeiro S.P., Barbosa-Matos C. et al. Portuguese propolis antitumoral activity in melanoma involves ROS production and induction of apoptosis. *Molecules* 2022;27(11):3533. DOI: 10.3390/molecules27113533
33. Teixido C., Castillo P., Martinez-Vila C. et al. Molecular markers and targets in melanoma. *Cells* 2021;10(9):2320. DOI: 10.3390/cells10092320
34. Ellis R.A., Horswell S., Ness T. et al. Prognostic impact of p62 expression in cutaneous malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2014;134(5):1476–8. DOI: 10.1038/jid.2013.497
35. Armstrong J.L., Hill D.S., McKee C.S. et al. Exploiting cannabinoid-induced cytotoxic autophagy to drive melanoma cell death. *J Invest Dermatol* 2015;135(6):1629–37. DOI: 10.1038/jid.2015.45
36. Simmons J.L., Pierce C.J., Al-Ejeh F. et al. MITF and BRN2 contribute to metastatic growth after dissemination of melanoma. *Sci Rep* 2017;7(1):10909. DOI: 10.1038/s41598-017-11366-y

34. Mirzaei H., Gholamin S., Shahidsales S. et al. MicroRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *Eur J Cancer* 2016;53:25–32. DOI: 10.1016/j.ejca.2015.10.009
35. Qi J., Wang W.W., Chen W. et al. Mechanism of miR-137 regulating migration and invasion of melanoma cells by targeting PIK3R3 gene. *J Cell Biochem* 2019;120(5):8393–400. DOI: 10.1002/jcb.28124
36. Varrone F., Caputo E. The miRNAs role in melanoma and in its resistance to therapy. *Int J Mol Sci* 2020;21(3):878. DOI: 10.3390/ijms21030878
37. Liu X., Li H., Wu G. et al. miR-182 promotes cell proliferation and invasion by inhibiting APC in melanoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11(4):1900–8.
38. Qian H., Yang C., Yang Y. MicroRNA-26a inhibits the growth and invasiveness of malignant melanoma and directly targets on *MITF* gene. *Cell Death Discov* 2017;3:17028. DOI: 10.1038/cddiscovery.2017.28
39. Noguchi S., Kumazaki M., Mori T. et al. Analysis of microRNA-203 function in CREB/MITF/RAB27a pathway: comparison between canine and human melanoma cells. *Vet Comp Oncol* 2016;14(4):384–94. DOI: 10.1111/vco.12118
40. Margue C., Philippidou D., Reinsbach S.E. et al. New target genes of MITF-induced microRNA-211 contribute to melanoma cell invasion. *PLoS One* 2013;8(9):e73473. DOI: 10.1371/journal.pone.0073473
41. Bell R.E., Khaled M., Netanel D. et al. Transcription factor/microRNA axis blocks melanoma invasion program by miR-211 targeting NUA1. *J Invest Dermatol* 2014;134(2):441–51. DOI: 10.1038/jid.2013.340
42. Arts N., Cané S., Hennequart M. et al. microRNA-155, induced by interleukin-1 β , represses the expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF-M) in melanoma cells. *PLoS One* 2015;10(4):e0122517. DOI: 10.1371/journal.pone.0122517
43. Wang Y., Ou Z., Sun Y. et al. Androgen receptor promotes melanoma metastasis via altering the miRNA-539-3p/USP13/MITF/AXL signals. *Oncogene* 2017;36(12):1644–54. DOI: 10.1038/onc.2016.330
44. Möller K., Sigurbjörnsdóttir S., Arnthorsson A.O. et al. MITF has a central role in regulating starvation-induced autophagy in melanoma. *Sci Rep* 2019;9(1):1055. DOI: 10.1038/s41598-018-37522-6
45. Wang L.X., Wan C., Dong Z.B. et al. Integrative analysis of long noncoding RNA (lncRNA), microRNA (miRNA) and mRNA expression and construction of a competing endogenous RNA (ceRNA) Network in Metastatic Melanoma. *Med Sci Monit* 2019;25:2896–907. DOI: 10.12659/MSM.913881
46. Wang X., Ren Z., Xu Y. et al. KCNQ10T1 sponges miR-34a to promote malignant progression of malignant melanoma via upregulation of the STAT3/PD-L1 axis. *Environ Toxicol* 2023;38(2):368–80. DOI: 10.1002/tox.23687
47. Tian T., Luo B., Shen G. et al. LncRNA MSC-AS1, as an oncogene in melanoma, promotes the proliferation and glutaminolysis by regulating the miR-330-3p/YAP1 axis. *Anticancer Drugs* 2022;33(10):1012–23. DOI: 10.1097/CAD.0000000000001390
48. Chen G., Yan J. Dysregulation of SNHG16(lncRNA)-Hsa-Let-7b-5p(miRNA)-TUBB4A (mRNA) pathway fuels progression of skin cutaneous melanoma. *Curr Protein Pept Sci* 2022; 23(11):791–809. DOI: 10.2174/1389201023666220928120902
49. Li Y., Gao Y., Niu X. et al. LncRNA BASP1-AS1 interacts with YBX1 to regulate Notch transcription and drives the malignancy of melanoma. *Cancer Sci* 2021;112(11):4526–42. DOI: 10.1111/cas.15140

Вклад авторов

В.А. Богданова: написание текста статьи;

Л.В. Спирина, С.Ю. Чижевская: научное редактирование;

И.В. Ковалева, К.В. Никульников: сбор, анализ и интерпретация данных литературы.

Authors' contribution

V.A. Bogdanova: article writing;

L.V. Spirina, S.Yu. Chizhevskaya: scientific editing;

I.V. Kovaleva, K.V. Nikulnikov: collection, analysis and interpretation of literature data.

ORCID авторов / ORCID authors

В.А. Богданова / V.A. Bogdanova: <https://orcid.org/0009-0003-8473-4182>

С.Л. Спирина / L.V. Spirina: <https://orcid.org/0000-0002-5269-736X>

С.Ю. Чижевская / S.Yu. Chizhevskaya: <https://orcid.org/0000-0003-2974-4778>

И.В. Ковалева / I.V. Kovaleva: <https://orcid.org/0000-0003-2964-9041>

К.В. Никульников / K.V. Nikulnikov: <https://orcid.org/0009-0004-7211-7686>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 18.07.2023. **Принята к публикации:** 01.02.2024.

Article submitted: 18.07.2023. **Accepted for publication:** 01.02.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-31-45>

Применение Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR-T) в комбинации с химио- и лучевой терапией для лечения солидных опухолей

М.Р. Халиулин¹, Р.Н. Сафин², М.А. Кунст³, Э.Р. Булатов^{1,4}

¹ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18;

²ГАОУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер Минздрава Республики Татарстан им. проф. М.З. Сигала»; Россия, 420029 Казань, ул. Сибирский тракт, 29;

³ГАОУЗ «Республиканская клиническая больница» Минздрава Республики Татарстан; Россия, 420064 Казань, ул. Оренбургский тракт, 138;

⁴ГНЦ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук»; Россия, 117997 Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Контакты: Эмиль Рафаэлевич Булатов bulatovemil@gmail.com

Терапия онкогематологических заболеваний на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (chimeric antigen receptor, CAR) открыла новую эру в борьбе с раком крови. Результаты применения клеточной терапии оказались настолько перспективными, что на рынке уже появились 7 коммерческих препаратов для ее проведения. Однако CAR-T-терапия при солидных опухолях оказалась не очень эффективной. К тому же возник ряд проблем, таких как антигенная гетерогенность данных опухолей, иммуносупрессивное микроокружение, слабая инфильтрация опухоли иммунными клетками, истощение и снижение пролиферативной активности и цитотоксичности CAR-T-клеток внутри опухоли, ускользание целевого антигена опухоли, токсичность терапии. Для их решения предпринимаются усилия, направленные на совершенствование и улучшение методики лечения солидных опухолей. Химиотерапия является стандартом лечения большого количества злокачественных новообразований. Ее также применяют перед началом клеточной терапии для лимфодеплеции и лучшего приживления вводимых CAR-T-клеток. Показано, что химиотерапия может снижать иммуносупрессивное воздействие опухолевого микроокружения, разрушать строму и способствовать лучшей инфильтрации опухоли CAR-T-клетками, улучшая их выживаемость, персистенцию и цитотоксичность, а также влияя на метаболизм иммунных клеток внутри опухоли. Однако эффективность комбинированного применения ХТ и CAR-T-клеточной терапии зависит от многих факторов: типа опухоли, дозы и схемы лечения, популяции CAR-T-клеток и индивидуальных особенностей организма. Аналогично обстоят дела и с лучевой терапией, которая может как повышать чувствительность опухоли к лечению, так и способствовать выживаемости опухолевых клеток.

В этом обзоре рассматривается применение CAR-T-терапии при солидных опухолях, затрагиваются основные проблемы лечения данных новообразований, пути их решения, а также вопросы возможности использования комбинированного подхода для улучшения эффективности клеточной терапии.

Ключевые слова: адоптивная клеточная терапия, химерный антигенный рецептор, CAR-T-клетка, химиотерапия, солидные опухоли

Для цитирования: Халиулин М.Р., Сафин Р.Н., Кунст М.А., Булатов Э.Р. Применение Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR-T) в комбинации с химио- и лучевой терапией для лечения солидных опухолей. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):31–45. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-31-45>

The use of T-cells with chimeric antigen receptor (CAR-T) in combination with chemotherapy and radiotherapy for the treatment of solid tumors

M.R. Khaliulin¹, R.N. Safin², M.A. Kunst³, E.R. Bulatov^{1,4}

¹Kazan (Volga Region) Federal University; 18 Kremlyovskaya St., Kazan 420008, Russia;

²Republican Clinical Oncology Dispensary named after Prof. M.Z. Sigal, Russia, Siberian Tract, 29, Kazan 410029, Russia;

³Republican Clinical Hospital of the Ministry of Health of the Republic of Tatarstan; 138 Orenburg Tract, Kazan 420064, Republic of Tatarstan, Russia;

⁴Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences; 16/10 Miklukho–Maklay St., GSP-7, Moscow 117997, Russia

Contacts: Emil Rafaelevich Bulatov bulatovemil@gmail.com

The introduction of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy has revolutionized the treatment of hematological diseases, particularly in combating blood cancer. The success of this cell therapy approach has led to the development of approximately seven commercial CAR-T based drugs. However, the application of CAR-T therapy for solid tumors has proven to be less effective due to challenges such as the varied antigens in solid tumors, an immunosuppressive tumor environment, limited immune cell infiltration, reduced CAR-T cell activity and toxicity issues. To solve these problems, scientists are making efforts to improve and improve the methods of treatment of solid tumors. Chemotherapy is the standard treatment for a large number of malignant neoplasms. It is also used before starting cell therapy for lympho-depletion and better engraftment of injected CAR-T cells. It has been shown that chemotherapy can reduce the immunosuppressive effect of the tumor microenvironment, destroy the stroma, and promote better infiltration of the tumor by CAR-T cells, improving their survival, persistence, cytotoxicity, and influencing the metabolism of immune cells inside the tumor. The effectiveness of combining chemotherapy and CAR-T cell therapy relies on various factors such as tumor type, dosage, treatment schedule, CAR-T cell composition, and individual biological traits. Similarly, radiation therapy can enhance tumor cell vulnerability to specific treatments while also supporting tumor cell survival.

In this review, we discuss the use of CAR-T therapy to combat solid tumors, regarding the challenges of treating solid tumors, ways to overcome them, and also touch upon the possibility of using combination treatments to improve the effectiveness of cell therapy.

Keywords: adoptive cell therapy, chimeric antigen receptor, CAR-T cell, chemotherapy, solid tumors

For citation: Khaliulin M.R., Safin R.N., Kunst M.A., Bulatov E.R. The use of T-cells with chimeric antigen receptor (CAR-T) in combination with chemotherapy and radiotherapy for the treatment of solid tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(1):31–45. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-31-45>

ВВЕДЕНИЕ

С развитием науки и технологии появляются новые методы лечения онкологических заболеваний. Постепенно происходит отказ от вредных системных видов воздействия, приводящих к нарушению работы всего организма. Внимание специалистов привлекают более физиологичные, избирательные и эффективные виды терапии. Традиционные методы лечения, такие как хирургия, лучевая (ЛТ) и химиотерапия (ХТ), имеют серьезные недостатки. У многих пациентов с метастатическим или рецидивирующим заболеванием развивается резистентность опухолей к прошлым схемам терапии [1, 2].

Одним из самых перспективных направлений лечения онкологических заболеваний является иммунотерапия, в частности адоптивная клеточная терапия. Ее суть заключается в использовании иммунных клеток человека в борьбе с опухолевыми заболеваниями. Клетки отбираются из крови пациента (аутологичные) или донора (аллогенные) до начала противоопухолевой терапии, генетически перепрограммируются на обнаружение опухолевого антигена, культивируются и вводятся в организм, где они находят и уничтожают опухолевые клетки [3].

Клеточная терапия онкогематологических заболеваний на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (chimeric antigen receptor, CAR) (CAR-T-клеток) показала высокие результаты [3, 4]. Применение анти-CD19- и анти-BCMA-CAR-T-клеток для

лечения В-клеточного лимфобластного лейкоза и В-клеточной лимфомы одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) [5]. Результаты терапии CAR-T-клетками оказались весьма обнадеживающими, и в мире уже зарегистрированы 7 коммерческих препаратов на основе этих клеток: Kymriah (tisagenlecleucel), Yescarta (axicabtagene ciloleucel), Tecartus (brexucabtagene autoleucel), Breyanzi (lisocabtagene maraleucel), Abecma (idecabtagene vicleucel), Carvykti (ciltacabtagene autoleucel) и Carteyva (relmacabtagene).

В настоящее время в мире проходят испытания многочисленных модификаций CAR-T-клеток, нацеленных на CD19, CD20, CD22 и другие антигены [6–8].

Терапия на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором изменила подход к лечению онкогематологических заболеваний, особенно благодаря широким возможностям модификации CAR, который может быть внедрен не только в лимфоциты, но и в другие иммунные клетки, такие как макрофаги и NK-клетки (NK — естественные киллеры) [9–11].

Химерный антигенный рецептор представляет собой сложную структуру на основе Т-клеточного рецептора (TCR). Расположенный на Т-клетке CAR связывается со специфическим антигеном-мишенью на поверхности опухолевой клетки независимым от главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) образом и запускает активацию внутри-

клеточных сигнальных путей, которые инициируют амплификацию CAR-T-клеток, их пролиферацию и механизмы цитотоксического действия [12–14]. Структура CAR представлена на рис. 1.

Современные CAR состоят из 4 основных доменов:

- 1) внеклеточного, содержащего легкие и тяжелые фрагменты моноклонального антитела, представленные одноцепочечным варибельным фрагментом (ScFv) и участвующие в распознавании антигена;
- 2) шарнирного, регулирующего гибкость и стабильность рецептора, а также обеспечивающего связывание вне- и внутриклеточных областей (в основе — спейсеры IgG или CD8);
- 3) трансмембранного, выступающего линкером между шарнирной областью и эндодоменом CAR и влияющего на гибкость и эффективность рецептора (представлен белками 1-го типа CD3 ζ , CD28 и CD8a);
- 4) внутриклеточного, представленного тирозинсодержащим активирующим мотивом иммунорецептора (ITAM), состоящего из основного сигнального доме-

на CD3 ζ или Fc ϵ RI γ , в комбинации с которым используются костимулирующие домены CD28, 4-1BB (CD137) и OX40 (CD134) для повышения эффективности и стабильности CAR. Данный домен запускает каскад реакций, индуцирующий перфорин-гранзим-опосредованный механизм цитотоксичности T-клеток [15].

В настоящее время существуют 5 поколений CAR-T-клеток, различающихся по структуре эндодомена:

- 1-е поколение CAR состоит из одного сигнального домена на основе структуры TCR. Отсутствие костимулирующих сигналов в CAR данного поколения приводит к слабой пролиферации, персистенции и противоопухолевой цитотоксичности [16];
- 2-е поколение CAR имеет костимулирующий домен, способствующий лучшей активации CAR-T-клеток. Этот домен представлен CD28, ICOS, OX40 и 4-1BB, которые увеличивают выработку CAR-клетками интерлейкина-2 (IL-2), что предотвращает их апоптоз, увеличивает пролиферативную и цито-

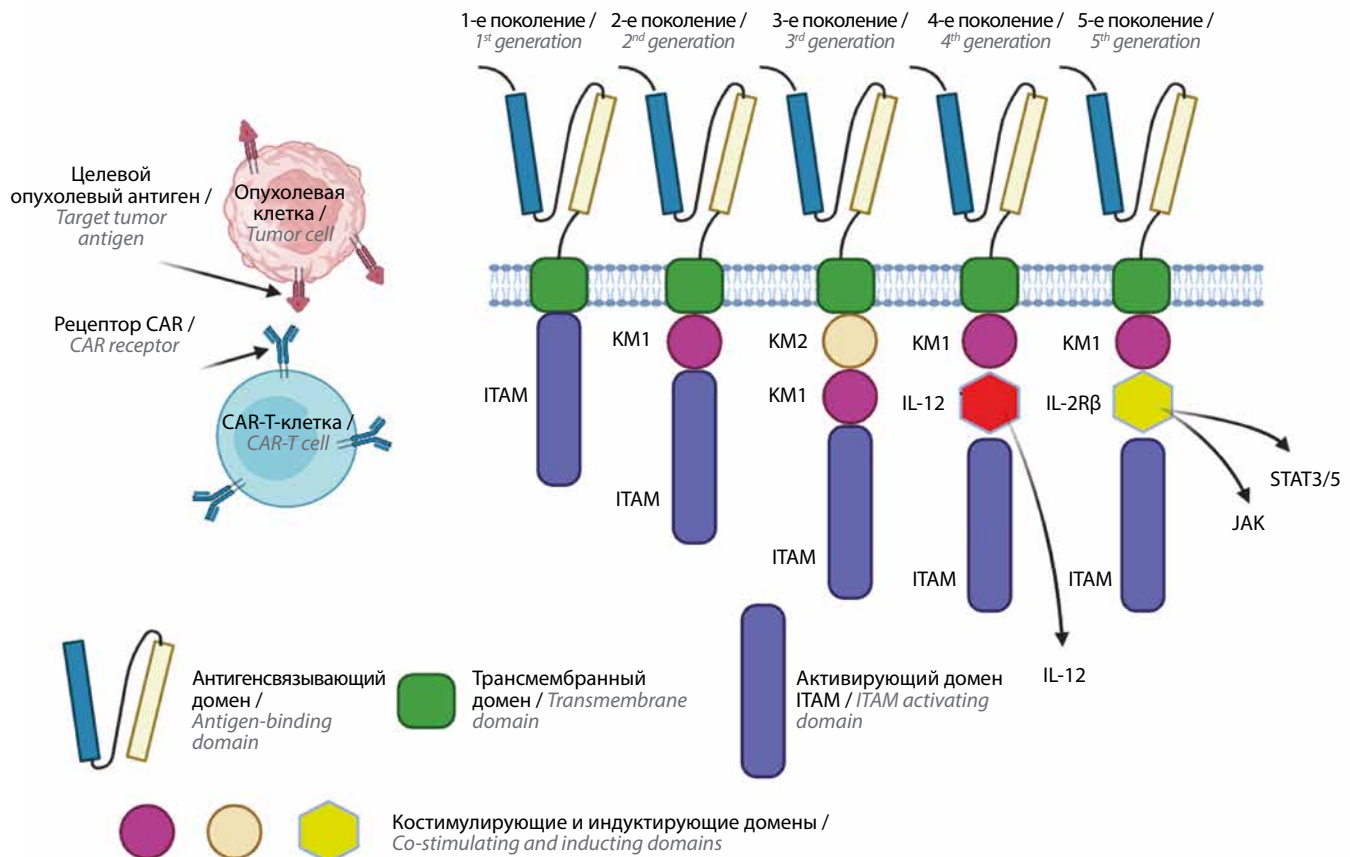


Рис. 1. Структура химерного антигенного рецептора (CAR) различных поколений и взаимодействия T-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR-T) и опухолевой клетки. Рецептор CAR состоит из внеклеточного, внутриклеточного доменов и трансмембранной области. Различные поколения CAR характеризуются в первую очередь наличием дополнительных костимулирующих доменов во внутриклеточном домене. IL-12 — интерлейкин-12; IL-2R β — интерлейкин-2R β ; ITAM — тирозинсодержащий активирующий мотив иммунорецептора

Fig. 1. Representation of the chimeric antigen receptor structure of different principles and the interaction of chimeric antigen receptor (CAR) T- (CAR-T) and tumor cell. The CAR receptor consists of an extracellular domain, a transmembrane region, and an intracellular domain. Different generations of CARs primarily have additional co-stimulatory domains in the intracellular domain. IL-12 — interleukin-12; IL-2R β — interleukin-2R β ; ITAM — immunoreceptor tyrosine-based activation motif

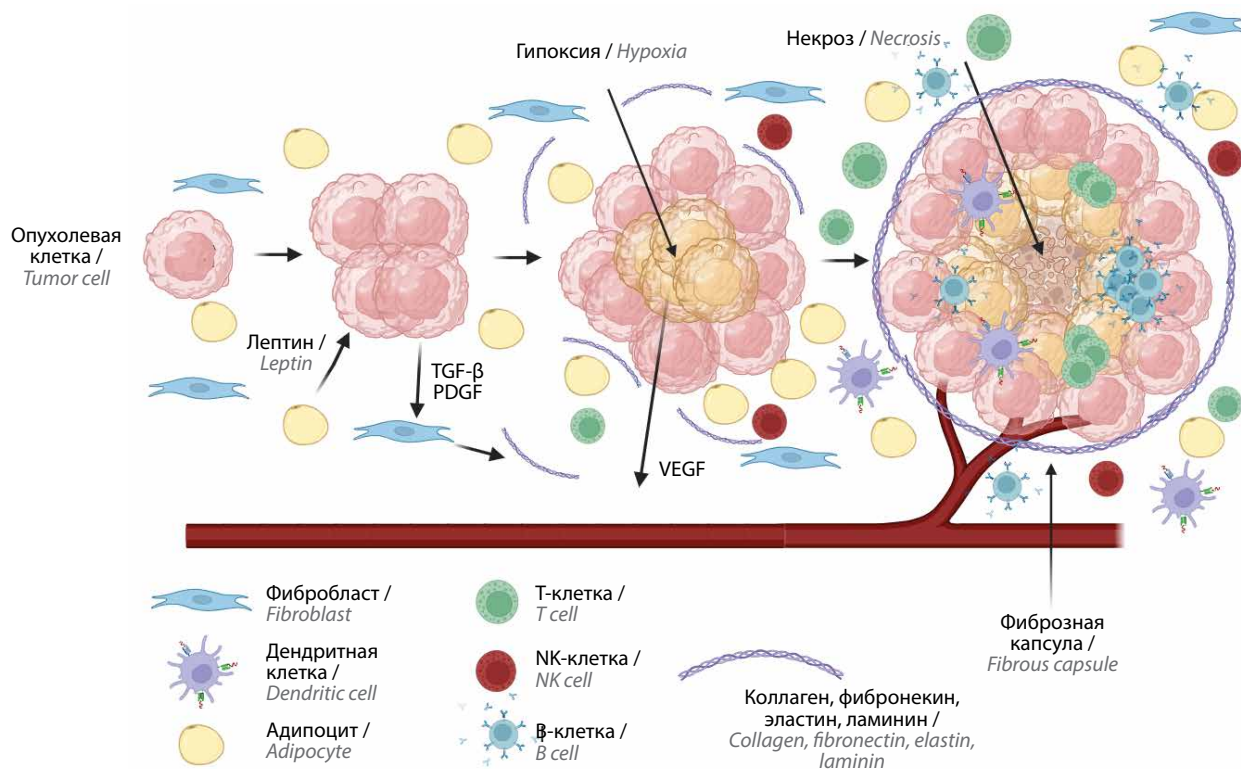


Рис. 2. Процесс роста опухоли. Под действием выделяемых опухолевыми клетками факторов роста происходит выработка фибробластами коллагена, фибронектина и эластина. Данные вещества образуют фиброзную капсулу опухоли, являющуюся физическим барьером для иммунных клеток и затрудняющую их инфильтрацию. По мере роста опухоли в ее центре образуются участки гипоксии и некроза, среда внутри опухолевого очага становится неблагоприятной для иммунных клеток, что приводит к их низкой эффективности и преждевременной гибели. TGF- β — трансформирующий фактор роста β ; PDGF — фактор роста тромбоцитов; VEGF — фактор роста эндотелия сосудов

Fig. 2. Tumor growth process. Under the influence of growth factors secreted by tumor cells, fibroblasts produce collagen, fibronectin, and elastin. These substances form a fibrous capsule of the tumor, which is a physical barrier for immune cells and impedes their infiltration. As the tumor grows, areas of hypoxia and necrosis form in the center, the environment inside the tumor focus becomes unfavorable for immune cells, which leads to their low efficiency and premature death. TGF- β — transforming growth factor β ; PDGF — platelet-derived growth factor; VEGF — vascular endothelial growth factor

токсическую способность по сравнению с CAR 1-го поколения [17];

- 3-е поколение CAR содержит 2 отдельные костимулирующие молекулы (CD28 и 4-1BB), которые еще больше повышают пролиферацию, цитотоксичность и стабильность CAR-T-клеток по сравнению с двумя предыдущими поколениями [18];
- 4-е поколение CAR — клетки, перенаправленные на антигеннеограниченное цитокининицируемое уничтожение (бронированные CAR (TRUCK)). Это поколение CAR характеризуется лучшим противоопухолевым ответом за счет повышенной секреции различных интерлейкинов (IL-7, -12, -15, -21) [19];
- 5-е поколение CAR основано на модификации и добавлении в структуру внутриклеточного домена 2-го поколения CAR фрагментов цепи, отвечающих за активацию дополнительных сигнальных путей. Включение дополнительного домена, отвечающего за экспрессию рецептора IL-2R β , способствует активации сигнального пути JAK-STAT для поддержания еще более выраженного противоопухолевого иммунного ответа [20].

Несмотря на совершенствование конструкции CAR и многообещающие результаты использования CAR-T-терапии в онкогематологии, этот вид терапии при солидных опухолях все еще остается малоэффективным [21]. В настоящее время проводятся клинические исследования CAR-T-клеточных препаратов в лечении данных новообразований (гепатоцеллюлярной карциномы [22], рака легкого [23], желудка [24]) с применением различных модификаций CAR, нацеленных на CEA, EGFR/EGFRvIII (EGFR — рецептор эпидермального фактора роста), GD2, HER2, MSLN, MUC1 и другие антигены. Показано, что терапия нейробластомы анти-GD2- CAR-T-клетками неэффективна; наблюдалось прогрессирование заболевания [25]. Лечение карциномы почки с применением анти-CAIX CAR-T-клеток оказалось малоэффективным: продемонстрировано практически полное отсутствие клинического ответа [26]. Аналогичные данные получены при терапии ретинобластомы анти-CD171-CAR-T-клетками [27], карциномы поджелудочной железы с метастазами анти-EGFR-CAR-T-клетками [28], специфичными к EGFR, рака толстой кишки анти-HER2-CAR-T-клетками [29].

В ходе исследований были выявлены как положительные стороны CAR-T-терапии, так и ее ограничения. Для определения причин низкой эффективности данного метода лечения при солидных опухолях необходимо учитывать различия между гематологическими и солидными опухолями, в первую очередь применительно к их структуре, клеточному составу, механизмам защиты, а также особенности состава CAR-T-клеточных препаратов и метаболизма самих CAR-T-клеток.

СОЛИДНЫЕ ОПУХОЛИ

Главная особенность солидных опухолей и их отличие от гематологических заключается в образовании опухолевого очага, который имеет определенную форму, границы и может быть представлен различными типами клеток: раковыми, здоровыми, в том числе иммунными и внеклеточным матриксом. При этом стоит отметить, что раковые клетки обладают полиморфизмом и генетическим атипизмом не только по отношению к здоровым, но и к опухолевым клеткам. Данная гетерогенность создает существенные трудности для таргетной терапии.

Морфологически очаг опухолевых клеток имеет ядро и оболочку. С ростом опухоли происходят изменения как внутри очага, так и в окружающих тканях. Первичный очаг опухоли отграничивается от здоровых клеток организма фиброзной капсулой, состоящей из коллагеновых волокон, образуемых фибробластами. На ранних этапах роста опухоли между раковыми клетками и компонента-

ми опухолевого микроокружения развиваются динамические отношения, которые способствуют выживанию раковых клеток, локальной инвазии и метастатическому распространению. По мере роста опухолевого очага внутри опухоли нарушаются трофика и оксигенация, что приводит к гипоксии и некрозу опухолевых клеток в центре очага. Клетки опухолевого микроокружения под воздействием гипоксии начинают выделять факторы роста, стимулирующие рост сосудов вблизи опухоли, что усиливает поступление к ней питательных веществ. При этом сосуды опухолевого очага сильно отличаются от нормальных сосудов: в них отсутствуют базальная мембрана, эндотелий и перициты. В отдельных капиллярах стенка сосудов представлена самими опухолевыми клетками. Этапы развития опухоли показаны на рис. 2.

Онкобелки, продуцируемые опухолью, сами по себе могут выполнять роль сигнальных молекул, стимулирующих рост опухоли и сосудов, также они способны влиять на клетки опухолевого микроокружения, перепрограммируя их для защиты опухоли от иммунного надзора [30–32].

ОПУХОЛЕВОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ

Клетки, окружающие солидную опухоль, формируют ее микроокружение. К ним относятся стромальные, дендритные клетки, макрофаги, НК-клетки, Т-, В-лимфоциты и др. Основные функции клеток представлены в табл. 1, 2 и рис. 3.

Таблица 1. Роль иммунных клеток в опухолевом микроокружении
Table 1. The role of immune cells in the tumor microenvironment

Тип клеток Cell type	Расположение Location	Эффект Effect	
		Проонкогенный Pro-oncogenic	Антионкогенный Anti-oncogenic
Т-клетки T cells	Могут располагаться по периферии опухоли или инфильтрировать ее Located at the periphery of the tumor or infiltrate it	Трег регулируют активность иммунного ответа, снижая его, отвечают за секрецию цитокинов (интерлейкина-2), экспрессируют факторы роста, способствуют выживанию опухоли, играют большую роль в иммуносупрессивном окружении опухоли. Th2 замедляют активацию В-клеток и продуцируют интерлейкин-10. Th-9 способствуют метастазированию опухоли. Th-17 стимулируют пролиферацию клеток опухоли, инвазию и метастазирование, привлекают большее количество мезенхимальных стволовых клеток в очаг воспаления Tregs regulate the activity of the immune response, decrease it, responsible for cytokine secretion (interleukin-2), express growth factors, promote tumor survival, play a major role in the tumor's immunosuppressive environment. Th2 slows down the activation of B cells and produces interleukin-10. Th-9 promotes tumor metastasis. Th-17 stimulate tumor cell proliferation, invasion, and metastasis, attract more T cells to the site of inflammation	Т-хелперы (Th-1) регулируют активность цитотоксических клеток (CD8 ⁺ -Т-клеток, НК-клеток), увеличивая их пролиферацию и персистенцию. Вызывают повышенную экспрессию главного комплекса гистосовместимости типа I в опухолевых клетках. Th-9 выделяют интерлейкин-9, взаимодействуют с дендритными клетками для увеличения презентации ими опухолевых антигенов. Th-17 через рецептор интерлейкина-17 способны вызывать апоптоз в клетках опухоли, стимулируют поляризацию макрофагов и экспрессию рецепторов на поверхности НК-клеток. Цитотоксические Т-клетки секретируют цитокины, IFN-γ, гранзимы и перфорины, уничтожают опухолевые клетки T helper cells (Th-1) regulate the activity of cytotoxic cells (CD8 ⁺ T cells, NK cells) by increasing their proliferation and persistence. Induce increased the main histocompatibility complex of type I expression in tumor cells. Th-9 secrete interleukin-9, interact with dendritic cells to enhance tumor antigen presentation. Th-17 through the interleukin-17 receptor can induce apoptosis in tumor cells, stimulate macrophage polarization, and receptor expression on NK cell surfaces. Cytotoxic T cells secrete cytokines, IFN-γ, granzymes, and perforins, destroying tumor cells

Окончание табл. 1
End of table 1

Тип клеток Cell type	Расположение Location	Эффект Effect	
		Проонкогенный Pro-oncogenic	Антионкогенный Anti-oncogenic
В-клетки B cells	Инфильтрируют опухоль, образуют третичные лимфоидные структуры внутри нее Infiltrate, form tertiary lymphoid structures inside the tumor	Регуляторные клетки способствуют агрессивному росту опухоли, оказывают иммуносупрессивное воздействие на макрофаги, нейтрофилы, Т-клетки, секретируют интерлейкин-10, TGF-β Regulatory cells promote aggressive tumor growth, have immunosuppressive effects on macrophages, neutrophils, T cells, secrete interleukin-10, transforming growth factor beta TGF-β	Вырабатывают опухолеспецифичные антитела, воспалительные цитокины и участвуют в презентации опухолевых антигенов Т-клеткам Development of tumor-specific antibodies, inflammatory cytokines, and presentation of tumor antigens to T cells
Макрофаги Macrophages	Могут располагаться по периферии опухоли или инфильтрировать ее Located at the periphery of the tumor or infiltrate it	Макрофаги 2-го типа (M2) посредством противовоспалительных цитокинов (интерлейкин-4) снижают эффективность иммунных клеток, а VEGF способствуют ангиогенезу и дальнейшему росту опухоли Type 2 macrophages (M2) through anti-inflammatory cytokines (interleukin-4) reduce the effectiveness of immune cells, and VEGF promote angiogenesis and further tumor growth	Воспалительные макрофаги (M1) участвуют в уничтожении опухоли, фагоцитозе, презентации антигенов Inflammatory macrophages (M1) participate in tumor destruction, phagocytosis, and antigen presentation
Дендритные клетки Dendritic cells	Инфильтрируют опухоль Infiltrate the tumor	Вещества, секретируемые внутри опухолевого микроокружения, способны воздействовать на дендритные клетки и вызывать у них толерантность к опухолевым антигенам, тем самым предотвращая активацию противоопухолевых Т-лимфоцитов Substances secreted within the tumor microenvironment can impact dendritic cells and induce tolerance to tumor antigens, thereby preventing activation of anti-tumor T lymphocytes	Распознают опухолевые антигены и представляют их Т-клеткам, секретируют цитокины (интерлейкин-6) и фактор некроза опухоли They recognize tumor antigens and present them to cells of adaptive immunity, secrete cytokines (interleukin-6) and tumor necrosis factor
НК-клетки NK cells	Циркулируют в крови, обнаруживая опухолевые клетки, находятся в микроокружении опухоли или инфильтрируют ее Circulate in the blood detecting tumor cells, located in the microenvironment or infiltrate the tumor	Предотвращают образование опухолевых клеток и их метастазов, однако из-за иммуносупрессивного микроокружения малоэффективны в солидных опухолях They are highly effective in preventing the formation of tumor cells and their metastases, however, they are less effective in solid tumors due to the immunosuppressive microenvironment	Принимают участие в уничтожении опухолевых клеток путем клеточно-опосредованного апоптоза или активации воспалительного процесса Natural killer cells participate in the destruction of tumor cells through cell-mediated apoptosis or activation of the inflammatory process
Нейтрофилы Neutrophils	Инфильтрируют опухоль Infiltrate the tumor	Выделяют матриксную металлопротеиназу 9 (MMP-9), активируя ремоделирование внеклеточного матрикса опухолевого микроокружения, стимулируют ангиогенез (VEGF), способствуя росту и выживаемости опухоли Secrete matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) activating remodeling of the tumor microenvironment extracellular matrix, and stimulate angiogenesis (VEGF), thereby promoting tumor growth and survival by activating the inflammatory process	Активируют воспалительный процесс за счет высвобождения провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода They activate the inflammatory process through the release of proinflammatory cytokines and reactive oxygen species

Примечание. NK – естественные киллеры; TGF-β – трансформирующий фактор роста β; IFN-γ – интерферон γ; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.
Note. NK – natural killers; IFN-γ – interferon-γ; TNF-α – tumour necrosis factor α; VEGF – vascular endothelial growth factor.

Таблица 2. Проопухолевый эффект стромальных клеток в опухолевом микроокружении

Table 2. Pro-tumor effect of stromal cells tumor microenvironment

Тип клеток Cell type	Расположение Location	Роль Role
Клеточный компонент Cellular components		
Эндотелиальные клетки сосудов Endothelial cells of blood vessels	В сосудах, внутри и снаружи опухоли Vessels inside and outside the tumor	Гипоксия приводит к активации факторов, индуцируемых гипоксией (HIF), факторов транскрипции, имеющих решающее значение для координации клеточных ответов на низкое содержание кислорода. Факторы, индуцируемые гипоксией, инициируют прорастание сосудов, инструктируя эндотелиальные клетки секретировать проангиогенные факторы, такие как PDGF, EGF и VEGF. Аутокринным и паракринным образом VEGF стимулирует миграцию клеток эндотелия с образованием новых просветов кровеносных сосудов. Затем эндотелиальные клетки секретируют белки для формирования новых базальных мембран Hypoxia leads to activation of hypoxia-inducible factors (HIFs), transcription factors that are crucial for coordinating cellular responses to low oxygen levels. Hypoxia-inducible factors initiates vessel sprouting by instructing endothelial cells to secrete pro-angiogenic factors, such as PDGF, EGF, and VEGF. Autocrine and paracrine VEGF stimulates endothelial cell migration with the formation of new blood vessel lumens. Then endothelial cells secrete proteins to form new basement membranes
Опухолеассоциированные фибробласты Tumor-associated fibroblasts	Внутри опухоли Inside tumor	Основной компонент стромы опухоли, создают физический барьер для проникновения иммунных клеток в опухолевый очаг, создавая капсулу опухоли The main component of the tumor stroma, creating a physical barrier to the infiltration of immune cells into the tumor focus, forming a tumor capsule
Адиipoциты Adipocytes	Внутри опухоли Inside tumor	Находятся в динамических и реципрокных отношениях с опухолевыми клетками, чтобы поддерживать прогрессирование опухоли. Способны питать опухолевые клетки, секретируют металлопротеиназы (ММР), такие как ММР-1, -7, -10, 11 и -14 Adipocytes are in dynamic and reciprocal relationships with tumor cells to support tumor progression. They are capable of nourishing tumor cells, secreting metalloproteinases (MMP) such as MMP-1, MMP-7, MMP-10, MMP-11, and MMP-14.
Неклеточные компоненты Non-cellular components		
Внеклеточный матрикс (коллагеновые волокна, фибронектин, ламинин, эластан и др.) The extracellular matrix (collagen fibers, fibronectin, laminin, elastin, and others)	Внутри и снаружи опухоли Inside and outside tumor	Составляет большую часть солидной опухоли (до 60 % ее массы). Большое количество коллагеновых волокон и фибробласты приводят к десмоплазии, блокируют инфильтрацию иммунными клетками опухолевого очага This structure makes up a large part of the solid tumor, comprising up to 60 % of the tumor mass. A high number of collagen fibers lead to desmoplasia, blocking the infiltration of immune cells into the tumor site
Экзосомы Exosome	Внутри и снаружи опухоли Inside and outside tumor	Способствуют воспалению, прогрессированию опухоли, ангиогенезу и метастазированию Contribute to inflammation, tumor progression, angiogenesis, and metastasis

Примечание. PDGF – фактор роста тромбоцитов; EGF – эпидермальный фактор роста; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.
Note. PDGF – platelet-derived growth factor; EGF – epidermal growth factor; VEGF – vascular endothelial growth factor.

Клетки Th1 проявляют заметную противоопухолевую активность. Они продуцируют различные цитокины (интерферон γ (IFN- γ), фактор некроза опухоли α (TNF- α), IL-2 и интерлейкин-21 (IL-21)) и способствуют активации противоопухолевого ответа, привлекая цитотоксические CD8⁺-T-, NK- и другие клетки. При этом Т-клетки секретируют гранзи-

мы и перфорины, которые приводят к уничтожению клеток-мишеней. Клетки Th17, продуцируя цитокин IL-17, индуцируют поляризацию макрофагов 1-го типа (M1) и рекрутирование противоопухолевых иммунных клеток (NK- и CD8⁺-Т-клеток). Клетки Th2 проявляют как противоопухолевые свойства посредством секреции IL-4 (активирует NK-клетки и способствует поля-

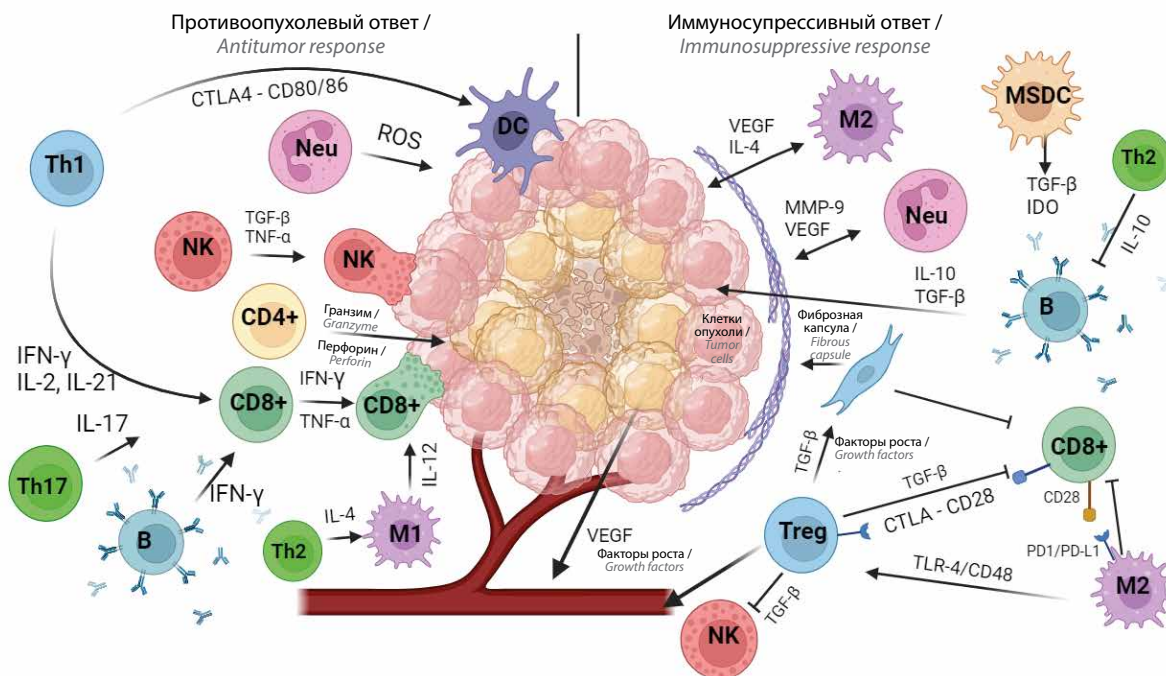


Рис. 3. Опухолевое микроокружение. В зависимости от типа опухоли клетки микроокружения могут оказывать как противоопухолевый, так и иммуносупрессивный эффект. При этом одни и те же клетки с течением времени способны играть разные роли в развитии опухоли. Особая роль принадлежит Treg-клеткам, которые блокируют противоопухолевый ответ. TGF-β – трансформирующий фактор роста β; TNF-α – фактор некроза опухоли α; IFN-γ – интерферон γ; IL-2 – интерлейкин-2; IL-4 – интерлейкин-4; IL-10 – интерлейкин-10; IL-12 – интерлейкин-12; IL-17 – интерлейкин-17; IL-21 – интерлейкин-21; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; MMP-9 – матриксная металлопротеиназа 9; M1 – макрофаги 1-го типа; M2 – макрофаги 2-го типа; PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели 1; PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1; IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа; NK – естественные киллеры; Neu – нейтрофилы; ДК – дендритные клетки

Fig. 3. Tumor microenvironment. Depending on the tumor type, microenvironmental cells can have both antitumor and immunosuppressive effects. Moreover, the same cells can play different roles in tumor development over time. A special role belongs to Treg cells, which block the antitumor response. TGF-β – transforming growth factor β; TNF-α – tumour necrosis factor α; IFN-γ – interferon γ; IL-2 – interleukin-2; IL-4 – interleukin-4; IL-10 – interleukin-10; IL-12 – interleukin-12; IL-17 – interleukin-17; IL-21 – interleukin-21; VEGF – vascular endothelial growth factor; MMP-9 – matrix metalloproteinase 9; M1 – type 1 macrophages; M2 – type 2 macrophages; PD-1 – programmed cell death 1; PD-L1 – programmed death-ligand 1; IDO – indolamine-2,3-dioxygenase; NK – natural killers; Neu – neutrophils; DC – dendritic cells

ризации макрофагов), так и иммуносупрессивные свойства посредством подавления активации В-клеток. Регуляторные Treg-клетки в опухоли препятствуют противоопухолевым процессам, подавляя активность эффекторных Т-клеток за счет продукции иммуносупрессивных цитокинов (трансформирующего фактора роста β (TGF-β), интерлейкина-10 (IL-10) и интерлейкина-35 (IL-35)), потребления IL-2, подавления антигенпрезентирующих клеток. Также существенную роль в подавлении противоопухолевой активности играют мезенхимальные стволовые клетки, которые продуцируют индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO).

МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ОПУХОЛЕВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Развитие опухолевой резистентности представляет собой сложный и многофакторный процесс. Наиболее частыми причинами резистентности опухоли к CAR-T-терапии являются:

- отсутствие универсального опухолевого антигена из-за большой гетерогенности антигенов, экспрессируемых на мембране опухолевых клеток;

- ускользание опухолевого антигена вследствие частичной или полной потери целевого опухолевого антигена (за счет этого опухоль становится невидимой для иммунных клеток, в том числе и CAR-T-клеток) [33];
- агрессивная среда внутри опухоли. Вследствие нарушения метаболизма внутри опухолевого очага развиваются гипоксия, ацидоз, недостаток питательных веществ, некроз, что приводит к снижению эффективности или гибели иммунных клеток, проникающих внутрь опухоли;
- иммуносупрессивное опухолевое микроокружение, которое ингибирует реакции противоопухолевого ответа (рис. 4).

Все эти факторы приводят к слабой инфильтрации CAR-T-клеток опухолевой стромы и низкому уровню персистенции иммунных клеток внутри опухоли [34].

Одной из причин развития резистентности являются молекулы иммунных контрольных точек (например, лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1) на опухолевых и/или стромальных клетках), которые связываются с рецептором програм-

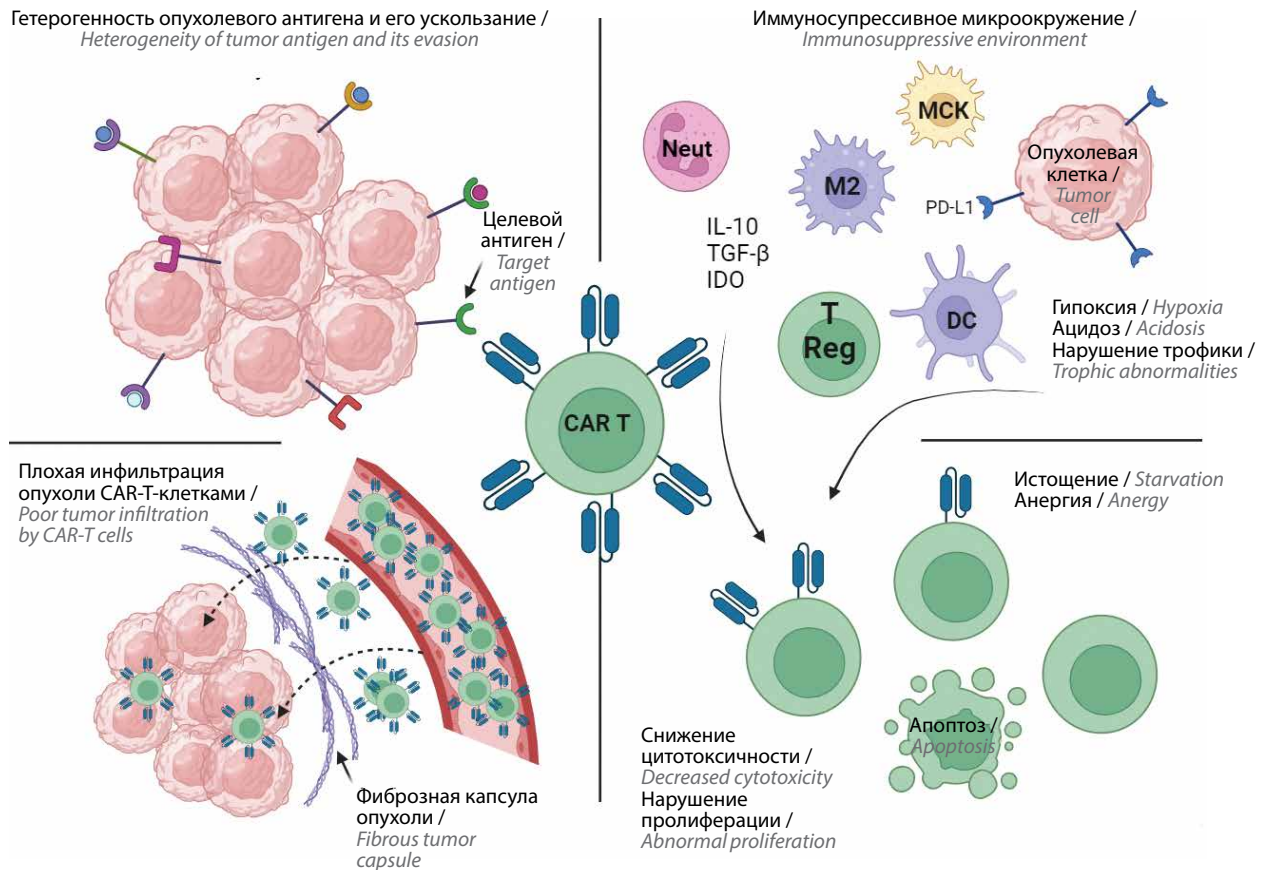


Рис. 4. Причины резистентности солидных опухолей к CAR-T-клеточной терапии. Гетерогенность опухолевых антигенов, ускользание целевого антигена, иммуносупрессивное микроокружение, фиброзная капсула опухоли, истощение и анергия CAR-T-клеток создают ряд трудностей в эффективном лечении солидных опухолей. IL-10 – интерлейкин-10; TGF- β – трансформирующий фактор роста β ; PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1; IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа; M2 – макрофаги 2-го типа; ДК – дендритные клетки; CAR-T – T-клетки с химерным антигенным рецептором; MCK – мезенхимальные стволовые клетки; Neu – нейтрофилы

Fig. 4. Reasons for resistance of solid tumors to CAR-T cell therapy. Heterogeneity of tumor antigens, target antigen escape, immunosuppressive microenvironment, fibrous tumor capsule, and CAR-T cell depletion and anergy pose a number of challenges to the effective treatment of solid tumors. IL-10 – interleukin-10; TGF- β – transforming growth factor β ; PD-L1 – ligand of the receptor for programmed cell death 1; IDO – indolamine-2,3-dioxygenase; M2 – type 2 macrophages; DC – dendritic cells; CAR-T – T cells with a chimeric antigen receptor; MSC – mesenchymal stem cells; Neu – neutrophils

мируемой клеточной гибели 1 (PD-1) на CAR-T-клетках и снижают их противоопухолевую активность [35]. Клетки опухоли и ее микроокружение могут представлять собой непроницаемое препятствие для CAR-T-клеток, что приводит к недостаточной инфильтрации опухолевой ткани [36, 37]. Неблагоприятная среда внутри опухоли, накопление молочной кислоты [38], нехватка аргинина и триптофана [39] снижают подвижность Т-клеток, их пролиферацию и цитотоксичность [40, 41].

Стоит также отметить, что клеточный состав препарата играет определенную роль в выживаемости вводимых CAR-T-клеток внутри солидной опухоли. Известно, что стадия дифференцировки Т-клеток влияет на их метаболизм, цитотоксичность и персистенцию [42]. В состав CAR-T-клеточного лекарственного средства могут входить Т-клетки различной стадии дифференцировки:

- наивные;
- центральной памяти (стволовые);
- центральной памяти;
- памяти (эффекторные);
- эффекторные;
- терминально дифференцированные.

В зависимости от преобладания тех или иных популяций Т-лимфоцитов происходит изменение уровня цитотоксичности в отношении опухолевых клеток (наибольшее у Т-клеток терминальной дифференцировки и Т-клеток памяти (эффекторных)), персистенции (наибольшая у наивных Т-клеток и Т-клеток центральной памяти (стволовых)), а от стадии дифференцировки зависит основной путь метаболизма (окислительное фосфорилирование (OXPHOS) или гликолиз). Так, Т-клетки начальных стадий дифференцировки характеризуются лучшей выживаемостью за счет способности к самообновлению и пролифера-

ции; в их метаболизме преобладает путь OXPHOS. Клетки терминальных стадий дифференцировки, основным путем метаболизма которых является гликолиз, обладают худшей выживаемостью, но лучшей цитотоксичностью [43, 44]. Таким образом, клеточный состав CAR-T-препарата играет большую роль в противоопухолевом ответе.

Ограничения CAR-T-терапии, связанные с опухолью и ее микроокружением, не являются единственными. Цитокиновый шторм, нейротоксичность, токсичность on-target/off-tumor, синдром лизиса опухоли, реакция «трансплантат против хозяина», аллергические реакции — самые распространенные осложнения при клеточной терапии [45, 46]. Чтобы снизить риск их возникновения и повысить безопасность CAR-T-клеток, разрабатываются новые подходы к терапии. Для уменьшения токсичности, повышения эффективности лечения и профилактики развития резистентности предложено использовать комбинированные подходы, включающие в себя комбинацию ЛТ, ХТ и новых методов иммунотерапии (например, CAR-T-терапии) [47, 48]. Такие стратегии могут позволить преодолеть ограничения и повысить эффективность CAR-T-терапии солидных опухолей.

ХИМИОТЕРАПИЯ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Химиотерапия является стандартом лечения онкологических заболеваний и в настоящее время применяется практически при всех видах рака. Выделяют цитостатический и цитотоксический механизмы воздействия фармпрепаратов на опухолевые клетки. В первом случае происходят замедление и остановка роста опухоли, во втором — ее уничтожение [49]. В настоящее время существует широкий спектр фармпрепаратов, которые воздействуют на различные мишени. Самыми распространенными и давно применяемыми из них являются алкилирующие антинеопластические лекарственные средства, к которым относятся производные бис-В-хлорэтиламина, нитрозомочевины и препараты платины. Еще одна распространенная группа химиопрепаратов включает антиметаболиты: антагонисты пуринов и пиримидинов. К современным химиотерапевтическим лекарственным средствам можно отнести ингибиторы топоизомераз, ингибиторы образования веретен деления, интеркаланты и таргетные препараты на основе золота и специфичных антител [50]. Основными недостатками большинства химиопрепаратов являются системное воздействие и побочные реакции. При этом чувствительность каждого человека к тому или иному химиопрепарату индивидуальна и требует тщательного анализа. Для решения данных проблем необходимо строго соблюдать правила подбора курса ХТ, начиная с расчета дозы лекарственного средства и определения длительности курса для каждого пациента и заканчивая выбором способа введения и использованием современных таргетных химиопрепаратов, которые обладают меньшей токсичностью для организма.

В ХТ солидных опухолей особую роль играет комбинированное применение различных химиопрепаратов для достижения терапевтического эффекта и предотвращения развития химиорезистентности. Известны примеры создания цифровой платформы, позволяющей оценить синергизм различных лекарственных средств при их комбинированном применении [51].

Химиотерапия способна преодолеть ограничения CAR-T-клеточной-терапии и сделать опухоль более восприимчивой к ней. Так, циклофосфамид вызывает деплецию супрессорных клеток в опухолевом микроокружении, увеличивает экспансию цитотоксических CD8⁺-эффекторных Т-клеток внутрь опухолевого очага [52]. Карбоплатин увеличивает поляризацию макрофагов и блокирует экспрессию контрольных точек PD-L1/L2 на поверхности опухолевых клеток, а в комбинации с таксаном и антрациклином усиливает продукцию цитокинов Т-клетками и рекрутинг иммунных клеток в опухолевый очаг [53]. Паклитаксел и доксетаксел улучшают инфильтрацию CAR-T-клеток (их проникновение в опухоль), разрушая строму опухолевого микроокружения и делая ее более пригодной для действия иммунных клеток, что останавливает рост опухоли [54–56]. Дакарбазин увеличивает секрецию цитокинов макрофагами и опухолевыми клетками для привлечения большого количества иммунных клеток.

Однако стоит отметить, что ХТ наряду с положительными сторонами имеет ряд серьезных побочных эффектов, связанных с острой и хронической токсичностью, требующих внимания и контроля.

ЛУЧЕВАЯ ТЕРАПИЯ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Лучевая терапия — метод воздействия на опухолевые клетки высокоэнергетическим излучением с целью их уничтожения. Под воздействием излучения внутри клеток происходит ионизация частиц и депонируется энергия, что приводит к локальному нагреву, изменению метаболизма и повреждению генетического аппарата клеток опухоли с последующей их гибелью.

В основе ЛТ лежит различие в радиочувствительности здоровых клеток и клеток опухоли. Быстро пролиферирующие клетки с высокой митотической активностью, к которым относятся опухолевые и стволовые клетки, более чувствительны к воздействию радиации, так как за короткий промежуток времени не успевают восстановить повреждения генетического аппарата перед пролиферацией. Повреждения накапливаются, в то же время высокодифференцированные клетки с низкой пролиферативной активностью успевают восстановиться и обладают большей устойчивостью к облучению [57].

Лучевую терапию можно разделить на неoadъювантную (предоперационную, направленную на уменьшение размеров опухоли) и адъювантную (направленную на уничтожение единичных опухолевых клеток, оставшихся после операции). Первая позволяет нерезектабельные опухоли сделать резектабельными, а вторая — предотвратить метастазирование микро-

пических опухолевых фрагментов. Лучевую терапию применяют и как самостоятельный метод при локализованных опухолях (карциномах кожи, головы, шеи, лимфомах), и в комбинации с другими видами терапевтического воздействия, которые используются при местно-распространенных злокачественных опухолях, в том числе при раке молочной железы, саркомах и др.

Лечебный эффект ЛТ заключается как в непосредственном, так и в косвенном повреждении ДНК опухолевых клеток, вызванном свободными радикалами, которые образуются в результате ионизации или возбуждения водного компонента клеток под действием излучения. Под его влиянием с течением времени наступает гибель опухолевых клеток, что зависит от большого количества факторов и сопровождается апоптозом или другими видами клеточной гибели: митотической катастрофой, некрозом, аутофагией или старением, также заканчивающимся апоптозом. Лучевое воздействие увеличивает экспрессию молекул МНС класса I и улучшает распознавание цитотоксическими Т-клетками опухолевых клеток [47, 58, 59].

Лучевая терапия может также обладать и проопухолевым эффектом. Радиационно-индуцированные апоптотические раковые клетки активируют макрофаги 2-го типа (M2), которые в свою очередь секретируют различные противовоспалительные цитокины, включая TGF- β и IL-10 [60]. Облученные опухоли также могут рекрутировать большое количество нейтрофилов CD11b⁺Gr1⁺. Присутствие TGF- β в микроокружении опухоли индуцирует продвижение проопухолевых нейтрофилов N2 и активацию путей PI3K-Akt, RHOA, MAPK и SMAD [61]. Кроме того, облучение вызывает усиление экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках, что в свою очередь блокирует действие активированных Т- и NK-клеток против опухолей [62].

Таким образом, ЛТ является важным видом лечения онкологических заболеваний, и ее применение в комбинации с другими методами лечения может позволить преодолеть проблемы, связанные с развитием резистентности и рецидивов.

КОМБИНИРОВАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ХИМИОТЕРАПИИ, ЛУЧЕВОЙ И CAR-T-ТЕРАПИИ

Достижения в комбинированной терапии солидных опухолей позволили надеяться на повышение эффективности лечения рака [63–65]. Комбинированный подход позволяет обойти ограничения монотерапии, снизить риск развития нежелательных явлений (уменьшив дозу и время воздействия). Имеются подтверждения того, что комбинированное лечение повышает эффективность CAR-T-терапии и способно уменьшить побочные эффекты [66, 67]. Основными звеньями комбинированного подхода являются модификация опухолевого микроокружения, повышение экспрессии опухолевых антигенов, улучшение выживаемости иммунных клеток внутри опухоли и снижение токсичности терапии [63, 68].

Комбинация ХТ и CAR-T-терапии позволяет сократить количество циклов ХТ, тем самым уменьшить негативное воздействие на организм. Перед началом CAR-T-терапии (за 5–6 дней до нее) проводят лимфодеплеционную ХТ для создания благоприятного микроокружения опухоли с целью пролиферации и персистенции CAR-T-клеток в организме пациента. При этом важным является как снижение иммунной реакции на введенные CAR-T-клетки, так и изменение опухолевого микроокружения и уменьшение его иммуносупрессивного воздействия.

Химические соединения, проникая в опухолевые клетки, способны повышать экспрессию специфичных антигенов на их поверхности, и они становятся заметнее для иммунных клеток. К таким антигенам относятся DAMP, HMGB1, MIC и RAET1/ULBP, экспрессирующиеся при повреждении и злокачественном перерождении клеток [69]. Также при повреждении опухолевые клетки выделяют в окружающее пространство INF- γ , что способствует привлечению иммунных клеток. В ряде исследований показано, что карбоплатин способен усиливать эффект CAR-T-клеток, нацеленных на рецептор Erb-B. Это приводит к более быстрой деградации опухолевых клеток [70–72]. Также ХТ способна влиять на микроокружение опухоли, в частности снижать ее иммуносупрессивные свойства. Главными механизмами уменьшения иммуносупрессии микроокружения является воздействие химических соединений на связанные с опухолью Treg-клетки и супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC). Ингибирование химиопрепаратами иммунодепрессантов, таких как IL-10, TGF- β и молекулы иммунных контрольных точек, позволяет повысить эффективность и персистенцию CAR-T-клеток [73]. Обнаружено, что опухолевые и иммуносупрессивные клетки микроокружения обладают большей чувствительностью к химиопрепаратам, чем нормальные. Это дает возможность сохранить силу иммунного ответа при применении химиопрепаратов, направленных на снижение активности иммуносупрессивных клеток.

Согласно некоторым исследованиям, первичная ХТ циклофосфамидом (Cy) резко повышает персистенцию и ответ CD19⁺CAR-T-клеток. За счет увеличения экспрессии рецепторов M6P (маннозо-6-фосфатных) на поверхности опухолевых клеток под воздействием этого препарата происходит увеличение цитотоксичности Т-клеток [74, 75]. Наиболее часто используемой схемой лимфодеплеционной ХТ в комбинации с CAR-T-терапией является сочетание Cy и флударабина (Flu). Комбинация этих препаратов с CAR-T-терапией позволяет повысить эффективность лечения за счет снижения аутоиммунитета к CAR-T-клеткам, синтеза IDO, играющую большую роль в иммуносупрессии CAR-T-клеток, а также повысить синтез цитокинов. В одном из исследований для лечения пациентов с В-клеточной неходжкинской лимфомой, резистентной к Cy, применялся бендамус-

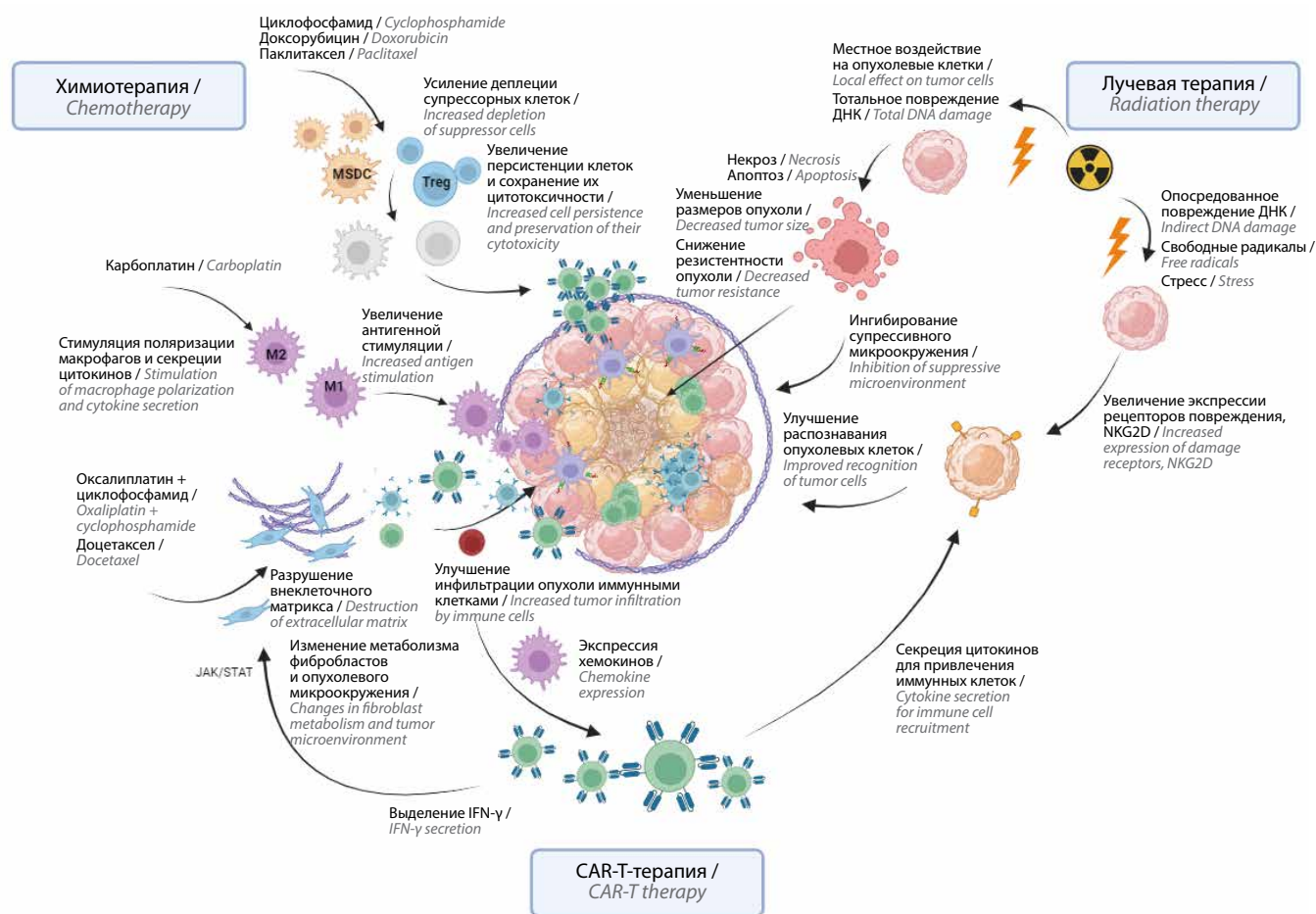


Рис. 5. Комбинированное применение различных видов терапии солидных опухолей. Химиотерапия за счет воздействия на опухолевое микроокружение способствует лучшей инфильтрации и выживаемости Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR-T-клеток), которые в свою очередь способны изменять метаболизм клеток опухоли, делая их более восприимчивыми к воздействию химиопрепаратов. Лучевая терапия уменьшает размеры опухоли, делает ее более чувствительной к химиотерапии и клеточной терапии. IFN-γ – интерферон γ; M1 – макрофаги 1-го типа; M2 – макрофаги 2-го типа; MDSC – супрессорные клетки миелоидного происхождения

Fig. 5. Combined use of different types of therapies in the treatment of solid tumors. Chemotherapy, by influencing the tumor microenvironment, promotes better infiltration and survival of T cells with a chimeric antigen receptor (CAR-T cells), which in turn are able to change the metabolism of tumor cells, making them more susceptible to the effects of chemotherapy. Radiation therapy helps shrink the tumor, making it more sensitive to chemotherapy and cell therapy. IFN-γ – interferon γ; M1 – type 1 macrophages; M2 – type 2 macrophages; MDSC – myeloid-derived suppressor cells

тин. Этот препарат оказался менее токсичным и вызывал меньшее количество побочных реакций по сравнению с Су [76]. По результатам исследования оказалось, что бендамустин в сочетании с Flu более эффективен в лечении ходжкинской лимфомы анти-CD30-CAR-T-клетками, чем бендамустин или Су и Flu по отдельности [77]. В настоящее время проводятся оптимизация протоколов лимфодеплеционной ХТ и поиск других возможных соединений.

Совместное применение химиопрепаратов и CAR-T-терапии позволяет блокировать аутоиммунные реакции на CAR-T-клетки, снизить иммуносупрессию в опухолевом микроокружении и увеличить безопасность обоих видов терапии [78]. Сами CAR-T-клетки также способны повышать восприимчивость опухолевых клеток к ХТ и снижать их резистентность к химиопрепаратам за счет изменения метаболизма, высвобо-

ждая различные вещества. Обнаружено, что одной из причин химиорезистентности может быть наличие глутатиона и цистеина, вырабатываемых фибробластами. Секретируемый же CAR-T-клетками IFN-γ способен изменять метаболизм фибробластов путем воздействия на сигнальный путь JAK/STAT, восстанавливая чувствительность опухоли к химиопрепаратам [79]. Еще одним механизмом повышения эффективности комбинированного применения ХТ является стимулирование макрофагов, вырабатывающих хемокины, позволяющие CAR-T-клеткам адгезироваться на поверхности опухолевых клеток. Также было обнаружено, что синтез CCL5 опухолевыми клетками после ХТ привлекает в опухолевый очаг Т-клетки, синтезировавшие IFN-γ, который в свою очередь способствовал мобилизации макрофагов и дендритных клеток. Далее макрофаги и дендритные клетки экспрессировали CXCL9, что привлекало в

опухоль дополнительные CXCR3⁺T-клетки [75, 80]. Согласно данным современных исследований некоторые химиотерапевтические препараты, такие как таксаны и алкалоиды барвинка, могут облегчить идентификацию опухолевых клеток за счет увеличения воздействия кальретикулина и разрушения клеток опухоли, приводящего к высвобождению большого количества опухолевых антигенов [81].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последнее десятилетие методы и подходы в терапии онкологических заболеваний претерпели револю-

цию. Традиционно лекарственные средства воздействовали на опухоли более широко (например, ХТ), в настоящее же время новые терапевтические стратегии позволяют оказывать влияние на специфические клетки в рамках опухолевого микроокружения. Проблема резистентности опухолей к терапии все еще остается актуальной, однако уже имеются определенные успешные шаги к ее решению. Современные данные позволяют сделать вывод о том, что применение ХТ усиливает потенциал CAR-T-клеток в лечении солидных опухолей и такая комбинация открывает новые перспективы для дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. GlobalSurg C, National Institute for Health Research Global Health Research Unit on Global S. Global variation in postoperative mortality and complications after cancer surgery: a multicentre, prospective cohort study in 82 countries. *Lancet* 2021;397(10272): 387–97. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00001-5
2. Albano D., Benenati M., Bruno A. et al. Imaging side effects and complications of chemotherapy and radiation therapy: a pictorial review from head to toe. *Insights Imaging* 2021;12(1):76. DOI: 10.1186/s13244-021-01017-2
3. June C.H., Sadelain M. Chimeric antigen receptor therapy. *N Engl J Med* 2018;379(1):64–73. DOI: 10.1056/NEJMra1706169
4. Zhang L., Shen X., Yu W. et al. Comprehensive meta-analysis of anti-BCMA chimeric antigen receptor T-cell therapy in relapsed or refractory multiple myeloma. *Ann Med* 2021;53(1):1547–59. DOI: 10.1080/07853890.2021.1970218
5. Fischer J.W., Bhattarai N. CAR-T cell therapy: mechanism, management, and mitigation of inflammatory toxicities. *Front Immunol* 2021;12:693016. DOI: 10.3389/fimmu.2021.693016
6. Liu R., Cheng Q., Kang L. et al. CD19 or CD20 CAR T cell therapy demonstrates durable antitumor efficacy in patients with central nervous system lymphoma. *Hum Gene Ther* 2022;33(5–6): 318–29. DOI: 10.1089/hum.2021.249
7. Locke F.L., Ghobadi A., Jacobson C.A. et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1–2 trial. *Lancet Oncol* 2019;20(1):31–42. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30864-7
8. Zhao Z., Xiao X., Saw P.E. et al. Chimeric antigen receptor T cells in solid tumors: a war against the tumor microenvironment. *Sci China Life Sci* 2020;63(2):180–205. DOI: 10.1007/s11427-019-9665-8
9. Liu E., Marin D., Banerjee P. et al. Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors. *N Engl J Med* 2020;382(6):545–53. DOI: 10.1056/NEJMoa1910607
10. Basar R., Daher M., Rezvani K. Next-generation cell therapies: the emerging role of CAR-NK cells. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2020;2020(1):570–8. DOI: 10.1182/hematology.2020002547
11. Cassetta L., Kitamura T. Macrophage targeting: opening new possibilities for cancer immunotherapy. *Immunology* 2018;155(3):285–93. DOI: 10.1111/imm.12976
12. Elahi R., Khosh E., Tahmasebi S., Esmaeilzadeh A. Immune cell hacking: challenges and clinical approaches to create smarter generations of chimeric antigen receptor T cells. *Front Immunol* 2018;9:1717. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01717
13. Kang C.H., Kim Y., Lee H.K. et al. Identification of potent CD19 scFv for CAR T cells through scFv screening with NK/T-cell line. *Int J Mol Sci* 2020;21(23). DOI: 10.3390/ijms21239163
14. Klampatsa A., Dimou V., Albelda S.M. Mesothelin-targeted CAR-T cell therapy for solid tumors. *Expert Opin Biol Ther* 2021;21(4):473–86. DOI: 10.1080/14712598.2021.1843628
15. Land C.A., Musich P.R., Haydar D. et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy in glioblastoma: charging the T cells to fight. *J Transl Med* 2020;18(1):428. DOI: 10.1186/s12967-020-02598-0
16. Ajina A., Maher J. Strategies to address chimeric antigen receptor tonic signaling. *Mol Cancer Ther* 2018;17(9):1795–815. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-1097
17. Imai C., Mihara K., Andreansky M. et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18(4):676–84. DOI: 10.1038/sj.leu.2403302
18. Carpenito C., Milone M.C., Hassan R. et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(9):3360–5. DOI: 10.1073/pnas.0813101106
19. Poorebrahim M., Melief J., Pico de Coana Y. et al. Counteracting CAR T cell dysfunction. *Oncogene* 2021;40(2):421–35. DOI: 10.1038/s41388-020-01501-x
20. Tokarew N., Ogonek J., Endres S. et al. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Br J Cancer* 2019;120(1):26–37. DOI: 10.1038/s41416-018-0325-1
21. Tahmasebi S., Elahi R., Esmaeilzadeh A. Solid tumors challenges and new insights of CAR T cell engineering. *Stem Cell Rev Rep* 2019;15(5):619–36. DOI: 10.1007/s12015-019-09901-7
22. Batra S.A., Rath P., Guo L. et al. Glypican-3-specific CAR T cells coexpressing IL15 and IL21 have superior expansion and antitumor activity against hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Res* 2020;8(3):309–20. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0293
23. Hu Z., Zheng X., Jiao D. et al. LunX-CAR T cells as a targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Mol Ther Oncolytics* 2020;17:361–70. DOI: 10.1016/j.omto.2020.04.008
24. Jiang H., Shi Z., Wang P. et al. Claudin18.2-specific chimeric antigen receptor engineered T cells for the treatment of gastric cancer. *J Natl Cancer Inst* 2019;111(4):409–18. DOI: 10.1093/jnci/djy134
25. Yu L., Huang L., Lin D. et al. GD2-specific chimeric antigen receptor-modified T cells for the treatment of refractory and/or recurrent neuroblastoma in pediatric patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2022;148(10):2643–52. DOI: 10.1007/s00432-021-03839-5

26. Lamers C.H., Sleijfer S., van Steenberghe S. et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Mol Ther* 2013;21(4):904–12. DOI: 10.1038/mt.2013.17
27. Andersch L., Radke J., Klaus A. et al. CD171- and GD2-specific CAR-T cells potently target retinoblastoma cells in preclinical *in vitro* testing. *BMC Cancer* 2019;19(1):895. DOI: 10.1186/s12885-019-6131-1
28. Liu Y., Guo Y., Wu Z. et al. Anti-EGFR chimeric antigen receptor-modified T cells in metastatic pancreatic carcinoma: a phase I clinical trial. *Cytotherapy* 2020;22(10):573–80. DOI: 10.1016/j.jcyt.2020.04.088
29. Xu J., Meng Q., Sun H. et al. HER2-specific chimeric antigen receptor-T cells for targeted therapy of metastatic colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2021;12(12):1109. DOI: 10.1038/s41419-021-04100-0
30. Henke E., Nandigama R., Ergun S. Extracellular matrix in the tumor microenvironment and its impact on cancer therapy. *Front Mol Biosci* 2019;6:160. DOI: 10.3389/fmolb.2019.00160
31. Bussard K.M., Mutkus L., Stumpf K. et al. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res* 2016;18(1):84. DOI: 10.1186/s13058-016-0740-2
32. Pfirschke C., Siwicki M., Liao H.W., Pittet M.J. Tumor microenvironment: no effector T cells without dendritic cells. *Cancer Cell* 2017;31(5):614–5. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.04.007
33. Luo W., Li C., Zhang Y., et al. Adverse effects in hematologic malignancies treated with chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 2022;22(1):98. DOI: 10.1186/s12885-021-09102-x
34. Quail D.F., Joyce J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013;19(11):1423–37. DOI: 10.1038/nm.3394
35. Patsoukis N., Bardhan K., Chatterjee P. et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun* 2015;6:6692. DOI: 10.1038/ncomms7692
36. Whilding L.M., Halim L., Draper B. et al. CAR T-cells targeting the integrin α v β 6 and co-expressing the chemokine receptor CXCR2 demonstrate enhanced homing and efficacy against several solid malignancies. *Cancers (Basel)* 2019;11(5). DOI: 10.3390/cancers11050674
37. Caruana I., Savoldo B., Hoyos V. et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirected T lymphocytes. *Nat Med* 2015;21(5):524–9. DOI: 10.1038/nm.3833
38. Haas R., Smith J., Rocher-Ros V. et al. Lactate regulates metabolic and pro-inflammatory circuits in control of T cell migration and effector functions. *PLoS Biol* 2015;13(7):e1002202. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002202
39. Gu K., Liu G., Wu C. et al. Tryptophan improves porcine intestinal epithelial cell restitution through the CaSR/Rac1/PLC-gamma1 signaling pathway. *Food Funct* 2021;12(18):8787–99. DOI: 10.1039/d1fo01075a
40. Titov A., Kaminskiy Y., Ganeva I. et al. Knowns and unknowns about CAR-T cell dysfunction. *Cancers (Basel)* 2022;14(4):1078. DOI: 10.3390/cancers14041078
41. Titov A., Valiullina A., Zmievskaia E. et al. Advancing CAR T-cell therapy for solid tumors: lessons learned from lymphoma treatment. *Cancers (Basel)* 2020;12(1):125. DOI: 10.3390/cancers12010125
42. Zhang M., Jin X., Sun R. et al. Optimization of metabolism to improve efficacy during CAR-T cell manufacturing. *J Transl Med* 2021;19(1):499. DOI: 10.1186/s12967-021-03165-x
43. Wang R., Dillon C.P., Shi L.Z. et al. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity* 2011;35(6):871–82. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.09.021
44. MacIver N.J., Michalek R.D., Rathmell J.C. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 2013;31:259–83. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-095956
45. Schubert M.L., Schmitt M., Wang L. et al. Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy. *Ann Oncol* 2021;32(1):34–48. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.10.478
46. Huang M., Deng J., Gao L., Zhou J. Innovative strategies to advance CAR T cell therapy for solid tumors. *Am J Cancer Res* 2020;10(7):1979–92.
47. Reits E.A., Hodge J.W., Herberts C.A. et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med* 2006;203(5):1259–71. DOI: 10.1084/jem.20052494
48. Laplagne C., Domagala M., Le Naour A. et al. Latest advances in targeting the tumor microenvironment for tumor suppression. *Int J Mol Sci* 2019;20(19):4719. DOI: 10.3390/ijms20194719
49. DeVita V.T. Jr., Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* 2008;68(21):8643–53. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6611
50. Mattheolabakis G., Rigas B., Constantinides P.P. Nanodelivery strategies in cancer chemotherapy: biological rationale and pharmaceutical perspectives. *Nanomedicine (Lond)* 2012;7(10):1577–90. DOI: 10.2217/nnm.12.128
51. Preuer K., Lewis R.P.I., Hochreiter S. et al. DeepSynergy: predicting anti-cancer drug synergy with Deep Learning. *Bioinformatics* 2018;34(9):1538–46. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx806
52. Noordam L., Kaijen M.E.H., Bezemer K. et al. Low-dose cyclophosphamide depletes circulating naive and activated regulatory T cells in malignant pleural mesothelioma patients synergistically treated with dendritic cell-based immunotherapy. *Oncoimmunology* 2018;7(12):e1474318. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1474318
53. Lesterhuis W.J., Punt C.J., Hato S.V. et al. Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice. *J Clin Invest* 2011;121(8):3100–8. DOI: 10.1172/JCI143656
54. Li J.Y., Duan X.F., Wang L.P. et al. Selective depletion of regulatory T cell subsets by docetaxel treatment in patients with nonsmall cell lung cancer. *J Immunol Res* 2014;2014:286170. DOI: 10.1155/2014/286170
55. Zhang L., Dermawan K., Jin M. et al. Differential impairment of regulatory T cells rather than effector T cells by paclitaxel-based chemotherapy. *Clin Immunol* 2008;129(2):219–29. DOI: 10.1016/j.clim.2008.07.013
56. Alzubi J., Dettmer-Monaco V., Kuehle J. et al. PSMA-directed CAR T cells combined with low-dose docetaxel treatment induce tumor regression in a prostate cancer xenograft model. *Mol Ther Oncolytics* 2020;18:226–35. DOI: 10.1016/j.omto.2020.06.014
57. Baskar R., Lee K.A., Yeo R., Yeoh K.W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci* 2012;9(3):193–9. DOI: 10.7150/ijms.3635
58. Shevtsov M., Sato H., Multhoff G., Shibata A. Novel approaches to improve the efficacy of immuno-radiotherapy. *Front Oncol* 2019;9:156. DOI: 10.3389/fonc.2019.00156
59. Lee Y., Auh S.L., Wang Y. et al. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood* 2009;114(3):589–95. DOI: 10.1182/blood-2009-02-206870
60. Fadok V.A., Bratton D.L., Konowal A. et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998;101(4):890–8. DOI: 10.1172/JCI11112
61. Nam J.S., Terabe M., Mamura M. et al. An anti-transforming growth factor beta antibody suppresses metastasis via cooperative effects on multiple cell compartments. *Cancer Res* 2008;68(10):3835–43. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0215
62. Deng L., Liang H., Burnette B. et al. Radiation and anti-PD-L1 antibody combinatorial therapy induces T cell-mediated depletion of myeloid-derived suppressor cells and tumor regression. *Oncoimmunology* 2014;3:e28499. DOI: 10.4161/onci.28499
63. Parente-Pereira A.C., Whilding L.M., Brewig N. et al. Synergistic chemioimmunotherapy of epithelial ovarian cancer using ErbB-retargeted T cells combined with carboplatin. *J Immunol* 2013;191(5):2437–45. DOI: 10.4049/jimmunol.1301119
64. Heylmann D., Bauer M., Becker H. et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells are sensitive to low dose cyclophosphamide:

- implications for the immune response. *PLoS One* 2013;8(12):e83384. DOI: 10.1371/journal.pone.0083384
65. Muranski P., Boni A., Wrzesinski C. et al. Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy – how far can we go? *Nat Clin Pract Oncol* 2006;3(12):668–81. DOI: 10.1038/ncponc0666
 66. Murad J.P., Tilakawardane D., Park A.K. et al. Pre-conditioning modifies the TME to enhance solid tumor CAR T cell efficacy and endogenous protective immunity. *Mol Ther* 2021;29(7):2335–49. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.02.024
 67. Heczey A., Louis C.U., Savoldo B. et al. CAR T cells administered in combination with lymphodepletion and PD-1 inhibition to patients with neuroblastoma. *Mol Ther* 2017;25(9):2214–24. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.05.012
 68. Turtle C.J., Hanafi L.A., Berger C. et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest* 2016;126(6):2123–38. DOI: 10.1172/JCI85309
 69. Zhang X., Wang D., Li Z. et al. Low-dose gemcitabine treatment enhances immunogenicity and natural killer cell-driven tumor immunity in lung cancer. *Front Immunol* 2020;11:331. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00331
 70. Whilding L.M., Maher J. ErbB-targeted CAR T-cell immunotherapy of cancer. *Immunotherapy* 2015;7(3):229–41. DOI: 10.2217/imt.14.120
 71. Song Y., Liu Q., Zuo T. et al. Combined antitumor effects of anti-EGFR variant III CAR-T cell therapy and PD-1 checkpoint blockade on glioblastoma in mouse model. *Cell Immunol* 2020;352:104112. DOI: 10.1016/j.cellimm.2020.104112
 72. Papa S., Adami A., Metoudi M. et al. Intratumoral pan-ErbB targeted CAR-T for head and neck squamous cell carcinoma: interim analysis of the T4 immunotherapy study. *J Immunother Cancer* 2023;11(6):007162. DOI: 10.1136/jitc-2023-007162
 73. Korenev G., Yakukhnov S., Druk A. et al. USP7 Inhibitors in cancer immunotherapy: current status and perspective. *Cancers (Basel)* 2022;14(22):5539. DOI: 10.3390/cancers14225539
 74. Curran K.J., Margossian S.P., Kernan N.A. et al. Toxicity and response after CD19-specific CAR T-cell therapy in pediatric/young adult relapsed/refractory B-ALL. *Blood* 2019;134(26):2361–8. DOI: 10.1182/blood.2019001641
 75. Michaud M., Martins I., Sukkurwala A.Q. et al. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 2011;334(6062):1573–7. DOI: 10.1126/science.1208347
 76. Ghilardi G., Chong E.A., Svoboda J. et al. Bendamustine is safe and effective for lymphodepletion before tisagenlecleucel in patients with refractory or relapsed large B-cell lymphomas. *Ann Oncol* 2022;33(9):916–28. DOI: 10.1016/j.annonc.2022.05.521
 77. Ramos C.A., Grover N.S., Beaven A.W. et al. Anti-CD30 CAR-T cell therapy in relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol* 2020;38(32):3794–804. DOI: 10.1200/JCO.20.01342
 78. Lamers C.H., Willemsen R., van Elzakker P. et al. Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells. *Blood* 2011;117(1):72–82. DOI: 10.1182/blood-2010-07-294520
 79. Wang W., Kryczek I., Dostal L. et al. Effector T cells abrogate stroma-mediated chemoresistance in ovarian cancer. *Cell* 2016;165(5):1092–105. DOI: 10.1016/j.cell.2016.04.009
 80. Dangaj D., Bruand M., Grimm A.J. et al. Cooperation between constitutive and inducible chemokines enables T cell engraftment and immune attack in solid tumors. *Cancer Cell* 2019;35(6):885–900.e10. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.05.004
 81. Paulsson J., Micke P. Prognostic relevance of cancer-associated fibroblasts in human cancer. *Semin Cancer Biol* 2014;25:61–8. DOI: 10.1016/j.semcancer.2014.02.006

Вклад авторов

М.Р. Халиулин: сбор и анализ данных, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала и таблиц;

Р.Н. Сафин, М.А. Кунст: анализ данных, написание текста статьи;

Э.Р. Булатов: сбор и анализ данных, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contribution

M.R. Khaliulin: data collection and analysis, article writing, preparation of illustrative material and tables;

R.N. Safin, M.A. Kunst: data analysis, article writing;

E.R. Bulatov: data collection and analysis, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID authors

М.Р. Халиулин / M.R. Khaliulin: <https://orcid.org/0009-0005-3832-0805>

Р.Н. Сафин / R.N. Safin: <https://orcid.org/0000-0003-0585-7727>

М.А. Кунст / M.A. Kunst: <https://orcid.org/0000-0002-9721-8262>

Э.Р. Булатов / E.R. Bulatov: <https://orcid.org/0000-0003-2961-0032>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 22-74-10076).

Funding. The work was funded by the grant of the Russian Science Foundation (project No. 22-74-10076).

Статья поступила: 09.11.2023. **Принята к публикации:** 12.02.2024.

Article submitted: 09.11.2023. **Accepted for publication:** 12.02.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-46-54>

Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов, компонентов сигнального пути АКТ/mTOR, рецепторов и лигандов программируемой клеточной гибели ткани меланомы

К.В. Никульников¹, В.А. Богданова², Л.В. Спирина^{1, 2}, С.Ю. Чижевская^{1, 2}, И.В. Кондакова¹,
Е.Л. Чойнзонов^{1, 2}, В.И. Чернов¹

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

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2

Контакты: Константин Валерьевич Никульников Kast10sha91@mail.ru

Введение. Меланома представляет собой опасное новообразование кожи, характеризующееся злокачественным и агрессивным течением. Транскрипционные и ростовые факторы, компоненты сигнального пути АКТ/mTOR (mTOR – мишень рапамицина млекопитающих), рецепторы и лиганды программируемой клеточной гибели задействованы в значимых процессах онкогенеза.

Цель исследования – изучение экспрессии компонентов сигнального пути АКТ/mTOR, транскрипционных и ростовых факторов, AMPK, LC3B, рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1) и его лигандов PD-L1 и PD-L2 в тканях опухолей кожи и слизистых.

Материалы и методы. В исследование включены 21 пациент с верифицированной меланомой кожи различных локализаций и слизистых оболочек полости носа T1a–4bN0M0 (I–IV стадий) и 18 пациентов с базально-клеточным раком кожи различных локализаций T1–4N0M0 (I–VIA стадий) в возрасте от 45 до 72 лет, проходившие лечение в отделении опухолей головы и шеи Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра и имеющие разный инвазивный потенциал. Наличие изъязвления опухоли выявляли путем проведения микроскопии и регистрации истинного отсутствия эпидермиса над новообразованием. Экспрессию компонентов сигнального пути АКТ/mTOR, транскрипционных и ростовых факторов, AMPK, LC3B, PD-1, PD-L1 и PD-L2 в ткани опухоли определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. В тканях меланом выявлено повышение экспрессии 70 S6 киназы и VHL по сравнению с базально-клеточным раком. При этом наличие признаков изъязвления ассоциировано с низким уровнем матричной РНК (мРНК), c-RAF, транскрипционного ядерного фактора каппа В (NF-κB) p50 и фактора, индуцируемого гипоксией 1 (HIF-1), на фоне роста экспрессии фактора, индуцируемого гипоксией 2 (HIF-2). Исследование молекулярных особенностей новообразований в связи с толщиной опухоли по Бреслоу позволило выявить вклад в опухолевую прогрессию транскрипционных и ростовых факторов, интенсивности процессов внутриклеточного сигналинга, модификации микроокружения опухоли, процессов аутофагии и неоангиогенеза.

Заключение. Выявлены молекулярные и биологические особенности меланом, связанные с инвазивным ростом опухоли. Для злокачественных новообразований кожи характерно повышение экспрессии 70 S6 киназы и VHL. Признаки изъязвления и инвазия опухоли ассоциированы с изменением транскрипционных факторов, индукцией ключевых маркеров онкогенеза, что способствует формированию инвазивного потенциала опухоли.

Ключевые слова: меланома, компоненты сигнального пути АКТ/mTOR, транскрипционный ядерный фактор каппа В, фактор, индуцируемый гипоксией 1, фактор, индуцируемый гипоксией 2, AMPK, LC3B, рецептор программируемой клеточной гибели 1, лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1, лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 2

Для цитирования: Никульников К.В., Богданова В.А., Спирина Л.В. и др. Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов, компонентов сигнального пути АКТ/mTOR, рецепторов и лигандов программируемой клеточной гибели ткани меланомы. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):46–54. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-46-54>

Transcriptional, growth factors, components of the AKT/mTOR signaling pathway, receptors and ligands of programmed cell death expression in melanoma

K.V. Nikulnikov¹, V.A. Bogdanova², L.V. Spirina^{1,2}, S.Yu. Chizhevskaya^{1,2}, I.V. Kondakova¹, E.L. Choyznzonov^{1,2}, V.I. Chernov¹

¹Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; 5 Cooperative Lane, Tomsk 634009, Russia;

²Siberian State Medical University, Ministry of Health of the Russia; 2 Moskovsky Tract, Tomsk 634050, Russia

Contacts: Konstantin Valerievich Nikulnikov Kast10sha91@mail.ru

Introduction. Melanoma is the most dangerous neoplasm of the skin, characterized by a malignant and aggressive course. Transcriptional and growth factors, components of the AKT/mTOR signaling pathway, receptors and ligands of programmed cell death are involved in significant processes of oncogenesis.

Aim. To study the expression of components of the AKT/mTOR (mTOR – mammalian target of rapamycin) signaling pathway, transcription and growth factors, expression of AMPK, LC3B, programmed cell death 1 (PD-1), programmed death-ligand 1 PD-L1 and programmed death-ligand 2 (PD-L2) in skin and mucosal tumor tissues.

Materials and methods. The study included 21 patients with a verified diagnosis of melanoma of the skin of various localizations and mucous membranes of the nasal cavity T1a–4bN0M0 (I–IV stages) and 18 patients with basal cell carcinoma of the skin of various localizations T1–4N0M0 (I–VIA stages), aged 45 to 72 years old, who were treated in the department of head and neck tumors of the Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center. The presence of tumor ulceration was determined by microscopy and registration of the true absence of the epidermis over the tumor or due to traumatization of the epidermis. Expression of components of the AKT/mTOR signaling pathway, transcription and growth factors, expression of AMPK, LC3B, PD-1, PD-L1 and PD-L2 in the tumor tissue was determined by real-time polymerase chain reaction.

Results. An increase in the expression of 70 S6 kinase and VHL was found in melanoma tissues compared to basal cell carcinoma. At the same time, the presence of signs of ulceration was associated with a low level of c-RAF, nuclear factor kappa B (NF-κB) p50 and hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) matrix RNA (mRNA) against the background of an increase in the expression of the hypoxia-inducible factor 2 (HIF-2) transcription factor. The study of the molecular features of neoplasms in relation to the tumor thickness according to Breslow revealed the contribution of transcription and growth factors, the intensity of intracellular signaling processes, modification of the microenvironment, autophagy and neoangiogenesis.

Conclusion. The molecular and biological features of melanomas associated with invasive tumor growth have been identified. An increase in the expression of 70 S6 kinase and VHL are characteristic of a malignant skin tumor. The presence of signs of ulceration and tumor invasion were associated with a change in the transcriptional characteristics of factors with the induction of key markers, oncogenesis, which contributes to the formation of the invasive potential of the tumor.

Keywords: melanoma, components of the AKT/mTOR signaling pathway, nuclear factor kappa B, hypoxia-inducible factor 1, hypoxia-inducible factor 2, AMPK, LC3B, programmed cell death 1, programmed death-ligand 1, programmed death-ligand 2

For citation: Nikulnikov K.V., Bogdanova V.A., Spirina L.V. et al. Transcriptional, growth factors, components of the AKT/mTOR signaling pathway, receptors and ligands of programmed cell death expression in melanoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(1):46–54. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-46-54>

ВВЕДЕНИЕ

Меланома представляет собой опасное новообразование кожи, характеризующееся злокачественным и агрессивным течением. Согласно исследованию, которое проводилось на основе данных GLOBOCAN, если показатели заболеваемости меланомой в 2020 г. останутся стабильными, то к 2040 г. они увеличатся примерно в 1,5 раза [1]. В 2020 г. в России частота встречаемости этой патологии составила чуть больше 14 % случаев всех злокачественных новообразований кожи, при этом она стала причиной смерти 70 % больных с данной опухолью [2, 3].

Меланома развивается в результате нескольких генетических изменений, при этом ультрафиолетовое излучение часто выступает в качестве мутагенного

фактора риска [4]. Глубокое знание разнообразия молекулярных сигнальных путей различных типов меланомы позволяет лучше охарактеризовать их и предоставляет инструменты для разработки методов лечения, основанных на воздействии сигналов, продвигаемых этими каскадами [5]. К основным молекулярно-генетическим маркерам данной опухоли относится мутация *BRAF*, распространенность которой составляет 60–80 % всех злокачественных опухолей кожи [6, 7].

В последние годы значительные успехи в лечении пациентов с меланомой связаны с применением ингибиторов тирозинкиназы *BRAF*/MEK [8]. В эпоху молекулярно-таргетной терапии точное выявление мутации *BRAF* при данном заболевании становится все более важным с учетом влияния гетерогенности *BRAF*,

возникающей на разных этапах развития опухоли, на выживаемость больных [9]. В настоящее время полагают, что вариабельность поведения опухоли опосредована гетерогенностью молекулярных каскадов, задействованных в развитии меланомы, гиперактивацией сигнальных путей АКТ/mTOR (mTOR — мишень рапамицина млекопитающих), MAPK, а также ключевыми процессами онкогенеза аутофагии и апоптоза [10, 11]. Белок LC3B (MAP1LC3B) является центральным белком в пути аутофагии, где он участвует в выборе субстрата, а также киназы AMPK и mTOR [12], определяющих особенности агрессивного роста опухоли, в том числе в случае мутации *BRAF*.

Еще одним подходом в изучении молекулярных особенностей опухоли является изменение экспрессии транскрипционных и ростовых факторов, которые связаны с развитием меланомы [13]. Недавние исследования показали, что транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией 1 α (HIF-1 α) способствует прогрессированию меланомы, активируя сигнальные пути АКТ/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, транскрипционного ядерного фактора каппа В (NF- κ B) и др. [14]. Отмечается, что ингибирование сигналов NF- κ B способно подавлять рост и прогрессирование злокачественных новообразований [15]. Также перспективными маркерами являются состояние рецепторов и лигандов апоптоза [16], гиперэкспрессия которых наблюдается в ткани меланомы, и эпигенетические изменения их генов [17].

В целом отсутствуют значимые данные о состоянии показателей сигнальных каскадов, экспрессии транскрипционных и ростовых факторов в формировании инвазивного и метастатического потенциалов меланом кожи и слизистых.

Цель исследования — изучение экспрессии компонентов сигнального пути АКТ/mTOR, транскрипционных, ростовых факторов, экспрессии AMPK, LC3B, рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1) и его лигандов (PD-L1 и PD-L2) в ткани опухолей кожи и слизистых.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 21 пациент с верифицированной меланомой кожи различных локализаций и слизистых оболочек полости носа T1a–4bN0M0 (I–IV стадий) и 18 пациентов с базально-клеточным раком кожи различных локализаций T1–4N0M0 (I–IVA стадий) в возрасте от 45 до 72 лет (13 (62 %) мужчин и 8 (38 %) женщин), проходившие лечение в отделении опухолей головы и шеи Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра. Группа сравнения выбрана с учетом различий в инвазивном потенциале опухолей разного происхождения, так как базально-клеточный рак не метастазирует. Проведено хирургическое лечение в объеме широкого иссечения опухоли кожи с биопсией сторожевого лимфатического узла, а в случае меланомы полости носа — широкое

иссечение опухоли с резекцией носовых раковин, хрящей и костей полости носа открытым путем с биопсией сторожевого лимфатического узла. Заболевание стадии T1aN0M0 выявлено у 4 (19 %) пациентов, T1bN0M0 — у 5 (23,5 %), T2bN0M0 — у 1 (5 %), T3aN0M0 — у 5 (23,5 %), T3bN0M0 — у 1 (5 %), T4aN0M0 — у 4 (19 %), T4bN0M0 — у 1 (5 %).

Исъявление опухоли отмечалось у 9 (53 %) больных, отсутствовало — у 8 (47 %). Уровень инвазии I степени по Кларку не был зафиксирован, II степени отмечен у 6 (35 %) пациентов, III степени — у 6 (35 %), IV степени — у 1 (6,5 %), V степени — у 4 (23,5 %).

Опухоль толщиной по Бреслоу <0,75 мм зафиксирована у 2 (12 %) пациентов, от 0,75 до 1,5 мм — у 7 (41 %), от 1,51 до 3 мм — у 1 (6 %), от 3 до 4 мм — у 2 (12 %), от 4,01 мм и более — у 5 (29 %).

Все пациенты имели отрицательный статус по мутации *BRAF*^{V600E}. В контрольную группу вошли 6 больных базалиомой. Все процедуры с участием пациентов проведены в соответствии с протоколом Хельсинкской декларации по правам человека (1964 г.).

Материалом исследования являлись образцы пораженной опухолью и неизменной кожи, полученные при оперативном лечении и находящиеся на расстоянии не менее 1 см от границы опухоли, которые после забора замораживались и хранились при температуре –80 °C.

Выделение РНК. РНК выделяли с помощью набора RNeasy mini Kit, содержащего ДНКазу I (Qiagen, Германия). Для оценки количества выделенной РНК на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США) оценивали концентрацию и чистоту выделенной РНК. Концентрация РНК составила 80–250 нг/мкл; A260/A280 = 1,95–2,05; A260/A230 = 1,90–2,31. Целостность РНК определяли с помощью капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, США) и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies, США). Индекс целостности РНК (RNA integrity number, RIN) составил 5,6–7,8.

Количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Уровень экспрессии генов оценивали с помощью количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией (RT-qPCR) с использованием красителя SYBR Green на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, США; ЦКП «Медицинская генетика»). Для получения комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора реактивов m-MuLV-RH («БиоЛабмикс», Россия) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией производителя. Полимеразную цепную реакцию ставили в 3 репликах в объеме 25 мкл, содержащем 12,5 мкл БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue («БиоЛабмикс», Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров и 50 нг кДНК: CAIX — 5'-GTTGCTGTCTCGCTTGGA-3',

R5'-CAGGGTGTCTCAGAGAGGGTGT-3'; HIF-1 α — F5'-CAAGAACCTACTGCTAATGCCA-3', R5'-TTTGGTGAGGCTGTCCGA-3'; EPAS1 — F5'-TG GAGTATGAAGAGCAAGCCT-3', R5'-GGGAACCTGCTCTTGCTGT-3'; NF- κ B — F5'-CGTGTAACCAAAGCCCTAAA-3', R5'-AACCAAGAAAGGAAGCCAAGT-3'; RELA — F5'-GGAGCACAGATACCACCAAGA-3', R5'-GGGTTGTTGTTGGTCTGGAT-3'; VEGFA — F5'-AGGGCAGAATCATCAGGAA-3', R5'TCTTGCTCTATCTTTCTTTGGTCT-3'; KDR — F5'AAACACAGCAGGAATCAGTCA-3' R5'-GTGGTGTCTGTGTCATCGGA-3'; 4-BP1 — F5'-CAGCCCTTTCTCCCTCACT-3', R5'-TTCCCAAGCACATCAACCT-3'; AKT1 — F5'-CGAGGACGCCAAGGAGA-3', R5'-GTCATCTTGGTCAGGTGGTGT-3v; C-RAF — F5'-TG GTGTGTCTCTGCTCCCT-3', R5'-ACTGCCTGCTACCTTACTTCCT-3'; GSK3 β — F5'-AGACAAGGACGGCAGCAA-3', R5'-TGGAGTAGAAGAAATAACGCAAT-3'; 70 S6 киназа: F5'-CAGCACAGCAAATCCTCAGA-3', R5'-ACACATCTCCCTCTCCACCTT-3'; mTOR — F5'-CCAAAGGCAACAAGCGAT-3', R5'-TTCACCAAACCGTCTCCAA-3'; PDK1 — F5'-TCACCAGGACAGCCAATACA-3', R5'-CTCCTCGGTCACTCATCTTCA-3'; VHL — F5'-GGCAGGCGAATCTCTTGA-3', R5'-CTATTTCTTTACTCAGCACCATT-3'; PD-L2 — F5'-GTTCCACATACCTCAAGTCCAA-3', R5'-ATAGCACTGTTCACTTCCCTCTT-3'; PD-L1 — F5'-AGGGAGAATGATGGATGTGAA-3', R5'-ATCATTCACAACCACACTCACAT-3'; PD — F5'-CTGGGCGGTGTCTACAACCT-3', R5'-CTTCTGCCCTTCTCTGTCA-3'; AMPK — F5'-AAGATGTCCATTGGATGCACT-3', R5'-TGAGGTGTTGAGGAACCAGAT-3'; LC3B — F5'-CCCAAACCGCAGACACAT-3', R5'-ATCCCACCAGCCAGCAC-3'; GAPDH — F5'-GG AAGTCAGGTGGAGCGA-3', R5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGA-3'.

Двухшаговая программа амплификации включала: 1 цикл — 94 °C, предварительная денатурация 10 мин; 40 циклов — 1-й шаг 94 °C, 10 с, 2-й шаг 20 с при температуре 60 °C. Праймеры подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>).

В качестве референсного гена применяли ген «домашнего хозяйства» фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Уровень экспрессии каждого целевого гена нормализовали по отношению к экспрессии GAPDH. Количественный анализ экспрессии проводили по 2 $\Delta\Delta$ Ct по отношению к конститутивно-экспрессируемому гену-рефери этого фермента.

Получение гомогенатов. Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 mM трис-HCl буфера (pH = 7,5), содержащего 2 mM аденозинтрифосфата (АТФ), 5 mM хлорида магния, 1 mM дитиотреитола, 1 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и 100 mM хлорида натрия. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10 000 g и 4 °C.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 12.0. Для оценки нормальности использовали критерий Колмогорова—Смирнова. Результаты определения экспрессии генов представлены как медиана (Q₁; Q₃). Значимость различий независимых параметров оценивали по U-критерию Манна—Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. При сравнении различий в более чем двух исследуемых группах применяли непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскела—Уоллиса).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования в ткани меланомы выявлено повышение экспрессии 70 S6 киназы и VHL в 33,3 и 7,14 раза соответственно по сравнению с образцами ткани базально-клеточного рака кожи (табл. 1), что свидетельствует об активации компонентов внутриклеточных сигнальных каскадов при развитии злокачественной опухоли кожи.

Наличие признаков изъязвления ассоциировано со снижением уровня мРНК c-RAF, NF- κ B p50 и HIF-1 в 2,17; 1,76 и 4 раза соответственно по сравнению с опухолями без признаков изъязвления. При этом отмечено увеличение экспрессии HIF-2, которая возросла в 2 раза при наличии изъязвлений (см. табл. 2).

Полученные результаты показали связь изучаемых молекулярных показателей с толщиной опухоли по Бреслоу (табл. 3). Пациенты 3-й и 4-й групп (с опухолью толщиной 1,51–3 и 3–4 мм соответственно) были объединены из-за небольшого количества. Отмечено, что экспрессия c-RAF волнообразно изменялась в зависимости от толщины опухоли. При этом самые низкие уровни мРНК наблюдались у пациентов 3-й и 4-й групп с опухолью толщиной 1,51–3 и 3–4 мм.

Выявлено изменение экспрессии 70 S6 киназы и PD-L1: уровень мРНК 70 S6 киназы во 2-й, 3–4-й и 5-й группах снижался в 4,5; 5,68 и 5 раз соответственно по сравнению с пациентами с опухолью толщиной <0,75 мм, а уровень экспрессии PD-L1 — в 10,6; 3,8 и 5 раз соответственно.

Кроме того, отмечалось снижение экспрессии mTOR у пациентов с опухолью толщиной 0,75–1,5, 1,51–3, 3–4 мм в 4,75 и 2,69 раза соответственно по сравнению с больными с опухолью толщиной <0,75 мм. Аналогичные изменения зафиксированы для экспрессии PD-L2 и AMPK: наблюдалось уменьшение уровня их мРНК. У больных с толщиной опухоли 0,75–1,5 мм и >4,0 мм отмечалось снижение уровня экспрессии

Таблица 1. Экспрессия транскрипционных и ростовых факторов, компонентов сигнального пути AKT/mTOR, рецепторов и лигандов программируемой клеточной гибели ткани меланомы по сравнению с базально-клеточным раком кожи, у. е., Me (Q1; Q3)
Table 1. Expression of transcription and growth factors, components of the AKT/mTOR signaling pathway, receptors and ligands of programmed cell death in melanoma compared to basal cell carcinoma, a. u., Me (Q1; Q3)

Показатель Parameter	Базалиома (n = 18) Basal cell carcinoma (n = 18)	Меланома (n = 21) Melanoma (n = 21)
4EBP1	1,00 (0,02; 3,62)	2,10 (0,16; 31,21)
AKT	0,42 (0,00; 1,91)	1,00 (0,37; 4,52)
c-RAF	0,43 (0,01; 1,00)	0,50 (0,29; 3,72)
GSK-3β	0,13 (0,02; 0,52)	0,85 (0,25; 4,34)
70 S6 киназа 70 S6 kinase	0,03 (0,03; 0,24)	1,00* (0,56; 1,93)*
m-TOR	0,97 (0,95; 8,00)	1,95 (0,92; 6,75)
PDK1	1,53 (0,52; 2,30)	0,95 (0,49; 2,94)
PTEN	0,01 (0,00; 9,88)	0,72 (0,34; 1,75)
NF-kB p65	0,20 (0,17; 1,00)	0,56 (0,06; 3,89)
NF-kB p50	0,05 (0,01; 0,84)	1,02 (0,28; 2,85)
VEGFR2	1,84 (0,50; 3,47)	1,00 (0,34; 1,92)
VEGF	1,00 (0,20; 1,47)	1,50 (0,30; 3,27)
CAIX	0,13 (0,01; 0,17)	1,30 (0,46; 3,9)
HIF-1	0,26 (0,07; 3,03)	1,18 (0,31; 8,00)
HIF-2	0,81 (0,25; 104,80)	1,06 (0,19; 3,00)
VHL	0,14 (0,02; 0,22)	1,00 (0,55; 3,07)*
PD-1	1,15 (0,37; 6,87)	1,70 (0,44; 3,19)
PD-L1	0,60 (0,25; 0,69)	1,30 (0,15; 3,12)
PD-L2	1,34 (1,00; 2,48)	0,66 (0,14; 2,00)
AMPK	0,00 (0,00; 0,36)	1,00 (0,39; 4,00)
LC3B	0,50 (0,03; 2,01)	1,00 (0,13; 20,55)

*Значимость различий по сравнению с пациентами с базалиомой, $p < 0,05$.
*Significance of the differences compared to patients with basal cell carcinoma, $p < 0.05$.

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; NF-kB – транскрипционный ядерный фактор каппа В; GSK-3β – киназа-3 β-гликогенсинтазы; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; HIF-1 – фактор, индуцируемый гипоксией 1; HIF-2 – фактор, индуцируемый гипоксией 2; PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели 1; PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1; PD-L2 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 2.
Note. Here and in Tables 2, 3: mTOR – mammalian target of rapamycin; NF-kB – transcription nuclear factor kappa B; GSK-3β – glycogen synthase kinase-3 β; VEGF – vascular endothelial growth factor; HIF-1 – hypoxia-inducible factor 1; HIF-2 – hypoxia-inducible factor 2; PD-1 – programmed cell death receptor 1; PD-L1 – programmed cell death-ligand 1; PD-L2 – programmed cell death-ligand 2.

PD-L2 в 11,2 и 18,95 раза соответственно по сравнению с больными с толщиной опухоли <0,75 мм. Уровень мРНК AMPK у данных пациентов в этих условиях снижался в 4,13 и 10 раз соответственно.
Выявлено также уменьшение экспрессии NF-kB p50 в 3–4-й и 5-й группах в 17,77 и 4,44 раза соответственно по сравнению с 1-й группой. Для опухолей

толщиной 1,51–3 и 3–4 мм характерны самые низкие уровни мРНК 4EBP1, c-RAF, PTEN, HIF-1 и LC3B, которые были ниже в 9,37; 15,92; 7,35; 36,0 и 206,25 раза соответственно по сравнению с больными с опухолью толщиной <0,75 мм.
У больных с опухолью толщиной >4 мм зафиксировано снижение экспрессии HIF-2 и киназы-3

Таблица 2. Экспрессия транскрипционных и ростовых факторов, компонентов сигнального пути AKT/mTOR, рецепторов и лигандов программируемой клеточной гибели ткани меланомы в зависимости от наличия изъязвления опухоли, у.е., Ме (Q1; Q3)

Table 2. Expression of transcription and growth factors, components of the AKT/mTOR signaling pathway, receptors and ligands of programmed cell death in melanoma tissue depending on the presence of tumor ulceration, a.u., Me (Q1; Q3)

Показатель Parameter	Отсутствие изъязвления (n = 8) Without ulceration (n = 8)	Наличие изъязвления (n = 9) With ulceration (n = 9)
4EBP1	2,21 (0,50; 30,42)	0,18 (0,15; 3,78)
AKT	0,71 (0,33; 4,00)	1,00 (0,91; 2,00)
c-RAF	0,50 (0,44; 4,00)	0,23 (0,07; 0,47)*
GSK-3β	0,78 (0,04; 1,03)	1,50 (0,50; 7,18)
70 S6 киназа 70 S6 kinase	1,22 (0,25; 2,00)	0,66 (0,63; 1,00)
m-TOR	1,35 (0,03; 6,85)	2,00 (1,90; 3,10)
PKD1	0,80 (0,10; 2,93)	1,97 (1,00; 2,95)
PTEN	1,00 (0,39; 1,22)	0,37 (0,31; 0,50)
NF-kB p65	0,28 (0,06; 1,00)	0,65 (0,06; 3,79)
NF-kB p50	1,22 (1,00; 3,70)	0,69 (0,40; 1,00)*
VEGFR2	1,00 (0,04; 1,39)	0,57 (0,50; 4,00)
VEGF	1,00 (0,03; 4,00)	2,00 (0,91; 2,00)
CAIX	1,00 (0,01; 2,00)	1,00 (0,67; 2,00)
HIF-1	2,00 (0,18; 16,00)	0,50 (0,45; 0,50)*
HIF-2	0,99 (0,00; 1,00)	2,00 (1,13; 4,00)*
VHL	1,00 (0,68; 4,05)	0,86 (0,58; 2,00)
PD-1	0,50 (0,38; 1,99)	2,00 (0,50; 2,95)
PD-L1	1,60 (0,00; 8,00)	0,76 (0,75; 3,73)
PD-L2	0,39 (0,02; 2,00)	0,83 (0,50; 1,44)
AMPK	1,00 (0,00; 4,00)	1,00 (0,87; 3,97)
LC3B	1,00 (0,04; 32,00)	0,13 (0,13; 0,25)

*Значимость различий по сравнению с пациентами без признаков изъязвления, $p < 0,05$.
*Significance of differences compared to patients without signs of ulceration, $p < 0.05$.

β-гликогенсинтазы (GSK-3β); уровень мРНК данных показателей уменьшился в 1,57 и 1,61 раза соответственно. При этом для опухолей толщиной 1,51–3 и 3–4 мм отмечено снижение экспрессии 4EBP1, PTEN, NF-kB p50 и HIF-1 в 10,84; 4,09; 9,04 и 3,48 раза соответственно по сравнению с опухолью толщиной 0,75–1,5 мм. Высокие показатели экспрессии выявлены для опухолей толщиной >4,0 мм: наблюдалось повышение уровня экспрессии 4EBP1, c-RAF, PTEN, NF-kB p50, HIF-1 и LC3B в 1,34; 12,78; 2,94; 4,0; 32,0 и 29,88 раза соответственно

по сравнению с опухолями толщиной 1,51–3 и 3–4 мм. Полученные данные свидетельствуют о наличии особенностей транскрипционного профиля ростовых факторов, их рецепторов, а также компонентов сигнальных каскадов, которые характерны для опухолей с высоким инвазивным потенциалом.

В целом результаты исследования свидетельствуют о связи толщины опухоли по Бреслоу (глубины инвазии трансформированных клеток) с изменением экспрессии молекулярных факторов.

Таблица 3. Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов, компонентов сигнального пути АКТ/мTOR, рецепторов и лигандов программируемой клеточной гибели ткани меланомы в зависимости от толщины опухоли по Бреслоу, у.е., Me (Q1; Q3)

Table 3. Expression of transcription and growth factors, components of the АКТ/мTOR signaling pathway, receptors and ligands of programmed cell death in melanoma tissue depending on the Breslow's depth, Me (Q1; Q3), a.u.

Показатель Parameter	1-я группа (<0,75 мм) (n = 2) Group 1 (<0.75 mm) (n = 2)	2-я группа (0,75–1,5 мм) (n = 7) Group 2 (0.75–1.5 mm) (n = 7)	3-я (1,51–3,00 мм) и 4-я группы (3–4 мм) (n = 3) Groups 3 (1.51–3.00 mm) and 4 (3–4 mm) (n = 3)	5-я группа (>4,0 мм) (n = 5) Group 5 (>4.0 mm) (n = 5)
	Критерий Краскела–Уоллиса, p < 0,05 Kruskal–Wallis test, p < 0.05			
4EBP1	15,46 (0,50; 30,42)	17,89 (2,06; 67,00)	1,65 (0,15; 0,18)*. **	2,21 (2,00; 2,58)***
АКТ	32,06 (0,13; 64,00)	0,95 (0,66; 1,00)	2,63 (0,21; 5,05)	0,71 (0,33; 4,00)
c-RAF	4,30 (0,50; 8,10)	0,73 (0,18; 32,55)	0,27 (0,07; 0,47)*	3,45 (0,50; 4,00)***
GSK-3β	16,02 (0,04; 32,00)	1,26 (0,76; 19,13)	3,82 (0,47; 7,18)	0,78 (0,26; 1,00)**
70 S6 киназа 70 S6 kinase	5,00 (2,00; 8,00)	1,11 (0,83; 1,93)*	0,88 (0,63; 1,13)*	1,00 (0,25; 1,87)*
mTOR	6,75 (6,66; 6,85)	1,42 (0,43; 2,23)*	2,51 (1,90; 3,12)*	1,35 (1,00; 8,00)
PDK1	4,50 (1,00; 8,00)	0,75 (0,30; 1,48)	1,79 (0,64; 2,95)	0,80 (0,49; 2,93)
PTEN	2,50 (1,00; 4,00)	1,39 (0,44; 3,14)	0,34 (0,31; 0,37)*. **	1,00 (0,50; 1,22)***
NF-kB p65	0,36 (0,25; 0,48)	0,35 (0,06; 2,96)	1,92 (0,06; 3,79)	1,00 (0,28; 2,00)
NF-kB p50	4,62 (2,00; 7,24)	2,35 (0,84; 17,85)	0,26 (0,13; 0,40)*. **	1,04 (1,00; 1,22)*. ***
VEGFR2	1,50 (1,00; 2,00)	0,59 (0,11; 2,50)	11,64 (0,57; 22,71)	1,31 (1,00; 1,39)
VEGF	3,24 (2,48; 4,00)	1,27 (0,28; 33,00)	1,73 (0,91; 2,55)	1,00 (0,07; 4,68)
CAIX	6,28 (0,25; 12,31)	0,83 (0,34; 8,50)	2,94 (0,08; 5,80)	1,61 (1,00; 2,00)
HIF-1	9,00 (2,00; 16,00)	0,87 (0,34; 128,62)	0,25 (0,06; 0,45)*. **	8,00 (1,40; 16,00)***
HIF-2	4,50 (1,00; 8,00)	1,56 (0,58; 9,00)	9,17 (0,35; 17,99)	0,99 (0,00; 1,00)*. **
VHL	16,34 (0,68; 32,00)	3,02 (1,43; 4,52)	1,19 (0,28; 2,10)	1,00 (1,00; 1,20)
PD-1	2,64 (1,85; 3,43)	1,25 (0,44; 3,00)	4,84 (0,27; 9,42)	0,50 (0,50; 1,99)
PD-L1	8,00 (8,00; 8,00)	0,75 (0,37; 1,38)*	2,01 (0,29; 3,73)*	1,60 (0,02; 2,00)*
PD-L2	7,39 (2,00; 12,79)	0,66 (0,26; 4,41)*	2,96 (1,44; 4,48)	0,39 (0,25; 1,75)*
AMPK	10,00 (4,00; 16,00)	2,42 (0,43; 3,98)*	6,82 (0,06; 13,59)	1,00 (1,00; 3,75)*
LC3B	16,50 (1,00; 32,00)	0,31 (0,14; 32,19)	0,08 (0,04; 0,13)*	2,39 (1,00; 64,00)***

*Значимость различий с 1-й группой, p < 0,05. **Значимость различий со 2-й группой, p < 0,05. ***Значимость различий с 3-й и 4-й группами, p < 0,05.

*Significance of differences compared to the 1st group, p < 0.05. **Significance of differences compared to the 2nd group, p < 0.05. ***Significance of differences compared to the 3rd and 4th groups, p < 0.05.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования выявлены молекулярные особенности меланом, определяющие характер развития заболевания, в частности рост экспрессии 70 S6 киназы и VHL, что свидетельствует об активации сигнального каскада АКТ/мTOR и процессов неоангиогенеза. При этом наличие признаков изъязвления опухоли ассоциировано с низким уровнем мРНК c-RAF, NF-kB

p50 и HIF-1 на фоне повышения экспрессии HIF-2. Вероятно, активное распространение опухоли происходит из-за развития гипоксии, которая является главным индуктором роста и развития новых сосудов [18].

Исследование молекулярных особенностей опухоли в связи с толщиной опухоли по Бреслоу позволило выявить влияние транскрипционных и ростовых факторов на интенсивность процессов внутриклеточ-

ного сигналинга, модификации микроокружения, процессов аутофагии и неоангиогенеза. При анализе данных показателей отмечался вариабельный характер течения заболевания. Самые низкие уровни экспрессии 4EBP1, c-RAF, 70 S6 киназы и PTEN выявлены для опухолей толщиной 1,51–3 и 3–4 мм, при этом увеличение данных показателей зафиксировано у больных с опухолью толщиной >4 мм. Вероятно, активность процессов онкогенеза опосредуется за счет модификации экспрессии компонентов сигнальных каскадов, транскрипционных и ростовых факторов.

Данные, полученные в настоящем исследовании, подтверждают большую роль биологических характеристик опухоли в формировании ее клинических особенностей. Значимость сигнального каскада АКТ/ mTOR отмечена для меланом при отсутствии мутации *BRAF*^{V600E}. С учетом гетерогенности данной мутации значимыми для онкогенеза становятся процессы аутофагии [8, 9]. Показано, что рост экспрессии LC3B — ключевого белка аутофагосом [10, 11] — может определять особенности агрессивного роста опухоли.

В то же время известно, что модификация иммуногенности опухоли и влияние гипоксии способны изменять агрессивные свойства опухоли [13, 14, 17]. Это связано с вовлеченностью большого количества иммунокомпетентных клеток в процессы онкогенеза и изменения мишени для активации противоопухолевого иммунитета. Данные факты были также подтверждены в настоящем исследовании. Выявлено повышение экспрессии транскрипционных факторов HIF-1 и HIF-2, а также снижение экспрессии рецептора PD-1 и его лигандов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлены молекулярные и биологические особенности меланом, связанные с инвазивным ростом опухоли. Увеличение экспрессии 70 S6 киназы и VHL характерно для злокачественных опухолей кожи. Изменение экспрессии транскрипционных характеристик факторов и ключевых маркеров онкогенеза связано с формированием инвазивного потенциала опухоли.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Arnold M., Singh D., Laversanne M. et al. Global burden of cutaneous melanoma in 2020 and projections to 2040. *JAMA Dermatol* 2022;158(5):495–503. DOI: 10.1001/jamadermatol.2022.0160
2. Rabbie R., Ferguson P., Molina-Aguilar C. et al. Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. *J Pathol* 2019;247(5):539–51. DOI: 10.1002/path.5213
3. Tehranian C., Fankhauser L., Harter P.N. et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway as a preventive target in melanoma brain metastasis. *Neuro Oncol* 2022;24(2):213–25. DOI: 10.1093/neuonc/noab159
4. Ito T., Hashimoto H., Kaku-Ito Y. et al. Nail apparatus melanoma: current management and future perspectives. *J Clin Med* 2023; 12(6):2203. DOI: 10.3390/jcm12062203
5. Manzano J.L., Martin-Liberal J., Fernández-Morales L.A. et al. Adjuvant dabrafenib and trametinib for patients with resected BRAF-mutated melanoma: DESCRIBE-AD real-world retrospective observational study. *Melanoma Res* 2023;33(5):388–97. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000888
6. Johnson D.B., Menzies A.M., Zimmer L. et al. Acquired BRAF inhibitor resistance: a multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms. *Eur J Cancer* 2015;51(18):2792–9. DOI: 10.1016/j.ejca.2015.08.022
7. Schadendorf D., van Akkooi A.C.J., Berking C. et al. Melanoma. *Lancet* 2018;392(10151):971–84. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31559-9
8. Teixeira C., Castillo P., Martinez-Vila C. et al. Molecular markers and targets in melanoma. *Cells* 2021;10(9):2320. DOI: 10.3390/cells10092320
9. Ito T., Tanaka Y., Murata M. et al. BRAF heterogeneity in melanoma. *Curr Treat Options Oncol* 2021;22(3):20. DOI: 10.1007/s11864-021-00818-3
10. Long J., Pi X. Polyphyllin I promoted melanoma cells autophagy and apoptosis via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Biomed Res Int* 2020;2020:5149417. DOI: 10.1155/2020/5149417
11. Zhang Z., Richmond A., Yan C. Immunomodulatory properties of PI3K/AKT/mTOR and MAPK/MEK/ERK inhibition augment response to immune checkpoint blockade in melanoma and triple-negative breast cancer. *Int J Mol Sci* 2022;23(13):7353. DOI: 10.3390/ijms23137353
12. Спирина Л.В., Чижевская С.Ю., Кондакова И.В. Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/М-ТОР сигнального пути в ткани папиллярного рака щитовидной железы. *Проблемы эндокринологии* 2018;64(4):208–15. DOI: 10.14341/probl9310
13. Spirina L.V., Chizhevskaya S.Yu., Kondakova I.V. Expression of transcription, growth factors and components of the AKT/MTOR signaling pathway in papillary thyroid cancer tissue. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology* 2018;64(4):208–15. (In Russ.). DOI: 10.14341/probl9310
14. Deng G., Zeng F., Su J. et al. BET inhibitor suppresses melanoma progression via the noncanonical NF-κB/SPP1 pathway. *Theranostics* 2020;10(25):11428–43. DOI: 10.7150/thno.47432
15. Malekan M., Ebrahimzadeh M.A., Sheida F. The role of hypoxia-inducible factor-1α and its signaling in melanoma. *Biomed Pharmacother* 2021;141:111873. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111873
16. Das R., Mehta D.K., Dhanawat M. Medicinal plants in cancer treatment: contribution of nuclear factor-kappa B (NF-κB) inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 2022;22(15):1938–62. DOI: 10.2174/1389557522666220307170126
17. Chen G., Huang A.C., Zhang W. et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 2018;560(7718):382–6. DOI: 10.1038/s41586-018-0392-8
18. Nanamori H., Sawada Y. Epigenetic modification of PD-1/PD-L1-mediated cancer immunotherapy against melanoma. *Int J Mol Sci* 2022;23(3):1119. DOI: 10.3390/ijms23031119
19. Finger E.C., Cheng C.F., Williams T.R. et al. CTGF is a therapeutic target for metastatic melanoma. *Oncogene* 2014;33(9):1093–100. DOI: 10.1038/onc.2013.47

Вклад авторов

К.В. Никульников, С.Ю. Чижевская, В.И. Чернов: сбор и анализ клинических данных;
В.А. Богданова, Л.В. Спирина: проведение лабораторных исследований, написание текста статьи;
Е.Л. Чойнзонов, И.В. Кондакова: финансовое сопровождение.

Author's contribution

K.V. Nikulnikov, S.Yu. Chizhevskaya, V.I. Chernov: collection and analysis of clinical data;
V.A. Bogdanova, L.V. Spirina: conducting laboratory research, article writing;
E.L. Choinzonov, I.V. Kondakova: financial support.

ORCID авторов / ORCID authors

К.В. Никульников / K.V. Nikulnikov: <https://orcid.org/0009-0004-7211-7686>
В.А. Богданова / V.A. Bogdanova: <https://orcid.org/0009-0003-8473-4182>
Л.В. Спирина / L.V. Spirina: <https://orcid.org/0000-0002-5269-736X>
С.Ю. Чижевская / S.Yu. Chizhevskaya: <https://orcid.org/0000-0003-2974-4778>
И.В. Кондакова / I.V. Kondakova: <https://orcid.org/0000-0002-0947-8778>
Е.Л. Чойнзонов / E.L. Choinzonov: <https://orcid.org/0000-0002-3651-0665>
В.И. Чернов / V.I. Chernov: <https://orcid.org/0000-0001-8753-7916>

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was conducted without sponsorship.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института онкологии ФГБУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр» Российской академии наук.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences.

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

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-55-78>

Динамика экспрессии микроРНК внематочных везикул мочи больных раком предстательной железы после радикальной простатэктомии

Е.В. Шутко^{1,2}, О.Е. Брызгунова¹, И.А. Остальцев³, С.В. Пак³, С.Э. Красильников³, П.П. Лактионов^{1,3}, М.Ю. Коношенко¹

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, 1;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России; Россия, 630055 Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

Контакты: Екатерина Викторовна Шутко katshutko@gmail.com

Введение. Известно, что лечение онкологических заболеваний, в том числе рака предстательной железы (РПЖ), вызывает изменения экспрессии онкогенных и онкосупрессорных микроРНК. Анализ динамики их экспрессии может быть использован для прогнозирования течения заболевания и ответа на терапию. Тем не менее влияние лечения РПЖ на экспрессию внематочных микроРНК только начинает исследоваться.

Цель исследования – изучить динамику экспрессии 14 микроРНК (miR-19b, -22-3p, -30e, -31, -92a, -125b, -144, -200b, -205, -222, -375, -378a, -425, -660) внематочных везикул мочи больных РПЖ после радикальной простатэктомии и выявить прогностические пары микроРНК.

Материалы и методы. Исследованы образцы мочи 18 доноров и 18 больных РПЖ, полученные до радикальной простатэктомии, через 1 нед и спустя 3 мес после операции. Внематочные везикулы выделены методом агрегации–преципитации, их микроРНК – с использованием стекловолнистых сорбентов и октановой кислоты. С помощью обратной транскрипции – петлевой полимеразной цепной реакции (TaqMan) – получены данные о пороговых циклах детекции 14 микроРНК.

Результаты. Обнаружено, что радикальная простатэктомия вызывает достоверное изменение относительной экспрессии 44 пар микроРНК во внематочных везикулах мочи больных РПЖ. Можно выделить 4 группы пар микроРНК: 1) пары микроРНК, уровень экспрессии которых достоверно различался между донорами и больными РПЖ до операции и достоверно изменялся у больных РПЖ через 3 мес после нее по направлению к уровню доноров (6 пар); 2) пары микроРНК, уровень экспрессии которых достоверно не различался между донорами и больными РПЖ до операции, однако через 3 мес после нее достоверно отличался от исходного у больных РПЖ и доноров (5 пар); 3) пары микроРНК, на основании данных об относительной экспрессии которых больных РПЖ через 3 мес после радикальной простатэктомии можно разделить на 2 или 3 достоверно различающиеся подгруппы (19 пар); 4) пары микроРНК, достоверно не изменившие свою экспрессию после операции (30 пар).

Заключение. Радикальная простатэктомия вызывает значительное изменение уровня экспрессии микроРНК внематочных везикул мочи. На основании анализа динамики экспрессии микроРНК после этой операции выявлены 6 пар микроРНК, уровень относительной экспрессии которых после хирургического вмешательства достоверно изменялся в сторону ее уровня у здоровых доноров, и 19 пар микроРНК, по уровню относительной экспрессии которых больные РПЖ разделялись на 2 достоверно различные подгруппы через 3 мес после радикальной простатэктомии.

Ключевые слова: рак предстательной железы, микроРНК, внематочные везикулы мочи, радикальная простатэктомия, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, динамика микроРНК после лечения рака

Для цитирования: Шутко Е.В., Брызгунова О.Е., Остальцев И.А. и др. Динамика экспрессии микроРНК внематочных везикул мочи больных раком предстательной железы после радикальной простатэктомии. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):55–78. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-55-78>

Dynamics of miRNA expression in urine extracellular vesicles of prostate cancer patients after radical prostatectomy

E.V. Shutko^{1,2}, O.E. Bryzgunova¹, I.A. Ostal'cev³, S.V. Pak³, S.E. Krasi'nikov³, P.P. Laktionov^{1,3}, M.Yu. Konoshenko¹

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

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

³E.N. Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of Russia; 15 Rechkunovskaya St., Novosibirsk 630055, Russia

Contacts: Ekaterina Viktorovna Shutko katshutko@gmail.com

Introduction. It is known that the treatment of oncological diseases including prostate cancer (PCa) causes changes in the expression of oncogenic and oncosuppressive miRNAs. The analysis of miRNA expression dynamics can be used to predict the course of the disease and its response to therapy. However, the effect of PCa therapy on the expression of extracellular miRNAs is just beginning to be investigated.

Aim. To study the expression dynamics of 14 miRNAs (miR-19b, -22-3p, -30e, -31, -92a, -125b, -144, -200b, -205, -222, -375, -378a, -425, -660) in urine extracellular vesicles of PCa patients after radical prostatectomy and to reveal prognostic miRNA ratios.

Materials and methods. Urine samples of 18 donors and 18 PCa patients, obtained before radical prostatectomy, 1 week and 3 months after surgery, were examined. Extracellular vesicles were isolated by aggregation-precipitation protocol; extracellular vesicles miRNAs were isolated using fiberglass sorbents and octane acid. Data on threshold detection cycles of 14 miRNAs were obtained using reverse transcription – loop polymerase chain reaction (TaqMan).

Results. It was found that prostatectomy causes a significant change in the relative expression of 44 miRNA ratios in the urine of PCa patients. Four groups of miRNA ratios can be distinguished: 1) miRNA ratios, which expression level significantly differed between donors and PCa patients before surgery and significantly changed in PCa patients 3 months after prostatectomy in the direction of the level of donors (6 pairs); 2) miRNA ratios, which expression did not significantly differ between donors and PCa patients before surgery, but significantly differed from the baseline in PCa patients and donors 3 months after prostatectomy (5 pairs); 3) miRNA ratios, based on expression ratios of which PCa patients can be divided into two or three significantly different subgroups 3 months after prostatectomy (19 pairs); 4) miRNA ratios that did not significantly change their expression after prostatectomy (30 pairs).

Conclusion. Prostatectomy causes a significant change in the level of expression of miRNA in urine. 6 pairs of miRNAs, the relative expression of which after surgery significantly changed towards that of healthy donors and 19 pairs of miRNAs, according to the level of relative expression of which patients with prostate cancer were divided into two significantly different subgroups 3 months after prostatectomy, were identified based on the analysis of the dynamics of miRNA expression after prostatectomy.

Keywords: prostate cancer, miRNA, extracellular vesicles of urine, radical prostatectomy, reverse transcription polymerase chain reaction, miRNA dynamics after cancer treatment

For citation: Shutko E.V, Bryzgunova O.E., Ostal'cev I.A. et al. Dynamics of miRNA expression in urine extracellular vesicles of prostate cancer patients after radical prostatectomy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(1):55–78. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-55-78>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время рак предстательной железы (РПЖ) занимает 1-е место по заболеваемости совместно с раком легких и 5-е место по смертности среди мужчин в России и в мире. Всего в 2020 г. зафиксированы 1 414 259 новых случаев РПЖ, что составляет 14,1 % от общего числа новых случаев злокачественных новообразований среди мужчин [1].

Радикальная простатэктомия (РПЭ) примерно в 40 % случаев является первым и обязательным шагом в лечении РПЖ [2]. Хирургическому вмешательству подвергаются пациенты с локализованной формой РПЖ и ожидаемой продолжительностью жизни более 10 лет. Радикальная простатэктомия представляет собой операцию, подразумевающую полное удаление предстательной железы в комплексе с семенными пузырьками и фрагментом мочеиспускательного канала

(уретры), который проходит через орган. Несмотря на значительное совершенствование хирургической техники, развитие рецидива после РПЭ остается актуальной проблемой. Так, у 30 % больных, перенесших оперативное вмешательство, в течение первых 10 лет после него наступает биохимический рецидив (БХР) [3].

Для прогноза течения заболевания и предсказания развития рецидива РПЖ после РПЭ в клинической практике используют такие показатели, как уровень и плотность сывороточного простатического специфического антигена (ПСА), патологоанатомическая стадия заболевания, оценка по шкале Глисона, характер хирургического края, объем опухоли, наличие/отсутствие лимфоваскулярной и периневральной инвазий [4]. Однако данные показатели характеризуются низкими чувствительностью и специфичностью [5, 6]. В настоящий момент в клинической практике отсутствуют

Таблица 1. Характеристика доноров и больных раком предстательной железы (РПЖ)
Table 1. Characteristics of donors and prostate cancer (PCa) patients

Показатель Parameter	Больные РПЖ (n = 18) PCa patients (n = 18)	Доноры Donors
Возраст, лет Age, years	61,0 ± 8,0	52,9 ± 5,2
ПСА, нг/мл: PSA, ng/ml: до РПЭ before RP через 3 мес после РПЭ 3 months after RP через 6 мес после РПЭ 6 months after RP через 9 мес после РПЭ 9 months after RP через 1 год после РПЭ 1 year after RP	8,39 ± 2,62 0,17 ± 0,24 0,30 ± 0,47 0,29 ± 0,56 0,35 ± 0,53	0,68 ± 0,47
Стадия по классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TNM), %: The stage according to the classification of Tumor, Nodus and Metastasis (TNM), %: T1 T2 T3 N0 M0	50 39 11 100 100	—
Оценка по шкале Глисона, %: Gleason score, %: 6 7 8	83 6 11	—
Стадия, %: Stage, %: II III	89 11	—

Примечание. РПЭ — радикальная простатэктомия; ПСА — простатический специфический антиген.
Note. RP — radical prostatectomy; PSA — prostatic specific antigen.

надежные маркеры эффективности лечения и предсказания развития рецидива РПЖ. Анализ ПСА также не является надежным методом оценки эффективности выполненной операции, прогнозирования течения заболевания и стратификации рисков [7, 8]. Распространенность РПЖ и его рецидивов требует совершенствования методов диагностики и оценки эффективности терапии с целью увеличения продолжительности жизни пациентов и улучшения ее качества.

В настоящее время внимание российских и зарубежных исследователей привлекают внеклеточные нуклеиновые кислоты. Изучается их потенциал в качестве биомаркеров различных заболеваний [9]. Анализ циркулирующих нуклеиновых кислот может быть использован для разработки методов диагностики онкологических заболеваний и мониторинга эффективности лечения или развития лекарственной устойчивости, а также для выбора наиболее подходящей терапии [10]. Оценка эффективности лечения с помощью жидкост-

ной биопсии позволит скорректировать или при необходимости внести принципиальные изменения в курс лечения [11]. В качестве маркеров жидкостной биопсии могут быть использованы aberrантно экспрессированные внеклеточные микроРНК, представленные в составе комплексов с белками/липопротеинами/протеогликанами или упакованные во внеклеточные везикулы (ВВ). Из литературных [12] и полученных нами ранее [13] данных известно, что РПЭ вызывает разнонаправленные изменения уровней экспрессии микроРНК. Уже были получены свидетельства того, что наибольшим потенциалом в качестве диагностических маркеров РПЖ обладают микроРНК ВВ мочи [14, 15]. Тем не менее влияние РПЭ на экспрессию внеклеточных микроРНК биологических жидкостей, так же как и возможность их использования в качестве маркеров эффективности РПЭ, остаются малоизученными [16]. Очевидно, что для поиска маркеров эффективности РПЭ необходимо исследовать динамику экспрессии микроРНК после

хирургического вмешательства в краткосрочной и длительной перспективах.

В представленной работе проанализирована динамика относительной экспрессии 14 микроРНК (hsa-miR-19b, -22-3p, -30e, -31, -92a, -125b, -144, -200b, -205, -222, -375, -378a, -425, -660), которые согласно результатам наших исследований, проведенных ранее [13, 16], а также анализу данных литературы [17–19] ассоциированы с развитием РПЖ в целом и вовлечены в механизмы развития рецидива в частности. Выполнен сравнительный анализ полученных данных с уровнем относительной экспрессии доноров, а также корреляционный анализ клинических характеристик больных до РПЭ, через 3 мес и 1 год после нее.

Цель исследования — изучить динамику экспрессии 14 микроРНК (miR-19b, -22-3p, -30e, -31, -92a, -125b, -144, -200b, -205, -222, -375, -378a, -425, -660) ВВ мочи больных РПЖ после радикальной простатэктомии и поиск прогностических пар микроРНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы мочи доноров получены из отделения переливания крови, больных РПЖ — из радиологического отделения Национального медицинского исследовательского центра им. акад. Е.Н. Мешалкина (Новосибирск, Россия) (табл. 1). Образцы мочи пациентов с РПЖ были взяты до РПЭ и повторно через 1 нед и 3 мес после операции для оценки динамики относительной экспрессии микроРНК. Дополнительную терапию до и после РПЭ больные не получали.

Образцы мочи больных РПЖ и доноров центрифугировали в течение 20 мин при 400g и при комнатной температуре (центрифуга MLW K70D) для осаждения клеток. Отбирали супернатант и центрифугировали в течение 20 мин при 17 000g и 24 °C для осаждения клеточного дебриса (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Внеклеточные везикулы выделены из образцов мочи методом, разработанным ранее и основанным на агрегации—преципитации с использованием полиэтиленгликоля (Sigma-Aldrich, США) и декстрана синего (Ferak Berlin GmbH, Германия) [20]. Из полученной фракции ВВ с применением β-меркаптоэтанола (PanReac AppliChem, Германия), гуанидин тиоцианата (Sigma-Aldrich, США) и октановой кислоты (Sigma Life Science, США) выделены микроРНК методом, описанным ранее [21]. С помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени получены данные о пороговых циклах детекции каждой микроРНК в образцах доноров. Праймеры и флуоресцентно-меченные зонды, используемые для постановки реакций, синтезированы в лаборатории биомедицинской химии Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск, Россия). Относительную экспрессию микроРНК анализировали в 2 постановках (сетах): в 1-й постановке

анализировали экспрессию miRNA-19b, -30e, -31, -92a, -125b, -200b, -205, -375, -660, во 2-й — miRNA-19b, -22-3p, -30e, -125b, -144, -222, -378a, -425. Для эффективной оценки всех возможных комбинаций любых двух микроРНК внутри одного сета выполнена попарная нормализация, так как результаты анализа экспрессии каждой отдельно взятой микроРНК могут быть искажены из-за влияния множества внешних и внутренних факторов [22, 23]. Поскольку экспрессия микроРНК оценивалась в двух разных наборах микроРНК, нормализация проводилась только внутри каждого сета. Таким образом, были сформированы 60 соотношений микроРНК. Для дальнейшего анализа рассчитаны значения dCt (разница пороговых циклов) каждой пары микроРНК внутри сета.

Далее проанализировано распределение значений dCt с помощью теста Шапиро—Уилка. Достоверность межгрупповых различий оценена с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Данные об изменении относительной экспрессии микроРНК после РПЭ проанализированы с помощью дисперсионного анализа ANOVA для повторных измерений. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$ (программа MedCalc Statistical Software).

РЕЗУЛЬТАТЫ

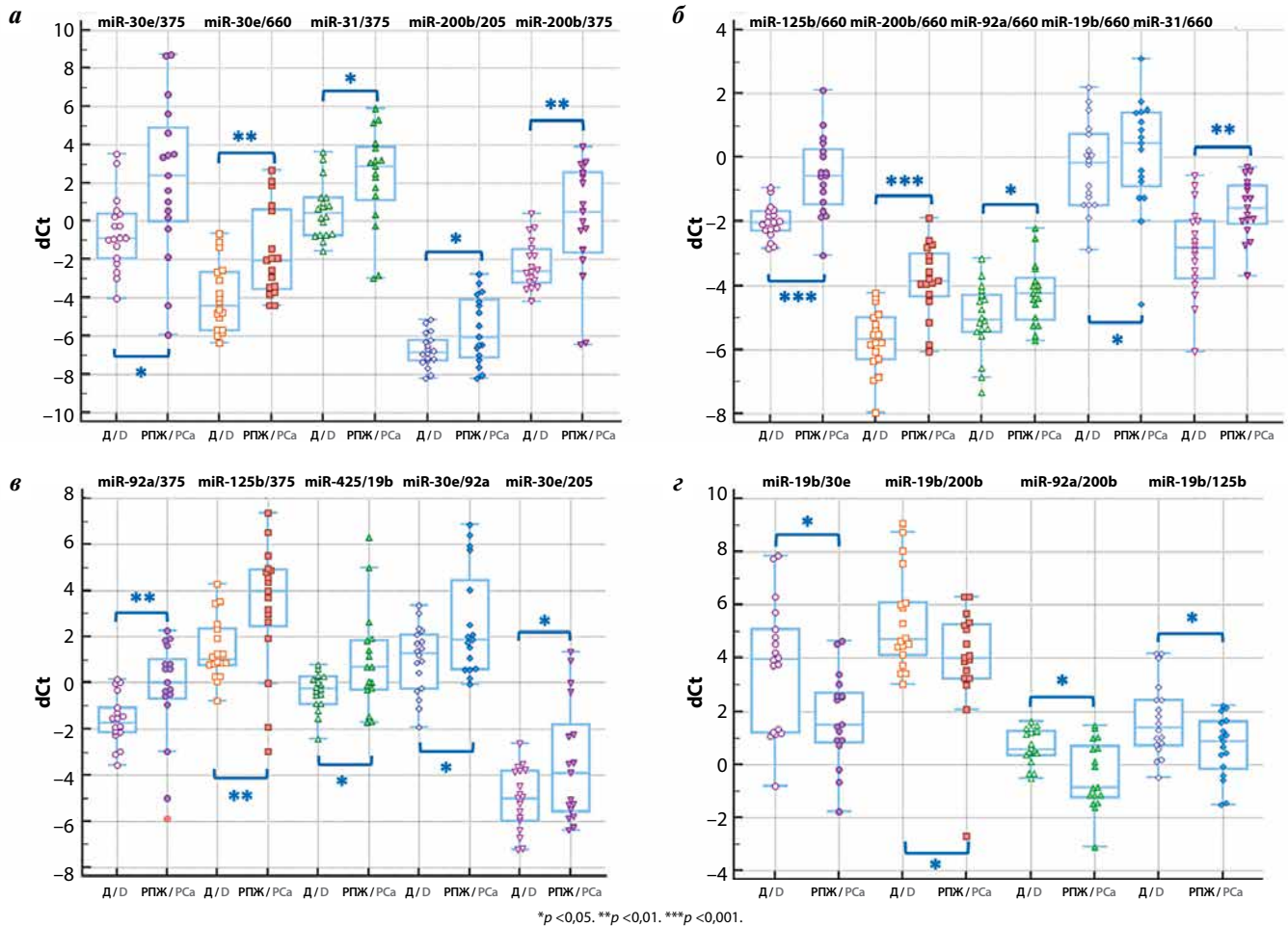
В настоящей работе проанализирована динамика относительной экспрессии 14 микроРНК (в составе 60 пар), вовлеченных в регуляцию РПЖ [13, 24–26], до и после РПЭ. Источником микроРНК служили ВВ, которые выделяли из образцов мочи больных РПЖ, полученных до и после операции (через 1 нед, 3, 6, 9 и 12 мес после РПЭ) и доноров в качестве контрольной группы.

Выявлены 19 пар микроРНК, дифференциально экспрессированных у первичных больных РПЖ до РПЭ по сравнению с донорами (рис. 1, а–г). При этом miRNA-30e, -92a, -200b, -375 и -660 входили в состав наибольшего количества дифференциально экспрессированных пар микроРНК: при участии miRNA-660 сформированы 6 таких пар, miRNA-19b, -30e, -200b, -375 — 5 пар, miRNA-92a — 4 пары.

Показано, что 44 пары микроРНК ВВ, формируемые 14 микроРНК мочи больных РПЖ, статистически значимо изменяли экспрессию микроРНК после РПЭ (табл. 2). Кроме того, сравнение уровней относительной экспрессии микроРНК до и после РПЭ больных РПЖ и доноров позволило получить данные об изменении экспрессии микроРНК после операции относительно нормы (см. табл. 2).

На основании анализа динамики относительной экспрессии пар микроРНК до и после РПЭ они были разделены на 4 группы:

- 1) пары микроРНК, уровень экспрессии которых достоверно различался у доноров и больных РПЖ до операции, достоверно изменялся у больных РПЖ через 3 мес после РПЭ по направлению к уровню



*p < 0.05. **p < 0.01. ***p < 0.001.

Рис. 1. Пары микроРНК, относительная экспрессия которых достоверно различалась у больных раком предстательной железы (РПЖ) и доноров (Д): а – miR-30e/375, -30e/660, -31/375, -200b/205, -200b/375; б – miR-125b/660, -200b/660, -92a/660, -19b/660, -31/660; в – miR-92a/375, -125b/375, -425/19b, -30e/92a, -30e/205; г – miR-19b/30e, -19b/200b, -92a/200b, -19b/125b

Fig. 1. miRNA ratios, the relative expression of which significantly differs in prostate cancer (PCa) patients and donors (D): а – miR-30e/375, -30e/660, -31/375, -200b/205, -200b/375; б – miR-125b/660, -200b/660, -92a/660, -19b/660, -31/660; в – miR-92a/375, -125b/375, -425/19b, -30e/92a, -30e/205; г – miR-19b/30e, -19b/200b, -92a/200b, -19b/125b

- доноров (miRNA-92a/375, -125b/375, -205/375) или достигал такого (miRNA-19b/200b, -30e/205, -30e/660) (6 пар; рис. 2, а);
- 2) пары микроРНК, уровень экспрессии которых достоверно не различался у доноров и больных РПЖ до РПЭ, достоверно отличался от исходного у пациентов с РПЖ и доноров через 3 мес после операции (miRNA-19b/222, -19b/375, -30e/222, -92a/205, -375/660) (5 пар; рис. 2, б);
 - 3) пары микроРНК, на основании данных об относительной экспрессии которых через 3 мес после РПЭ больных РПЖ можно разделить на 2 или 3 достоверно различающиеся по данному показателю подгруппы ($p < 0,001$), условно обозначенные как А, Б, В в порядке убывания значений dCt (19 пар; табл. 3; рис. 2, в);
 - 4) пары микроРНК, достоверно не изменявшие свою экспрессию через 3 мес после РПЭ согласно кри-

териям, описанным выше, или не имевшие определенного паттерна изменения экспрессии: 17 пар микроРНК, достоверно изменявших свою относительную экспрессию после РПЭ по результатам дисперсионного анализа для повторных измерений, но не принадлежавших ни к одной из вышеперечисленных групп (не имевших четкого паттерна динамики экспрессии; miRNA-19b/22-3p, -19b/92a, -19b/144, -22-3p-30e, -22-3p-222, -22-3p/425, -30e/92a, -30e/200b, -30e/378a, -30e/425, -31/92a, -31/205, -92a/125b, -92a/200b, -125b/200b (рис. 2, г), -125b/205, -378a/425); 13 пар микроРНК, достоверно не изменявших свою относительную экспрессию по результатам дисперсионного анализа для повторных измерений (miRNA-19b/30e, -19b/31, -30e/375, -31/375, -200b/375, -144/222, -144/425, -144/125b, -222/378a, -222/425, -222/125b, -378a/125b, -425/125b).

Таблица 2. Динамика относительной экспрессии микроРНК внеклеточных везикул мочи больных раком предстательной железы (РПЖ). Средняя разница уровней экспрессии (mean ddCt), среднее ± стандартное отклонение

Table 2. Dynamics of relative miRNA expression of extracellular vesicles in the urine of prostate cancer (PCa) patients. Mean difference in expression levels (mean ddCt), mean ± standard deviation

микроРНК miRNA	Сравнение пациентов с РПЖ до РПЭ, через 1 нед и через 3 мес после операции с донорами Comparison PCa patients before RP, 1 week and 3 months after RP with donors				Сравнение пациентов с РПЖ через 1 нед и через 3 мес после РПЭ с пациентами с РПЖ до РПЭ Comparison PCa patients 1 week and 3 months after RP with PCa patients before RP		Сравнение пациентов с РПЖ через 1 нед и пациентов с РПЖ через 3 мес после РПЭ Comparison PCa patients 1 week and PCa patients 3 months after RP
	До РПЭ Before RP	Через 1 нед после РПЭ 1 week after RP	Через 3 мес после РПЭ 3 months after RP	4	Через 1 нед после РПЭ 1 week after RP	Через 3 мес после РПЭ 3 months after RP	
1	2	3			5	6	7
1-я группа пар микроРНК Group 1 of miRNA ratios							
miRNA-92a/375	1,25 ± 2,50*	-5,69 ± 2,67***	-5,10 ± 1,87***		-6,95 ± 3,83***	-6,35 ± 2,34***	H/p N/d
miRNA-125b/375	1,89 ± 2,72*	-5,06 ± 2,36***	-4,26 ± 2,33***		-6,94 ± 3,64***	-6,15 ± 2,96***	H/p N/d
miRNA-205/375	0,91 ± 3,21*	-7,37 ± 2,91***	-3,74 ± 2,26***		-8,60 ± 3,92***	-4,9 ± 2,69***	3,63 ± 3,20***
miRNA-19b/200	-1,48 ± 2,63*	-1,83 ± 2,21**	H/p N/d		H/p N/d	1,94 ± 1,60**	2,29 ± 1,92***
miRNA-30e/205	1,57 ± 3,20*	2,16 ± 2,36***	H/p N/d		H/p N/d	-2,06 ± 3,23*	-2,65 ± 2,76***
miRNA-30e/660	2,35 ± 3,39***	1,13 ± 2,35*	-1,37 ± 1,63*		H/p N/d	-3,72 ± 3,69***	-2,50 ± 2,74***
2-я группа пар микроРНК Group 2 of miRNA ratios							
miRNA-19b/222	H/p N/d	H/p N/d	2,08 ± 2,21***		H/p N/d	3,04 ± 2,60**	2,50 ± 2,49***
miRNA-19b/375	H/p N/d	-6,99 ± 3,82***	-4,11 ± 2,47***		-7,83 ± 4,67***	-4,95 ± 2,66***	2,87 ± 3,02**
miRNA-30e/222	H/p N/d	1,42 ± 3,10*	2,72 ± 3,13***		H/p N/d	2,50 ± 3,73*	H/p N/d
miRNA-92a/205	H/p N/d	1,68 ± 2,06***	-1,36 ± 1,87**		1,65 ± 1,67**	-1,39 ± 2,05*	-3,04 ± 2,33***
miRNA-375/660	H/p N/d	6,34 ± 2,81***	2,86 ± 2,89**		6,79 ± 4,24***	3,31 ± 2,44**	-3,48 ± 3,84***

Продолжение табл. 2
Continuation of table 2

1	2	3	4	5	6	7
3-я группа пар микроРНК Group 3 of miRNA ratios						
miRNA-19b/205	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-19b/125b	-0,55 ± 1,55*	-1,29 ± 1,53***	H/p N/d	-0,69 ± 2,09*	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-425/19	1,31 ± 2,10*	0,06 ± 2,04**	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-22-3p/378a	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-22-3p/125b	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-22-3p/144	H/p N/d	H/p N/d	-1,85 ± 4,04*	H/p N/d	H/p N/d	-2,58 ± 4,03*
miRNA-30e/144	H/p N/d	1,31 ± 2,69*	-1,72 ± 3,27*	H/p N/d	H/p N/d	-3,03 ± 2,12***
miRNA-30e/125b	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-31/200b	H/p N/d	-1,81 ± 0,94***	H/p N/d	-1,22 ± 0,96**	H/p N/d	1,89 ± 1,41***
miRNA-31/125b	H/p N/d	-1,91 ± 1,60***	H/p N/d	-1,75 ± 1,66***	H/p N/d	1,68 ± 1,39**
miRNA-31/660	1,28 ± 1,62**	H/p N/d	H/p N/d	-1,91 ± 1,53***	-2,92 ± 3,34**	H/p N/d
miRNA-125b/660	1,44 ± 1,30***	1,29 ± 1,42***	-1,40 ± 2,11*	H/p N/d	-2,84 ± 2,72***	-2,69 ± 2,97***
miRNA-92a/660	0,81 ± 1,48*	H/p N/d	-2,34 ± 1,77***	H/p N/d	-3,05 ± 2,38***	-2,89 ± 3,26***
miRNA-200b/205	1,09 ± 2,09*	2,21 ± 1,55***	H/p N/d	1,12 ± 1,91*	-1,93 ± 2,29**	-3,05 ± 1,98***
miRNA-200b/660	1,87 ± 1,66***	1,18 ± 1,40**	-1,72 ± 1,67**	H/p N/d	-3,59 ± 2,75***	-2,90 ± 2,61***
miRNA-205/660	H/p N/d	-1,03 ± 1,86*	H/p N/d	-1,81 ± 1,76***	-1,66 ± 1,34**	H/p N/d

Окончание табл. 2
End of table 2

1	2	3	4	5	6	7
4-я группа пар микроРНК Group 4 of miRNA ratios						
miRNA-19b/22-3p	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-19b/92a	H/p N/d	-1,29 ± 2,56*	H/p N/d	H/p N/d	1,39 ± 1,37**	2,28 ± 1,61***
miRNA-19b/144	H/p N/d	H/p N/d	-2,36 ± 2,52**	H/p N/d	H/p N/d	-1,83 ± 2,02*
miRNA-22-3p/30e	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-22-3p/222	H/p N/d	H/p N/d	2,59 ± 2,67***	H/p N/d	2,66 ± 3,32**	1,75 ± 4,04*
miRNA-22-3p/425	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-30e/92a	1,54 ± 2,49*	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-30e/200b	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-30e/378a	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-30e/425	H/p N/d	1,25 ± 2,89*	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-31/92a	H/p N/d	-1,28 ± 1,74**	H/p N/d	-1,75 ± 2,03***	H/p N/d	1,87 ± 1,29***
miRNA-31/205	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-92a/125	H/p N/d	H/p N/d	-0,84 ± 1,13**	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-92a/200b	-1,09 ± 1,27**	H/p N/d	-0,50 ± 0,82*	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-125b/200b	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-125/205	H/p N/d	2,32 ± 1,93***	H/p N/d	1,65 ± 1,45**	-1,19 ± 2,37*	-2,84 ± 2,47***
miRNA-378a/425	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d

p* < 0,05. *p* < 0,01. ****p* < 0,001.
Примечание. H/p – нет достоверных различий; РПЭ – радикальная простатэктомия.
Note. N/d – no significant differences; RP – radical prostatectomy.

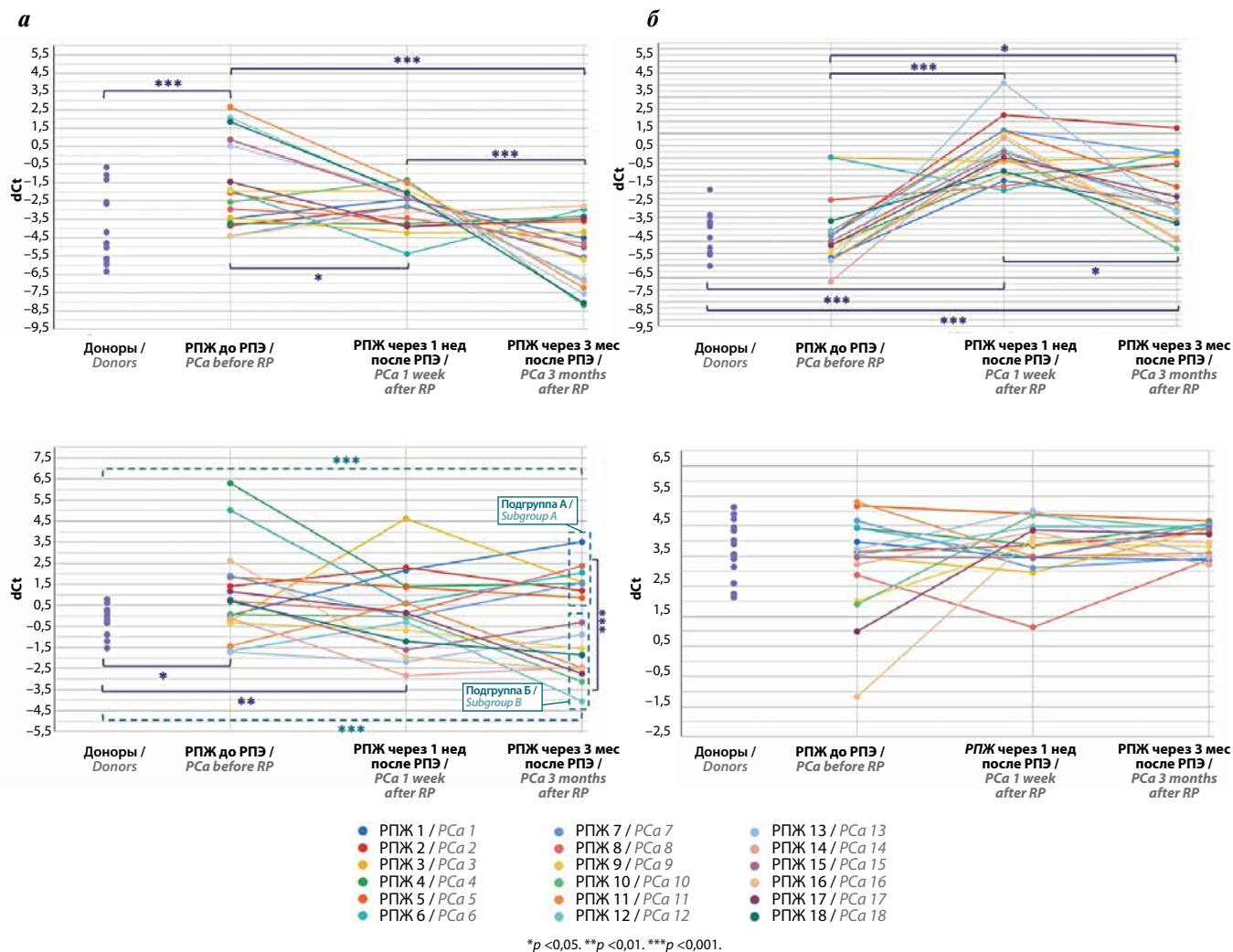


Рис. 2. Динамика относительной экспрессии (dCt) микроРНК в микровезикулах мочи больных раком предстательной железы (РПЖ): а — miRNA-30e/660 (пример 1-й группы пар микроРНК); б — miRNA-375/660 (пример 2-й группы пар микроРНК); в — miRNA-425/19b (пример 3-й группы пар микроРНК); г — miRNA-125b/200b (пример 4-й группы пар микроРНК). РПЭ — радикальная простатэктомия

Fig. 2. Dynamics of relative expression (dCt) of miRNAs in urine microvesicles of prostate cancer (PCa) patients: а — miRNA-30e/660 (an example of the Group 1 of miRNA ratios); б — miRNA-375/660 (an example of the Group 2 of miRNA ratios); в — miRNA-425/19b, an example of the Group 3 of miRNA ratios; г — miRNA-125b/200b, an example of the Group 4 of miRNA ratios. RP — radical prostatectomy

На основании данных об относительной экспрессии 19 пар микроРНК (3-я группа) через 3 мес после РПЭ ($p < 0,001$) больных можно разделить на 2 (miRNA-19b/205, -425/19b (рис. 2, в), -22-3p/378a, -22-3p/125b, -22-3p/144, -30e/125b, -30e/144, -31/125b, -31/200b, -92a/660, -200b/205, -200b/660, -205/660, -19b/125b, -144/378a, -30e/31) или 3 (miRNA-19b/378a, -31/660, -125b/660) подгруппы, условно обозначенные как А, Б и В. Следует отметить, что в подгруппы больных РПЖ вошли одни и те же пациенты с единичными исключениями, т. е. подгруппы мало различались по составу при анализе экспрессии разных пар микроРНК. При этом экспрессия некоторых пар микроРНК 3-й группы через 3 мес после РПЭ достоверно отличалась от таковой у доноров и больных РПЖ до хирургического вмешательства, а некоторых — нет (табл. 3). К 3-й группе относятся и 3 пары микроРНК (miRNA-144/378a, -19b/378a, -30e/31), для которых

методом дисперсионного анализа для повторных измерений не выявлены достоверные изменения экспрессии после РПЭ. Тем не менее значимые различия уровней экспрессии этих пар микроРНК через 3 мес после РПЭ позволили разделить пациентов на достоверно различающиеся подгруппы ($p < 0,001$) и отнести такие пары микроРНК к 3-й анализируемой группе, а не ко 2-й. Отсутствие достоверности при статистическом анализе можно объяснить широким диапазоном dCt у пациентов из разных подгрупп (А и Б или А, Б и В) через 3 мес после РПЭ, из-за чего при анализе этой временной точки в качестве единой группы (по алгоритму Repeated measures analysis of variance (ANOVA)) различия нивелируются.

В 3-й группе пар микроРНК особый интерес с точки зрения поиска маркеров рецидива представляют те пары, относительная экспрессия которых у части пациентов через 3 мес достоверно отличалась от таковой

Таблица 3. Сравнение уровней относительной экспрессии пар микроРНК, относящихся к 3-й группе (с разделением пациентов на подгруппы), у пациентов с раком предстательной железы (РПЖ) через 3 мес после радикальной простатэктомии (РПЭ) с уровнями до операции и через 1 нед после нее. Средняя разница уровней экспрессии (mean ddCt), среднее ± стандартное отклонение

Table 3. Comparison of the relative expression levels of microRNA pairs belonging to group 3 (with the division of patients into subgroups) in patients with prostate cancer (prostate cancer) 3 months after radical prostatectomy (RP) with the levels before surgery and 1 week after it. The mean difference in expression levels (mean ddCt), mean ± standard deviation

Пары микроРНК microRNA pairs		Сравнение с донорами Compared with donors	Сравнение с пациентами с РПЖ до РПЭ Comparison with PCa patients before RP	Сравнение с пациентами с РПЖ через 1 нед после РПЭ Comparison with PCa patients 1 week after RP
miRNA-19b/205	Подгруппа А Subgroup A	H/p N/d	H/p N/d	0,32 ± 1,15***
	Подгруппа Б Subgroup B	H/p N/d	H/p N/d	−1,97 ± 1,17***
miRNA-425/19b	Подгруппа А Subgroup A	2,06 ± 1,06***	H/p N/d	2,07 ± 1,84**
	Подгруппа Б Subgroup B	−2,19 ± 1,07***	−3,37 ± 2,12***	−2,18 ± 1,93**
miRNA-22-3p/378a	Подгруппа А Subgroup A	5,51 ± 2,24***	4,84 ± 2,72***	4,60 ± 3,04**
	Подгруппа Б Subgroup B	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-22-3p/125b	Подгруппа А Subgroup A	4,14 ± 1,67***	3,61 ± 2,62**	4,17 ± 2,14**
	Подгруппа Б Subgroup B	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-22-3p/144	Подгруппа А Subgroup A	H/p N/d	1,30 ± 1,89*	H/p N/d
	Подгруппа Б Subgroup B	−4,32 ± 1,45***	−3,95 ± 1,70***	−5,05 ± 2,80***
miRNA-30e/125b	Подгруппа А Subgroup A	3,44 ± 1,96***	2,63 ± 1,82**	2,90 ± 1,00***
	Подгруппа Б Subgroup B	H/p N/d	−1,77 ± 1,99*	−1,50 ± 0,89***
miRNA-30e/144	Подгруппа А Subgroup A	H/p N/d	H/p N/d	−1,75 ± 2,11**
	Подгруппа Б Subgroup B	−4,80 ± 1,77***	−4,72 ± 3,19**	−6,11 ± 1,93***
miRNA-31/125b	Подгруппа А Subgroup A	1,01 ± 1,25*	1,17 ± 1,05**	2,93 ± 1,42***
	Подгруппа Б Subgroup B	−1,34 ± 1,22**	−1,18 ± 1,11**	H/p N/d
miRNA-31/200b	Подгруппа А Subgroup A	1,24 ± 0,83***	1,83 ± 0,99***	3,05 ± 0,98***
	Подгруппа Б Subgroup B	−1,23 ± 0,71***	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-31/660	Подгруппа А Subgroup A	2,92 ± 1,39***	1,64 ± 0,98**	3,59 ± 1,34***
	Подгруппа Б Subgroup B	H/p N/d	−1,53 ± 1,07**	H/p N/d
	Подгруппа В Subgroup C	−4,55 ± 1,58***	−5,82 ± 1,06***	−3,88 ± 1,36***

Окончание табл. 3
End of table 3

Пары микроРНК microRNA pairs		Сравнение с донорами Compared with donors	Сравнение с пациентами с РПЖ до РПЭ Comparison with PCa patients before RP	Сравнение с пациентами с РПЖ через 1 нед после РПЭ Comparison with PCa patients 1 week after RP
miRNA-125b/660	Подгруппа А Subgroup A	1,72 ± 0,48***	H/p N/d	H/p N/d
	Подгруппа Б Subgroup B	−0,69 ± 0,43**	−2,18 ± 1,14***	−1,99 ± 1,38***
	Подгруппа В Subgroup C	−3,82 ± 0,51***	−5,31 ± 1,14***	−5,12 ± 1,45***
miRNA-92a/660	Подгруппа А Subgroup A	H/o N/a	−0,96 ± 1,14*	H/p N/d
	Подгруппа Б Subgroup B	−4,09 ± 1,39***	−4,90 ± 1,03***	−4,74 ± 1,76***
miRNA-200b/205	Подгруппа А Subgroup A	H/p N/d	H/p N/d	−2,03 ± 1,37***
	Подгруппа Б Subgroup B	−2,72 ± 0,97***	−3,81 ± 1,79***	−4,93 ± 1,38***
miRNA-200b/660	Подгруппа А Subgroup A	H/p N/d	−1,97 ± 1,29***	−1,28 ± 1,76*
	Подгруппа Б Subgroup B	−4,03 ± 1,05***	−5,90 ± 1,22***	−5,22 ± 1,62***
miRNA-205/660	Подгруппа А Subgroup A	H/p N/d	H/p N/d	1,13 ± 1,69*
	Подгруппа Б Subgroup B	−3,24 ± 1,28***	−4,01 ± 1,17***	−2,21 ± 1,72*
miRNA-19b/125b	Подгруппа А Subgroup A	2,24 ± 1,31***	2,60 ± 1,45***	3,53 ± 2,02***
	Подгруппа Б Subgroup B	−2,05 ± 0,83***	−1,69 ± 1,04***	H/p N/d
miRNA-144/378a	Подгруппа А Subgroup A	1,23 ± 2,13***	2,31 ± 2,93***	4,73 ± 3,50***
	Подгруппа Б Subgroup B	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-30e/31	Подгруппа А Subgroup A	2,10 ± 1,43***	H/p N/d	H/p N/d
	Подгруппа Б Subgroup B	−1,84 ± 1,37***	−3,05 ± 2,04***	−3,67 ± 1,70***
miRNA-19b/378a	Подгруппа А Subgroup A	3,86 ± 1,39***	4,03 ± 2,89***	4,09 ± 2,60***
	Подгруппа Б Subgroup B	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
	Подгруппа В Subgroup C	−3,73 ± 1,34***	−3,56 ± 2,62*	−3,50 ± 2,54*

p* < 0,05. *p* < 0,01. ****p* < 0,001.
Примечание. В подгруппу А включены больные РПЖ, у которых уровень относительной экспрессии пары микроРНК через 3 мес после РПЭ достоверно превышал таковой у больных подгруппы Б. В подгруппу Б вошли пациенты с РПЖ, у которых относительная экспрессия пары микроРНК через 3 мес после РПЭ достоверно превышала таковую у пациентов подгруппы В. Н/р — нет достоверных различий.
Note. Subgroup A includes PCa patients, whose relative expression 3 months after RP significantly exceeds that in patients of Subgroup B. Subgroup B includes PCa patients, whose relative expression 3 months after RP significantly exceeds that in patients of subgroup C. N/d — no significant differences.

у доноров, при этом направленность различий соответствовала различиям между донорами и больными до РПЭ. К таким микроРНК относятся пары miRNA-425/19b, -31/200b, -31/125b, -31/660, -92a/660, -22-3p/125b, -22-3p/378a, -200b/205, -200b/660, -205/660.

Через 1 год после РПЭ у 2 больных РПЖ уровень ПСА плазмы крови превышал 1,25 нг/мл, что свидетельствует о неблагоприятном прогнозе. Более того, у 1 из этих пациентов через 1 год после операции были обнаружены вторичные изменения в тазовых лимфатических узлах. По значениям уровней относительной экспрессии пар miRNA-22-3p/378a, -22-3p/125b, -22-3p/144, -30e/125b, -30e/144, -31/660, -92a/660, -200b/205, -200b/660, -205/660, -144/378a, -19b/378a эти больные вошли в подгруппу пациентов, уровни относительной экспрессии микроРНК ВВ мочи которых достоверно отличались от данного показателя у доноров (табл. 3). В другую подгруппу, в которой относительная экспрессия вышеупомянутых пар микроРНК не отличалась от их экспрессии у доноров, вошли пациенты, у которых спустя 1 год после операции не были выявлены признаки рецидива и уровень ПСА не превышал 0,2 нг/мл (за исключением 2 больных, у которых данный показатель оказался равным 0,3 и 0,5 нг/мл). Относительная экспрессия этих пар микроРНК у доноров и пациента с изначально неблагоприятным прогнозом в связи с положительным хирургическим краем после операции, но без признаков рецидива через 1 год после операции не различалась.

В 4-ю группу пар микроРНК, относительная экспрессия которых не изменялась после РПЭ или не имела определенного паттерна ее изменения, вошли 30 пар микроРНК. Из них уровень экспрессии 11 пар микроРНК у пациентов ни до, ни после хирургического вмешательства не отличался от такового у доноров (см. табл. 2). В связи с этим можно полагать, что данные микроРНК не играют значительной роли в биологических процессах в ответ на РПЭ и малопригодны в качестве маркеров эффективности такого вида лечения РПЖ. Также в эту группу вошли 6 пар микроРНК, относительная экспрессия которых достоверно различалась у доноров и больных РПЖ до РПЭ (miRNA-30e/92a, -92a/200b ($p < 0,05$)) или через 1 нед после нее (miRNA-19b/92a, -30e/425 ($p < 0,05$)), -31/92a ($p < 0,01$), -125b/205 ($p < 0,001$). Однако устойчивых изменений относительной экспрессии через 3 мес после РПЭ не наблюдалось, поэтому данные пары микроРНК нельзя отнести к 1-й и 2-й группам.

С помощью критерия Спирмена была оценена корреляция уровней относительной экспрессии исследуемых микроРНК с клинико-патологическими характеристиками больных РПЖ: возрастом, уровнем ПСА, оценкой по шкале Глисона. Корреляция хотя бы с одним из клинических параметров выявлена для 20 пар микроРНК. При этом для пары miRNA-31/125b корреляция наибольшей силы наблюдалась с возра-

стом доноров ($k = -0,67$; $p = 0,004$), для пары miRNA-30e/660 – с уровнем ПСА ($k = -0,63$, $p = 0,007$) и для пары miRNA-22-3p/30e – с оценкой опухоли по шкале Глисона ($k = 0,65$; $p = 0,004$). Обнаруженная в большинстве остальных случаев корреляционная связь с возрастом пациентов была слабой или умеренной и не обладала высоким уровнем достоверности. Таким образом, относительная экспрессия выбранных для исследования микроРНК в малой степени зависит от возраста, что повышает привлекательность маркера для диагностики и прогноза эффективности терапии РПЖ. Выявлены корреляционные связи, p -уровни их значимости и коэффициенты корреляции Спирмена (табл. 4). Кроме того, выполнена оценка корреляционной связи между уровнем ПСА крови пациентов через 1 год после РПЭ и уровнями относительной экспрессии микроРНК до и после операции (табл. 5). Для 12 пар микроРНК обнаружена статистически значимая связь (как положительная, так и отрицательная) между уровнями ПСА через 1 год после операции и экспрессией микроРНК в одной из исследуемых временных точек.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение уровня экспрессии каждой микроРНК в процессе лечения онкологических заболеваний и после хирургического вмешательства или курса противоопухолевой терапии зависит от того, как микроРНК вовлечена в канцерогенез и физиологические процессы. В многочисленных исследованиях показано, что экспрессия внеклеточных микроРНК при РПЖ значительно отличается от таковой у доноров, и измерение концентраций данных микроРНК в биологических жидкостях имеет диагностическую ценность [24–27]. Это согласуется с полученными в настоящей работе данными: выявлены 19 пар микроРНК, дифференциально экспрессированных у доноров и больных РПЖ до лечения. Проанализирован уровень относительной экспрессии микроРНК до РПЭ и через 1 нед и 3 мес после операции. Таким образом, выбраны точки изменения экспрессии микроРНК сразу после РПЭ (через 1 нед, в момент выписки) и через 3 мес, в момент первичной после хирургического вмешательства оценки клинических показателей пациента (таких как ПСА), что позволяет оценить раннюю предиктивную способность микроРНК и определить влияние побочных эффектов РПЭ (таких как воспаление) на изменение экспрессии микроРНК.

Известно, что РПЭ оказывает значительное влияние на экспрессию микроРНК и вызывает разнонаправленные изменения уровней их относительной экспрессии [12–13, 16]. Как следует из представленных результатов, наибольший интерес представляет 1-я группа микроРНК, уровень относительной экспрессии которых изменялся по направлению к таковому у здоровых доноров (miRNA-92a/375, -125b/375, -205/375, -19b/200b, -30e/205, -30e/660).

Таблица 4. Корреляционные связи уровней относительной экспрессии микроРНК с клинико-патологическими характеристиками пациентов до радикальной простатэктомии
Table 4. Correlation between relative microRNA expression and patient clinical and pathological characteristics prior to radical prostatectomy

Пара микроРНК microRNA pair	Возраст Age	Связь Correlation	p	Уровень простатического специфического антигена Prostate-specific antigen level	Связь Correlation	p	Оценка по шкале Глисона Gleason score	Связь Correlation	p
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-19/30e	0,123	Слабая Weak	0,637	0,394	Умеренная Moderate	0,117	0,03	Нет связи No correlation	0,908
miRNA-19/31	0,357	Умеренная Moderate	0,16	−0,3	Слабая Weak	0,242	0,011	Нет связи No correlation	0,966
miRNA-19b/92a	0,021	Нет связи No correlation	0,938	−0,404	Умеренная Moderate	0,107	−0,161	Слабая Weak	0,538
miRNA-19b/125b	−0,136	Слабая Weak	0,604	−0,36	Умеренная Moderate	0,156	−0,238	Слабая Weak	0,358
miRNA-19b/200b	0,04	Нет связи No correlation	0,877	−0,311	Умеренная Moderate	0,224	0,072	Нет связи No correlation	0,784
miRNA-19b/205	0,149	Слабая Weak	0,568	−0,492	Умеренная Moderate	0,045*	−0,094	Нет связи No correlation	0,719
miRNA-19b/375	0,037	Нет связи No correlation	0,888	−0,209	Слабая Weak	0,421	−0,044	Нет связи No correlation	0,866
miRNA-19b/660	0,095	Нет связи No correlation	0,718	−0,589	Заметная Significant	0,013*	−0,105	Слабая Weak	0,688
miRNA-30e/31	0,178	Слабая Weak	0,493	−0,341	Умеренная Moderate	0,181	0,111	Слабая Weak	0,672
miRNA-30e/92a	−0,098	Нет связи No correlation	0,708	−0,449	Умеренная Moderate	0,071	−0,066	Нет связи No correlation	0,8
miRNA-30e/125b	−0,207	Слабая Weak	0,425	−0,486	Умеренная Moderate	0,048*	−0,1	Нет связи No correlation	0,703
miRNA-30e/200b	0,117	Слабая Weak	0,655	−0,337	Умеренная Moderate	0,186	0,188	Слабая Weak	0,469
miRNA-30e/205	−0,162	Слабая Weak	0,535	−0,492	Умеренная Moderate	0,045*	−0,039	Нет связи No correlation	0,883
miRNA-30e/375	−0,025	Нет связи No correlation	0,925	−0,316	Умеренная Moderate	0,217	0,022	Нет связи No correlation	0,933
miRNA-30e/660	−0,151	Слабая Weak	0,563	−0,627	Заметная Significant	0,007**	−0,1	Нет связи No correlation	0,703

Продолжение табл. 4
Continuation of table 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-31/92a	-0,591	Заметная Significant	0,012*	-0,31	Умеренная Moderate	0,226	-0,432	Умеренная Moderate	0,083
miRNA-31/125b	-0,666	Заметная Significant	0,004**	-0,074	Нет связи No correlation	0,778	-0,343	Умеренная Moderate	0,177
miRNA-31/200b	-0,107	Слабая Weak	0,683	-0,012	Нет связи No correlation	0,963	0,083	Нет связи No correlation	0,751
miRNA-31/205	-0,25	Слабая Weak	0,334	-0,262	Слабая Weak	0,31	-0,304	Умеренная Moderate	0,235
miRNA-31/375	-0,186	Слабая Weak	0,474	-0,143	Слабая Weak	0,585	-0,177	Слабая Weak	0,496
miRNA-31/660	-0,455	Умеренная Moderate	0,067	-0,525	Заметная Significant	0,031*	-0,299	Слабая Weak	0,244
miRNA-92a/125b	-0,171	Слабая Weak	0,512	0,173	Слабая Weak	0,506	-0,127	Слабая Weak	0,626
miRNA-92a/200b	0,342	Умеренная Moderate	0,179	0,286	Слабая Weak	0,265	0,387	Умеренная Moderate	0,124
miRNA-92a/205	0,179	Слабая Weak	0,493	-0,25	Слабая Weak	0,334	0,011	Нет связи No correlation	0,966
miRNA-92a/375	-0,235	Слабая Weak	0,363	-0,149	Слабая Weak	0,569	0,044	Нет связи No correlation	0,866
miRNA-92a/660	0,14	Слабая Weak	0,593	-0,272	Слабая Weak	0,291	0,055	Нет связи No correlation	0,833
miRNA-125b/200b	0,464	Умеренная Moderate	0,061	0,082	Нет связи No correlation	0,753	0,393	Умеренная Moderate	0,119
miRNA-125b/205	0,308	Умеренная Moderate	0,229	-0,272	Слабая Weak	0,292	-0,017	Нет связи No correlation	0,95
miRNA-125b/375	0,098	Нет связи No correlation	0,709	-0,167	Слабая Weak	0,521	0,077	Нет связи No correlation	0,768
miRNA-125b/660	0,263	Слабая Weak	0,308	-0,412	Умеренная Moderate	0,101	-0,022	Нет связи No correlation	0,933
miRNA-200b/205	-0,108	Слабая Weak	0,679	-0,202	Слабая Weak	0,438	-0,221	Слабая Weak	0,393
miRNA-200b/375	-0,114	Слабая Weak	0,663	-0,16	Слабая Weak	0,54	-0,183	Слабая Weak	0,483

Продолжение табл. 4
Continuation of table 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-200b/660	-0,267	Слабая Weak	0,301	-0,35	Умеренная Moderate	0,168	-0,271	Слабая Weak	0,292
miRNA-205/375	-0,064	Нет связи No correlation	0,808	0,113	Слабая Weak	0,666	0,094	Нет связи No correlation	0,719
miRNA-205/660	-0,099	Нет связи No correlation	0,705	0,086	Нет связи No correlation	0,743	0,194	Слабая Weak	0,456
miRNA-375/660	0,252	Слабая Weak	0,33	-0,011	Нет связи No correlation	0,966	0,089	Нет связи No correlation	0,735
miRNA-19b/22-3p	0,077	Нет связи No correlation	0,769	0,052	Нет связи No correlation	0,844	-0,387	Умеренная Moderate	0,124
miRNA-19b/30e	0,389	Умеренная Moderate	0,122	-0,031	Нет связи No correlation	0,907	0,471	Умеренная Moderate	0,056
miRNA-19b/144	-0,2	Слабая Weak	0,442	-0,039	Нет связи No correlation	0,881	-0,426	Умеренная Moderate	0,088
miRNA-19b/222	-0,199	Слабая Weak	0,445	-0,397	Умеренная Moderate	0,115	-0,365	Умеренная Moderate	0,149
miRNA-19b/378a	-0,368	Умеренная Moderate	0,146	-0,29	Слабая Weak	0,259	-0,332	Умеренная Moderate	0,193
miRNA-19b/425	-0,108	Слабая Weak	0,681	-0,304	Умеренная Moderate	0,236	-0,017	Нет связи No correlation	0,95
miRNA-19b/125b	0,036	Нет связи No correlation	0,89	0,018	Нет связи No correlation	0,946	0,127	Слабая Weak	0,626
miRNA-22-3p/30e	0,252	Слабая Weak	0,33	-0,012	Нет связи No correlation	0,963	0,653	Заметная Significant	0,004**
miRNA-22-3p/144	-0,488	Умеренная Moderate	0,047*	-0,22	Слабая Weak	0,396	-0,304	Умеренная Moderate	0,235
miRNA-22-3p/222	-0,325	Умеренная Moderate	0,204	-0,514	Заметная Significant	0,035*	-0,127	Слабая Weak	0,626
miRNA-22-3p/378a	-0,49	Умеренная Moderate	0,046*	-0,493	Умеренная Moderate	0,045*	-0,15	Слабая Weak	0,567
miRNA-22-3p/425	0,015	Нет связи No correlation	0,955	-0,114	Слабая Weak	0,662	0,52	Заметная Significant	0,032*

Окончание табл. 4
End of table 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-22-3p/125b	-0,045	Нет связи No correlation	0,864	0,059	Нет связи No correlation	0,822	0,487	Умеренная Moderate	0,047*
miRNA-30c/144	-0,406	Умеренная Moderate	0,106	-0,049	Нет связи No correlation	0,851	-0,559	Заметная Significant	0,020*
miRNA-30c/222	-0,399	Умеренная Moderate	0,112	-0,247	Слабая Weak	0,339	-0,559	Заметная Significant	0,020*
miRNA-30c/378a	-0,552	Заметная Significant	0,021*	-0,209	Слабая Weak	0,421	-0,465	Умеренная Moderate	0,06
miRNA-30c/425	-0,489	Умеренная Moderate	0,046*	-0,145	Слабая Weak	0,579	-0,57	Заметная Significant	0,017*
miRNA-30c/125b	-0,356	Умеренная Moderate	0,161	0,135	Слабая Weak	0,605	-0,238	Слабая Weak	0,358
miRNA-144/222	-0,045	Нет связи No correlation	0,865	-0,323	Умеренная Moderate	0,206	0,028	Нет связи No correlation	0,916
miRNA- miRNA-144/378a	0,063	Нет связи No correlation	0,812	-0,215	Слабая Weak	0,407	0,094	Нет связи No correlation	0,719
miRNA-144/425	0,11	Слабая Weak	0,675	0,058	Нет связи No correlation	0,826	0,559	Заметная Significant	0,020*
miRNA-144/125b	0,199	Слабая Weak	0,443	0,101	Слабая Weak	0,7	0,459	Умеренная Moderate	0,064
miRNA-222/378a	-0,131	Слабая Weak	0,616	0,119	Слабая Weak	0,649	0,1	Нет связи No correlation	0,704
miRNA-222/425	0,143	Слабая Weak	0,583	0,188	Слабая Weak	0,47	0,393	Умеренная Moderate	0,119
miRNA-222/125b	-0,102	Слабая Weak	0,696	0,199	Слабая Weak	0,443	0,233	Слабая Weak	0,369
miRNA-378a/425	0,508	Заметная Significant	0,037*	0,253	Слабая Weak	0,327	0,459	Умеренная Moderate	0,064
miRNA-378a/125b	0,388	Умеренная Moderate	0,124	0,391	Умеренная Moderate	0,121	0,266	Слабая Weak	0,303
miRNA-425/125b	0,139	Слабая Weak	0,595	0,199	Слабая Weak	0,444	0,061	Нет связи No correlation	0,816

* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.
Примечание. Здесь и в табл. 5: цветом выделены достоверные различия.
Note. Here and in Table 5: color shows significant differences.

Таблица 5. Корреляционные связи внеклеточных везикул мочи пациентов с раком предстательной железы с уровнями относительной экспрессии микроРНК до и после радикальной простатэктомии (РПЭ)
Table 5. Correlations between urinary extracellular vesicles in patients with prostate cancer and relative microRNA expression levels before and after radical prostatectomy (RP)

Пара микроРНК MicroRNA pair	До РПЭ Before RP	Связь correlation	p	После РПЭ After RP	Связь Correlation	p	Через 3 мес после РПЭ 3 months after RP	Связь Correlation	p
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-19/30e	-0,305	Умеренная Moderate	0,219	-0,266	Слабая Weak	0,302	0,356	Умеренная Moderate	0,192
miRNA-19/31	0,151	Слабая Weak	0,55	0,275	Слабая Weak	0,286	0,548	Заметная Significant	0,034*
miRNA-19b/92a	0,341	Умеренная Moderate	0,166	-0,075	Нет связи No correlation	0,775	0,535	Заметная Significant	0,040*
miRNA-19b/125b	0,236	Слабая Weak	0,347	0,168	Слабая Weak	0,519	0,422	Умеренная Moderate	0,117
miRNA-19b/200b	0,11	Слабая Weak	0,664	0,193	Слабая Weak	0,459	0,572	Заметная Significant	0,026*
miRNA-19b/205	0,352	Умеренная Moderate	0,151	0,224	Слабая Weak	0,387	-0,213	Слабая Weak	0,446
miRNA-19b/375	0,458	Умеренная Moderate	0,056	0,221	Слабая Weak	0,395	0,494	Умеренная Moderate	0,061
miRNA-19b/660	0,153	Слабая Weak	0,545	0,183	Слабая Weak	0,483	-0,252	Слабая Weak	0,364
miRNA-30e/31	0,396	Умеренная Moderate	0,104	0,369	Умеренная Moderate	0,145	0,379	Умеренная Moderate	0,163
miRNA-30e/92a	0,366	Умеренная Moderate	0,136	-0,018	Нет связи No correlation	0,944	0,193	Слабая Weak	0,49
miRNA-30e/125b	0,518	Заметная Significant	0,028*	0,436	Умеренная Moderate	0,081	0,222	Слабая Weak	0,426
miRNA-30e/200b	0,385	Умеренная Moderate	0,114	0,386	Умеренная Moderate	0,126	0,191	Слабая Weak	0,494
miRNA-30e/205	0,446	Умеренная Moderate	0,063	0,196	Слабая Weak	0,45	-0,608	Заметная Significant	0,016*
miRNA-30e/375	0,438	Умеренная Moderate	0,069	0,405	Умеренная Moderate	0,107	0,206	Слабая Weak	0,462
miRNA-30e/660	0,255	Слабая Weak	0,308	0,319	Умеренная Moderate	0,212	-0,49	Умеренная Moderate	0,064

Продолжение табл. 5
Continuation of table 5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-31/92a	0,109	Слабая Weak	0,668	-0,425	Умеренная Moderate	0,089	-0,394	Умеренная Moderate	0,146
miRNA-31/125b	0,047	Нет связи No correlation	0,855	0,004	Нет связи No correlation	0,989	-0,322	Умеренная Moderate	0,242
miRNA-31/200b	-0,182	Слабая Weak	0,47	0,161	Слабая Weak	0,538	-0,474	Умеренная Moderate	0,074
miRNA-31/205	0,278	Слабая Weak	0,264	-0,07	Нет связи No correlation	0,79	-0,463	Умеренная Moderate	0,082
miRNA-31/375	0,416	Умеренная Moderate	0,086	0,166	Слабая Weak	0,525	-0,025	Нет связи No correlation	0,929
miRNA-31/660	-0,025	Нет связи No correlation	0,922	-0,109	Слабая Weak	0,677	-0,522	Заметная Significant	0,046*
miRNA-92a/125b	-0,197	Слабая Weak	0,433	0,361	Умеренная Moderate	0,155	0,107	Слабая Weak	0,703
miRNA-92a/200b	-0,316	Умеренная Moderate	0,201	0,473	Умеренная Moderate	0,055	0,131	Слабая Weak	0,642
miRNA-92a/205	0,219	Слабая Weak	0,383	0,277	Слабая Weak	0,282	-0,547	Заметная Significant	0,035*
miRNA-92a/375	0,398	Умеренная Moderate	0,102	0,456	Умеренная Moderate	0,066	0,168	Слабая Weak	0,549
miRNA-92a/660	-0,172	Слабая Weak	0,496	0,32	Умеренная Moderate	0,21	-0,422	Умеренная Moderate	0,117
miRNA-125b/200b	-0,321	Умеренная Moderate	0,194	0,071	Нет связи No correlation	0,786	-0,116	Слабая Weak	0,68
miRNA-125b/205	0,332	Умеренная Moderate	0,179	-0,007	Нет связи No correlation	0,978	-0,581	Заметная Significant	0,023*
miRNA-125b/375	0,365	Умеренная Moderate	0,137	0,229	Слабая Weak	0,376	0,089	Нет связи No correlation	0,751
miRNA-125b/660	-0,099	Нет связи No correlation	0,695	0,039	Нет связи No correlation	0,881	-0,497	Умеренная Moderate	0,06
miRNA-200b/205	0,347	Умеренная Moderate	0,158	-0,06	Нет связи No correlation	0,819	-0,615	Заметная Significant	0,015*
miRNA-200b/375	0,384	Умеренная Moderate	0,115	0,183	Слабая Weak	0,483	0,073	Нет связи No correlation	0,795

Продолжение табл. 5
Continuation of table 5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-200b/660	0,267	Слабая Weak	0,285	0,01	Нет связи No correlation	0,97	-0,476	Умеренная Moderate	0,073
miRNA-205/375	0,245	Слабая Weak	0,327	0,202	Слабая Weak	0,436	0,53	Заметная Significant	0,042*
miRNA-205/660	-0,217	Слабая Weak	0,387	0,01	Нет связи No correlation	0,97	-0,084	Нет связи No correlation	0,766
miRNA-375/660	-0,368	Умеренная Moderate	0,133	-0,175	Слабая Weak	0,501	-0,42	Умеренная Moderate	0,119
miRNA-19b/22-3p	0,228	Слабая Weak	0,362	0,266	Слабая Weak	0,302	-0,077	Нет связи No correlation	0,785
miRNA-19b/30e	0,389	Умеренная Moderate	0,111	0,058	Нет связи No correlation	0,826	0,233	Слабая Weak	0,404
miRNA-19b/144	0,13	Слабая Weak	0,607	-0,4	Умеренная Moderate	0,112	0,134	Слабая Weak	0,634
miRNA-19b/222	0,094	Нет связи No correlation	0,711	0,048	Нет связи No correlation	0,855	0,222	Слабая Weak	0,427
miRNA-19b/378a	0,312	Умеренная Moderate	0,208	0,235	Слабая Weak	0,363	0,261	Слабая Weak	0,347
miRNA-19b/425	0,475	Умеренная Moderate	0,046*	0,078	Нет связи No correlation	0,765	0,159	Слабая Weak	0,571
miRNA-19b/125b	0,057	Нет связи No correlation	0,823	0,116	Слабая Weak	0,656	0,252	Слабая Weak	0,364
miRNA-22-3p/30e	0,1	Слабая Weak	0,692	-0,284	Слабая Weak	0,268	0,068	Нет связи No correlation	0,81
miRNA-22-3p/144	0,155	Слабая Weak	0,539	-0,416	Умеренная Moderate	0,097	0,068	Нет связи No correlation	0,81
miRNA-22-3p/222	-0,182	Слабая Weak	0,47	-0,298	Слабая Weak	0,245	0,098	Нет связи No correlation	0,727
miRNA-22-3p/378a	0,116	Слабая Weak	0,648	-0,242	Слабая Weak	0,35	0,463	Умеренная Moderate	0,082
miRNA-22-3p/425	0,365	Умеренная Moderate	0,137	-0,332	Умеренная Moderate	0,193	0,2	Слабая Weak	0,474
miRNA-22-3p/125b	-0,147	Слабая Weak	0,561	-0,33	Умеренная Moderate	0,196	0,234	Слабая Weak	0,401

Окончание табл. 5
End of table 5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-30e/144	0,034	Нет связи No correlation	0,893	-0,362	Умеренная Moderate	0,154	0,009	Нет связи No correlation	0,975
miRNA-30e/222	-0,181	Слабая Weak	0,473	0,025	Нет связи No correlation	0,926	0,174	Слабая Weak	0,536
miRNA-30e/378a	0,077	Нет связи No correlation	0,76	0,091	Нет связи No correlation	0,729	0,327	Умеренная Moderate	0,234
miRNA-30e/425	0,262	Слабая Weak	0,293	0,061	Нет связи No correlation	0,815	0,131	Слабая Weak	0,643
miRNA-30e/125b	-0,361	Умеренная Moderate	0,142	0,079	Нет связи No correlation	0,764	0,204	Слабая Weak	0,466
miRNA-144/222	-0,273	Слабая Weak	0,274	0,291	Слабая Weak	0,258	0,213	Слабая Weak	0,446
miRNA-144/378a	-0,204	Слабая Weak	0,418	0,321	Умеренная Moderate	0,209	0,404	Умеренная Moderate	0,136
miRNA-144/425	0,311	Умеренная Moderate	0,209	0,346	Умеренная Moderate	0,174	0,379	Умеренная Moderate	0,164
miRNA-144/125b	-0,208	Слабая Weak	0,408	0,374	Умеренная Moderate	0,139	0,057	Нет связи No correlation	0,839
miRNA-222/378a	0,338	Умеренная Moderate	0,17	0,291	Слабая Weak	0,258	0,51	Заметная Significant	0,052
miRNA-222/425	0,342	Умеренная Moderate	0,165	-0,114	Слабая Weak	0,663	0,029	Нет связи No correlation	0,919
miRNA-222/125b	-0,216	Слабая Weak	0,389	0,09	Нет связи No correlation	0,733	0,156	Слабая Weak	0,58
miRNA-378a/425	0,22	Слабая Weak	0,38	-0,207	Слабая Weak	0,425	-0,306	Умеренная Moderate	0,268
miRNA-378a/125b	-0,319	Умеренная Moderate	0,197	-0,256	Слабая Weak	0,321	-0,404	Умеренная Moderate	0,135
miRNA-425/125b	-0,615	Заметная Significant	0,007**	0,021	Нет связи No correlation	0,937	0,054	Нет связи No correlation	0,849

*p < 0,05. **p < 0,01. ***p < 0,001.

На основании данных об относительной экспрессии 19 пар микроРНК (3-я группа; см. рис. 2, в) через 3 мес после РПЭ больных можно разделить на подгруппы. Особый интерес с точки зрения поиска маркеров возможного развития рецидива представляют те пары микроРНК, относительная экспрессия которых у одной подгруппы пациентов через 3 мес достоверно отличается от данного показателя у доноров, при этом направленность различий соответствует различиям между донорами и больными до РПЭ. К таким парам микроРНК относятся пары miRNA-425/19b, -31/200b, -31/125b, -31/660, -92a/660, -22-3p/125b, -22-3p/378a, -200b/205, -200b/660 и -205/660. Значимость выбранных пар микроРНК подтверждает тот факт, что пациенты с БХР и метастазами попадают в подгруппу микроРНК, экспрессия которых достоверно отличается от таковой у доноров. Анализ динамики уровня ПСА в течение 1 года после РПЭ показал, что у больных с БХР его повышение наблюдается позднее (через 6 или 9 мес после РПЭ), чем изменения в экспрессии микроРНК (через 3 мес после РПЭ). Это позволяет предположить большой потенциал микроРНК в качестве ранних маркеров развития рецидива. В подгруппу БХР попадали также 6 пациентов (в зависимости от анализируемой пары микроРНК), у которых не был выявлен рецидив через 1 год после операции. Тем не менее 1-летний срок наблюдения не является окончательным, и для того чтобы понять, разовьется ли рецидив или наступит длительная ремиссия, необходимо дальнейшее наблюдение в течение 2–5 лет.

В то же время, хотя 1-я и 3-я группы пар микроРНК обладают более высоким потенциалом в качестве диагностических маркеров, 5 пар микроРНК, относительная экспрессия которых изменилась после РПЭ не по направлению к значениям здоровых доноров (2-я группа), также представляют интерес. В отличие от остальных групп пар микроРНК, во 2-ю группу согласно выбранным критериям не вошли диагностически перспективные микроРНК, уровень экспрессии которых достоверно различался у доноров и больных РПЖ до РПЭ. Эти пары микроРНК также могут быть потенциальными прогностическими маркерами, хотя они и не обладают значимостью в качестве диагностических маркеров. Точно так же больные РПЖ после РПЭ, даже находящиеся в длительной ремиссии, не тождественны здоровым донорам, и, естественно, это накладывает отпечаток на профиль экспрессии микроРНК. В качестве примера можно привести miR-320a, -320b, -320c, уровень экспрессии которых в плазме крови больных после РПЭ увеличивался у пациентов без рецидива заболевания и не изменялся у пациентов с БХР, в то время как у доноров он ниже по сравнению с больными РПЖ до РПЭ [28].

Что касается 4-й группы, включающей в себя 30 пар микроРНК, анализ экспрессии которых не выявил устойчивых изменений после РПЭ, то, по-видимому,

они малопригодны для оценки эффективности хирургического лечения РПЖ.

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Например, ранее была показана онкосупрессорная роль ряда исследованных микроРНК. В частности, продемонстрировано, что экспрессия miRNA-205 в клетках опухоли предстательной железы снижена по сравнению со здоровыми тканями, что ассоциировано с активным ростом и делением клеток, а также метастазированием опухоли [29]. Для miRNA-19b и miRNA-92a, входящих в один кластер miR-17-92a [30], miRNA-30e [31], miRNA-200b [26], также показана онкосупрессорная роль. Так, известно, что miRNA-200b является ингибитором процессов клеточного роста, метастазирования и эпителиально-мезенхимального перехода. Кроме того, низкая экспрессия miRNA-200b ассоциирована с возникновением БХР [26]. В настоящем исследовании относительная экспрессия miRNA-30e была снижена у больных РПЖ по сравнению с донорами во всех анализируемых парах, а экспрессия miR-200b, 205 и -92a – в большинстве случаев. Обнаружено, что после РПЭ повышается уровень экспрессии miRNA-205 (в составе всех анализируемых пар) и miRNA-30e (в большинстве случаев), в то время как уровень относительной экспрессии miRNA-200b снижается сразу после РПЭ, но повышается до уровня у здоровых доноров через 3 мес после операции. Таким образом, полученные в настоящей работе данные подтверждают онкосупрессорную роль данных микроРНК.

Что касается miRNA-92a и miRNA-19b, то невозможно выявить доминирующее направление изменения их экспрессии после РПЭ. Вероятно, уровень относительной экспрессии этих микроРНК в меньшей степени, чем других, зависит от операции, и динамика изменения экспрессии пар микроРНК, в состав которых входят miRNA-92a и miRNA-19b, определяется второй микроРНК в каждой паре. Тем не менее спустя 3 мес после РПЭ относительная экспрессия miRNA-19b, -30e, -92a, -200b и -205 в составе формируемых ими пар соответствует таковой у доноров, а уровни относительной экспрессии пар, в состав которых входит miRNA-375, демонстрируют тенденцию к приближению к значениям доноров. Это свидетельствует о значительном потенциале пар, в которые входят эти микроРНК, в качестве прогностических маркеров.

Напротив, miRNA-375, по-видимому, является онкогенной микроРНК, поскольку ее повышенная экспрессия положительно коррелирует с большим риском развития БХР. Действительно, обнаружено, что высокий уровень экспрессии данной микроРНК ассоциирован с метастатическим РПЖ и более агрессивной формой рака [32]. В настоящем исследовании также обнаружен повышенный уровень экспрессии miRNA-375 у больных РПЖ во всех анализируемых парах. Кроме того, пары, в состав которых входит эта микроРНК, демонстрировали достоверное снижение экспрессии

после выполнения РПЭ (см. табл. 2). По-видимому, miRNA-375 играет большую роль в развитии РПЖ, и поэтому ее экспрессия значительно снижается через 1 нед после РПЭ. Более того, уровень относительной экспрессии всех пар микроРНК, сформированных при участии miRNA-375, у больных РПЖ через 3 мес после РПЭ не совпадает с уровнем экспрессии доноров, наблюдается лишь тенденция к такому соответствию, которое, вероятно, наступает позднее, т. е. уровень относительной экспрессии miRNA-375 остается aberrантным в течение более длительного времени.

Показано, что miRNA-144 способствует подавлению роста опухоли, а также препятствует метастазированию, т. е. играет онкосупрессорную роль [33]. Сверхэкспрессию miRNA-425, напротив, связывают с метастазированием РПЖ и неблагоприятным прогнозом [34]. В настоящем исследовании наблюдалась пониженная относительная экспрессия обеих этих микроРНК (miRNA-144 и miRNA-425) у больных РПЖ по сравнению с донорами, которая повышалась после РПЭ. В отношении miRNA-378a и miRNA-125b в литературе представлены противоречивые сведения: в различных исследованиях показаны как онкосупрессорные функции данных микроРНК [35, 36], так и онкогенные [37, 38]. В настоящей работе уровень экспрессии этих микроРНК у больных РПЖ был выше, чем у доноров, а после РПЭ он мог как снижаться, так и немного повышаться, в зависимости от второй микроРНК в паре, т. е. решающее влияние оказывала вторая микроРНК (не miRNA-378a или miRNA-125b) в соотношении.

Исследования, посвященные изучению функций miRNA-22-3p, miRNA-31 и miRNA-660 в канцерогенезе, выполнялись в основном в отношении видов онкологических заболеваний, в частности рака молочной железы и легких. Тем не менее показано, что miRNA-22-3p подавляет рост опухоли при раке молочной железы [39], низкая экспрессия miRNA-31 ассоциирована с развитием рака молочной железы [40], а повышенная экспрессия miRNA-660 способствует росту опухоли при раке легких и метастазированию в кости *in vivo* [41]. Экстраполяция данных литературы и их сравнение с результатами нашей работы позволяют сделать вывод, что эти микроРНК оказывают аналогичное действие на канцерогенез предстательной железы, поскольку в настоящем исследовании относительная экспрессия miRNA-660 оказалась повышенной у больных РПЖ по сравнению с донорами, а miRNA-22-3p и miRNA-31, напротив, в большинстве случаев — пониженной. После РПЭ уровни относительной экспрессии miRNA-22-3p и miRNA-660 уменьшались, а экспрессия miRNA-31 усиливалась, т. е. наблюдаемое изменение относительной экспрессии miRNA-22-3p противоречит ожидаемому. Тем не менее это, скорее, связано с послеоперационными процессами, поскольку не выявлена достоверная разница относительной экспрессии большинства пар микроРНК, в состав которых входит miRNA-22-3p,

у пациентов с РПЖ спустя 3 мес после РПЭ и у доноров, т. е. эти пары микроРНК через 3 мес после операции экспрессируются также, как у здоровых доноров.

Корреляционный анализ показал, что относительная экспрессия исследованных микроРНК, возраст, уровень ПСА и стадия опухолевого процесса характеризуются либо отсутствием, либо слабой корреляционной зависимостью. Это свидетельствует о возможности использования сочетанного анализа ПСА и экспрессии микроРНК для оценки эффективности терапии. Наибольшее количество пар микроРНК, уровень относительной экспрессии которых коррелировал с уровнем ПСА через 1 год после РПЭ, обнаружено через 3 мес после операции (9 пар). Устойчивой (сохраняющейся при анализе двух временных точек) корреляции между уровнем относительной экспрессии исследованных микроРНК и уровнем ПСА не выявлено, что, по-видимому, связано с тем, что на уровень экспрессии микроРНК через 1 нед после операции в значительной мере оказывают влияние процедура хирургического вмешательства и сопровождающие ее побочные эффекты, в том числе воспаление. В связи с этим анализ относительной экспрессии микроРНК через 3 мес после РПЭ представляется более информативным с точки зрения предсказания развития БХР и/или клинического рецидива. Кроме того, исследованная группа больных РПЖ была довольно однородной по уровню ПСА плазмы крови через 1 год после РПЭ, что затрудняет поиск возможных корреляций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ динамики экспрессии 60 пар микроРНК (14 различных микроРНК) в составе ВВ мочи больных РПЖ после РПЭ (до, через 1 нед и 3 мес после операции) показал, что уровень относительной экспрессии после хирургического вмешательства достоверно изменялся у 44 из исследованных пар. Выявлены пары микроРНК, дальнейший анализ относительной экспрессии которых наиболее перспективен с точки зрения оценки эффективности РПЭ. К ним относятся 2 группы пар микроРНК: 1) пары микроРНК, относительная экспрессия которых после операции достоверно изменялась в сторону таковой у здоровых доноров и соответствовала ей через 3 мес после лечения (miRNA-19b/miRNA-200b, -30e/205, -30e/660) или демонстрировала тенденцию к такому соответствию (miRNA-92a/miRNA-375, -125b/375, -205/375); 2) пары микроРНК, по уровню относительной экспрессии которых больные РПЖ разделялись на 2 (miRNA-19b/205, -425/19b, -22-3p/378a, -22-3p/125b, -22-3p/144, -30e/125b, -30e/144, -31/125b, -31/200b, -92a/660, -200b/205, -200b/660, -205/660, -19b/125b, -144/378a, -30e/31) или 3 (miRNA-19b/378a, -31/660, -125b/660) достоверно различающиеся подгруппы через 3 мес после РПЭ. Таким образом, анализ динамики относительной экспрессии микроРНК является перспективным подходом для разработки панелей для

диагностики РПЖ и оценки эффективности РПЭ. Тем не менее необходимы дополнительные исследования экспрессии этих микроРНК через 6 мес и спустя 1 год

после РПЭ, а также их ассоциации с клинико-патологическими характеристиками и состоянием пациентов через 1, 2 года и 5 лет после операции.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview. *Int J Cancer* 2021. DOI: 10.1002/ijc.33588
2. Costello A.J. Considering the role of radical prostatectomy in 21st century prostate cancer care. *Nat Rev Urol* 2020;17(3):177–88. DOI: 10.1038/s41585-020-0287-y
3. D'Amico A.V., Chen M.H., Roehl K.A. et al. Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. *N Engl J Med* 2004;351(2):125–35. DOI: 10.1056/NEJMoa032975
4. Porcaro A.B., Corsi P., Inverardi D. et al. Prostate-specific antigen associates with extensive lymph node invasion in high-risk prostate cancer. *Tumori* 2018;104(4):307–11. DOI: 10.1177/0300891618765567
5. Karakiewicz P.I., Benayoun S., Kattan M.W. et al. Development and validation of a nomogram predicting the outcome of prostate biopsy based on patient age, digital rectal examination and serum prostate specific antigen. *J Urol* 2005;173(6):1930–4. DOI: 10.1097/01.ju.0000158039.94467.5d
6. Bai X., Jiang Y., Zhang X. et al. The value of prostate-specific antigen-related indexes and imaging screening in the diagnosis of prostate cancer. *Cancer Manag Res* 2020;12:6821–6. DOI: 10.2147/CMAR.S257769
7. Pashaei E., Pashaei E., Ahmady M. et al. Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy. *PLoS One* 2017;12(6):e0179543. DOI: 10.1371/journal.pone.0179543
8. Zhao Z., Stephan C., Weickmann S. et al. Tissue-based microRNAs as predictors of biochemical recurrence after radical prostatectomy: what can we learn from past studies? *Int J Mol Sci* 2017;18(10):2023. DOI: 10.3390/ijms18102023
9. Szilágyi M., Pös O., Márton É. et al. Circulating cell-free nucleic acids: main characteristics and clinical application. *Int J Mol Sci* 2020;21(18):6827. DOI: 10.3390/ijms21186827
10. Chen M., Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum Genomics* 2019;13(1):34. DOI: 10.1186/s40246-019-0220-8
11. Wang J., Ni J., Beretov J. et al. Exosomal microRNAs as liquid biopsy biomarkers in prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2020;145:102860. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2019.102860
12. Zedan A.H., Hansen T.F., Assenholt J. et al. Circulating miRNAs in localized/locally advanced prostate cancer patients after radical prostatectomy and radiotherapy. *Prostate* 2019;79(4):425–32. DOI: 10.1002/pros.23748
13. 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
14. 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
15. Koppers-Lalic D., Hackenberg M., de Menezes R. et al. Non-invasive prostate cancer detection by measuring miRNA variants (isomiRs) in urine extracellular vesicles. *Oncotarget* 2016;7(16):22566–78. DOI: 10.18632/oncotarget.8124
16. Konoshenko M.Y., Laktionov P.P. MiRNAs and radical prostatectomy: Current data, bioinformatic analysis and utility as predictors of tumour relapse. *Andrology* 2021;9(4):1092–107. DOI: 10.1111/andr.12994
17. Abramovic I., Ulamec M., Katusic Bojanac A. et al. miRNA in prostate cancer: challenges toward translation. *Epigenomics* 2020;12(6):543–58. DOI: 10.2217/epi-2019-0275
18. Casanova-Salas I., Rubio-Briones J., Fernández-Serra A. et al. miRNAs as biomarkers in prostate cancer. *Clin Transl Oncol* 2012;14(11):803–11. DOI: 10.1007/s12094-012-0877-0
19. Filella X., Foj L. miRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer. *Clin Chem Lab Med* 2017;55(5):715–36. DOI: 10.1515/cclm-2015-1073
20. 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 (Basel)* 2021;11(3):384. DOI: 10.3390/diagnostics11030384
21. 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
22. 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
23. 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
24. Zheng H., Guo Z., Zheng X. et al. MicroRNA-144-3p inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in prostate cancer by targeting CEP55. *Am J Transl Res* 2018;10(8):2457–68.
25. Rana S., Valbuena G.N., Curry E. et al. MicroRNAs as biomarkers for prostate cancer prognosis: a systematic review and a systematic reanalysis of public data. *Br J Cancer* 2022;126(3):502–13. DOI: 10.1038/s41416-021-01677-3
26. Katz B., Reis S.T., Viana N.I. et al. Comprehensive study of gene and microRNA expression related to epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. *PLoS One* 2014;9(11):e113700. DOI: 10.1371/journal.pone.0113700
27. 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 (Basel)* 2020;10(1):38. DOI: 10.3390/diagnostics10010038
28. Lieb V., Weigelt K., Scheinost L. et al. Serum levels of miR-320 family members are associated with clinical parameters and diagnosis in prostate cancer patients. *Oncotarget* 2017;9(12):10402–16. DOI: 10.18632/oncotarget.23781
29. Guo Z., Lu X., Yang F. et al. The Expression of miR-205 in prostate carcinoma and the relationship with prognosis in patients. *Comput Math Methods Med* 2022;2022:1784791. DOI: 10.1155/2022/1784791
30. Ottman R., Levy J., Grizzle W.E. et al. The other face of miR-17-92a cluster, exhibiting tumor suppressor effects in prostate cancer. *Oncotarget* 2016;7(45):73739–53. DOI: 10.18632/oncotarget.12061
31. Zheng X.M., Zhang P., Liu M.H. et al. MicroRNA-30e inhibits adhesion, migration, invasion and cell cycle progression of prostate

- cancer cells via inhibition of the activation of the MAPK signaling pathway by downregulating CHRM3. *Int J Oncol* 2019;54(2):443–54. DOI: 10.3892/ijo.2018.4647
32. Nitusca D., Marcu A., Seclaman E. et al. Diagnostic value of microRNA-375 as future biomarker for prostate cancer detection: a meta-analysis. *Medicina (Kaunas)* 2022;58(4):529. DOI: 10.3390/medicina58040529
 33. Sun X.B., Chen Y.W., Yao Q.S. et al. MicroRNA-144 suppresses prostate cancer growth and metastasis by targeting EZH2. *Technol Cancer Res Treat* 2021;20:1533033821989817. DOI: 10.1177/1533033821989817
 34. Rode M.P., Silva A.H., Cislott J. et al. miR-425-5p as an exosomal biomarker for metastatic prostate cancer. *Cell Signal* 2021;87:110113. DOI: 10.1016/j.cellsig.2021.110113
 35. Chen Q.G., Zhou W., Han T. et al. MiR-378 suppresses prostate cancer cell growth through downregulation of MAPK1 in vitro and in vivo. *Tumour Biol* 2016;37(2):2095–103. DOI: 10.1007/s13277-015-3996-8
 36. Sun D., Lee Y.S., Malhotra A. et al. miR-99 family of microRNAs suppresses the expression of prostate-specific antigen and prostate cancer cell proliferation. *Cancer Res* 2011;71(4):1313–24. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1031
 37. Samami E., Pourali G., Arabpour M. et al. The potential diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in the assessment of patients with prostate cancer: rational and progress. *Front Oncol* 2022;11:716831. DOI: 10.3389/fonc.2021.716831
 38. Shi X.B., Xue L., Ma A.H. et al. miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro-apoptotic genes. *Prostate* 2011;71(5):538–49. DOI: 10.1002/pros.21270
 39. Gorur A., Bayraktar R., Ivan C. et al. ncRNA therapy with miRNA-22-3p suppresses the growth of triple-negative breast cancer. *Mol Ther Nucleic Acids* 2021;23:930–43. DOI: 10.1016/j.omtn.2021.01.016
 40. Abbas M.A., El Sayed I.E.T., Kamel Abdu-Allah A.M. et al. Expression of MiRNA-29b and MiRNA-31 and their diagnostic and prognostic values in Egyptian females with breast cancer. *Noncoding RNA Res* 2022;7(4):248–57. DOI: 10.1016/j.ncrna.2022.09.003
 41. Ai C., Ma G., Deng Y. et al. Nm23-H1 inhibits lung cancer bone-specific metastasis by upregulating miR-660-5p targeted SMARCA5. *Thorac Cancer* 2020;11(3):640–50. DOI: 10.1111/1759-7714.13308

Вклад авторов

Е.В. Шутко: проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;
 М.Ю. Коношенко, О.Е. Брызгунова: разработка дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;
 П.П. Лактионов: интерпретация данных, написание текста статьи;
 И.А. Остальцев, С.В. Пак, С.Э. Красильников: сбор биоматериала, подбор групп больных и доноров, предоставление, анализ и интерпретация клинических данных.

Authors' contribution

E.V. Shutko: experiment conduction part, data analysis and interpretation, article writing;
 M.Yu. Konoshenko, O.E. Bryzgunova: research design development, data analysis and interpretation, article writing;
 P.P. Laktionov: data interpretation, article writing;
 I.A. Ostal'cev, S.V. Pak, S.E. Krasil'nikov: collection of biomaterial, selection of groups of patients and donors, provision, analysis and interpretation of clinical data.

ORCID авторов / ORCID authors

Е.В. Шутко / E.V. Shutko: <https://orcid.org/0009-0004-3004-8969>
 О.Е. Брызгунова / O.E. Bryzgunova: <https://orcid.org/0000-0003-3433-7261>
 С.В. Пак / S.V. Pak: <https://orcid.org/0009-0009-6221-2758>;
 П.П. Лактионов / P.P. Laktionov: <https://orcid.org/0000-0002-0866-0252>
 М.Ю. Коношенко / M.Yu. Konoshenko: <https://orcid.org/0000-0003-2925-9350>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (грант № 23-25-10026; <https://rscf.ru/project/23-25-10026>) в рамках поддержанного Правительством Новосибирской области проекта 0000005406995998235120582 № р-45.

Funding. The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation (grant No. 23-25-10026; <https://rscf.ru/project/23-25-10026>) within the framework of the project 0000005406995998235120582 supported by the Government of the Novosibirsk Region No. r-45.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук» (протокол № 10 от 22 декабря 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, December 22, 2008).

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

Статья поступила: 27.06.2023. **Принята к публикации:** 12.02.2024.

Article submitted: 27.06.2023. **Accepted for publication:** 12.02.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-79-89>

CC BY 4.0

Фенотипические и транскриптомные особенности моноцитов периферической крови в динамике неоадьювантной химиотерапии больных раком молочной железы

М.Р. Патышева^{1,2}, М.Н. Стахеева¹, Е.С. Григорьева¹, П.С. Ямщиков^{1,2}, И.В. Ларионова^{1,2}, А.А. Будницкая², Н.А. Тарабановская¹, Н.В. Чердынцева^{1,2}, Ю.Г. Кжышковска²

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

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

Контакты: Марина Ринатовна Патышева patysheva_mr@onco.tnmc.ru

Введение. Химиотерапия включена в большинство схем лечения рака молочной железы. Действие химиотерапевтических препаратов оказывает влияние на моноциты крови, которые являются одними из важнейших участников патогенеза онкологических заболеваний. Однако в настоящий момент не установлено, могут ли изменения моноцитов, индуцированные проведением химиотерапии, поддерживать эффект противоопухолевого лечения или, напротив, снижать его.

Цель исследования – охарактеризовать изменения фенотипического и транскриптомного профилей моноцитов больных раком молочной железы до и после химиотерапевтического лечения.

Материалы и методы. В группе, состоящей из 50 больных раком молочной железы, оценена популяционная структура моноцитов на основании экспрессии рецепторов CD14, CD16, CD163 и HLA-DR с помощью проточной цитометрии. У 9 пациенток проанализирован транскриптомный профиль CD14⁺-моноцитов с применением массового параллельного РНК-секвенирования. Все исследования выполнялись до и после проведения 4 курсов неоадьювантной химиотерапии.

Результаты. В группе больных раком молочной железы неоадьювантная химиотерапия приводила к снижению содержания CD14⁺HLA-DR⁺-моноцитов. На фоне цитостатического лечения в моноцитах пациентов отмечены повышение экспрессии генов *MGLL*, *NR4A2*, *UCK1*, *YOD1*, *ABCA2*, *PAPSS2*, *ATP10* ($\log_2\text{FoldChange} \geq 0,8$; ожидаемая доля ложных отклонений (false discovery rate, FDR) $\leq 0,01$) и снижение экспрессии генов *KPNA2*, *ERCC4*, *JAGN1*, *RUBCNL*, *SMYD4*, *B3GALT4* ($\log_2\text{FoldChange} \geq 0,8$; FDR $\leq 0,01$). После проведения терапии наблюдалось повышение активности сигнальных путей, связанных с липидным обменом и внутриклеточным транспортом везикул из эндоплазматического ретикулума, на фоне снижения ответа на воздействие интерферонов γ и α , и чужеродных молекул (экзогенных нуклеиновых кислот, вирусов и бактерий). С помощью дискриминантного анализа установлено, что относительное количество CD14⁺HLA-DR⁺, CD14⁺HLA-DR⁺, CD14⁺HLA-DR⁺, CD14⁺HLA-DR⁺ и CD14⁺HLA-DR⁺-моноцитов в крови имеет ценность для предсказания ответа на неоадьювантную химиотерапию у больных раком молочной железы.

Заключение. Таким образом, выявлена связь параметров моноцитов крови с проведением химиотерапевтического лечения при раке молочной железы.

Ключевые слова: моноциты, рак молочной железы, РНК-секвенирование, транскриптом, химиотерапия, HLA-DR

Для цитирования: Патышева М.Р., Стахеева М.Н., Григорьева Е.С. и др. Фенотипические и транскриптомные особенности моноцитов периферической крови в динамике неоадьювантной химиотерапии больных раком молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):79–89. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-79-89>

Immune-phenotyping and transcriptomic profiling of blood monocytes from patients with breast cancer under neoadjuvant chemotherapy

M.R. Patysheva^{1,2}, M.N. Stakheyeva¹, E.S. Grigoryeva¹, P.S. Iamshchikov^{1,2}, I.V. Larionova^{1,2}, A.A. Budnickaya², N.A. Tarabanovskaya¹, N.V. Cherdynitseva^{1,2}, J.G. Kzhyshkowska²

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

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

Contacts: Marina Rinatovna Patysheva patysheva_mr@onco.tnmc.ru

Introduction. Chemotherapy is a common treatment for breast cancer. Chemotherapeutic drugs effect blood monocytes, which are major contributors to cancer pathogenesis. However, to date, pro-tumor or anti-tumor programming by chemotherapy of monocytes is controversial.

Aim. To characterize changes in phenotypic and transcriptomic profiles of monocytes of breast cancer patients before and after chemotherapeutic treatment.

Materials and methods. In a cohort of 50 breast cancer patients, monocyte populations were identified based on their expression of CD14, CD16, CD163, and HLA-DR evaluated by flow cytometry before and after neoadjuvant chemotherapy. Bulk RNA sequencing was adopted to explore the transcriptomic profile of CD14⁺ monocytes before and after treatment. After treatment, we observed an increase in the activity of signaling pathways related to lipid metabolism and intracellular transport of vesicles from the endoplasmic reticulum, against the background of a decreased response to exposure to interferon γ and interferon α , and foreign molecules (exogenous nucleic acids, viruses and bacteria).

Results. In breast cancer patients, neoadjuvant chemotherapy decreased in CD14⁺16⁺HLA-DR⁺ monocytes. Under cytostatic treatment, increased gene expression of *MGLL*, *NR4A2*, *UCK1*, *YOD1*, *ABCA2*, *PAPSS2*, *ATP10* ($\log_2\text{FoldChange} \geq 0.8$; false discovery rate (FDR) ≤ 0.01) and decreased gene expression of *KPNA2*, *ERCC4*, *JAGN1*, *RUBCNL*, *SMYD4*, *B3GALT4* ($\log_2\text{FoldChange} \geq 0.8$; FDR ≤ 0.01) were observed in monocytes of patients. Using discriminant analysis, the relative numbers of CD14⁺16⁻, CD14⁺16⁺, CD14⁻16⁺, CD14⁺16⁺HLA-DR⁺, CD14⁺16⁺HLA-DR⁺ and CD14⁻16⁺HLA-DR⁺ monocytes in the blood were found to be valuable in predicting response to neoadjuvant chemotherapy.

Conclusion. Thus, association of blood monocytes with chemotherapeutic treatment in breast cancer was revealed.

Keywords: monocytes, breast cancer, RNA-seq, transcriptome, chemotherapy, HLA-DR

For citation: Patysheva M.R., Stakheyeva M.N., Grigoryeva E.S. et al. Immune-phenotyping and transcriptomic profiling of blood monocytes from patients with breast cancer under neoadjuvant chemotherapy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(1):79–89. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-79-89>

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) является ведущей патологией в России и составляет более 20 % всех злокачественных нозологий у женщин [1]. В структуре смертности женского населения РМЖ находится на 1-м месте среди онкологических заболеваний репродуктивной системы [1]. Подобные показатели напрямую связаны как с проблемами ранней диагностики заболевания, так и с недостаточной эффективностью лечения. Так, применение предоперационной неoadъювантной терапии (НАХТ) при безметастатических формах РМЖ приводит к достижению полной морфологической регрессии опухоли только в 17,8 % случаев [2]. В настоящее время необходимо дальнейшее изучение патогенеза данной патологии для решения проблемы ранней диагностики и увеличения эффективности лечения.

Способность клеток моноцитарно-макрофагального ряда поддерживать рост опухоли является значимым фактором патогенеза РМЖ [3–6]. Моноциты составляют 5–10 % лейкоцитов крови и представляют собой клетки неспецифического иммунитета. Популяция моноцитов включает в себя несколько подтипов [7, 8]. Повышенное содержание отдельных субпопуляций моноцитов, таких как CD14⁺163⁺ и CD14⁺204⁺, или определенные сигнатуры генов, экспрессированных в моноцитах, связывают с наличием РМЖ [6, 9, 10]. Известно, что увеличение от-

ношения абсолютного числа лимфоцитов к абсолютному числу моноцитов в крови ассоциировано с эффективностью НАХТ, а повышенный уровень Tie2⁺-моноцитов негативно коррелирует с показателями безрецидивной выживаемости [10–12]. В то же время моноциты крови связаны с опухолеассоциированными макрофагами (ОАМ), поскольку представляют собой ресурс для пополнения их пула [3, 11].

Неoadъювантная терапия — обязательный этап лечения ряда молекулярных подтипов РМЖ. Цитостатическое лечение сопровождается выраженным влиянием не только на опухолевые клетки, но и на клетки других тканей, в том числе клетки иммунной системы [12, 13]. Известно, что химиотерапия может стимулировать противоопухолевый иммунитет, тем самым увеличивая частоту случаев полного патологического ответа на лечение [12]. Однако иммунные клетки, к которым относятся опухолевые макрофаги и моноциты, могут блокировать или нивелировать эффект химиотерапевтического лечения [5, 14]. При этом остаются невыясненными вопросы, как цитостатическое лечение влияет на программирование циркулирующих моноцитов и могут ли моноциты как предшественники ОАМ изменять их популяционное представительство в опухоли. В последнее десятилетие вопрос о вовлечении клеток иммунной системы в реализацию терапевтических эффектов цитостатического лечения активно обсужда-

ется [12, 15]. Изучение функционального профиля моноцитов при РМЖ в условиях химиотерапии представляется актуальным для клинической онкологии [12, 16].

Цель исследования — охарактеризовать изменение фенотипического и транскриптомного профилей моноцитов больных РМЖ до и после химиотерапевтического лечения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследование включены 50 больных РМЖ Т1–3N0–3M0 I–III стадии с инвазивной карциномой неспецифического типа (табл. 1). Средний возраст больных составил 52 года (46–63 года). Исследование проводили в двух точках: до НАХТ и после 4 курсов НАХТ по схеме АС (доксорубин и циклофосфамид). Эффективность терапии после 4 курсов оценивали согласно критериям Всемирной организации здравоохранения. Регистрировали полную регрессию (100 % редукция опухоли), частичную регрессию (уменьшение объема опухоли более чем на 50 %), стабилизацию (уменьшение объема опухоли на 25–50 %) и прогрессирование процесса (увеличение объема опухоли более чем на 25 %). В соответствии с международными рекомендациями пациенты со стабилизацией и прогрессированием составили группу плохого ответа на химиотерапию (не ответивших на НАХТ), а пациенты с полной и частичной регрессией — группу объективного ответа.

Фенотипирование моноцитов периферической крови. Проведена оценка уровней CD14⁺-, CD16⁺-, CD163⁺- и HLA-DR⁺-моноцитов в крови больных. Венозная кровь взята в вакуумные системы сбора крови, стабилизированные К3-ЭДТА. Кровь (100 мкл) окрашивали набором меченных моноклональных антител против маркеров CD45, CD14, CD16, CD163 и HLA-DR (табл. 2). Для блокирования неспецифического связывания применяли Human TruStain FcX™ (Biolegend, США). В контрольный образец добавляли соответствующий изотипический контроль в аналогичной концентрации. Все образцы анализировали на проточном цитометре NovoCyte (ACEA Bioscience, США). Тактика гейтирования представлена на рис. 1. Обработку полученных данных проводили с помощью программного пакета NovoExpress SoftWare (Acea, США).

Массовое параллельное РНК-секвенирование и биоинформатический анализ данных. В исследование вошли 9 пациенток с РМЖ до и после НАХТ. Для анализа транскриптома моноцитов использовали 18 мл крови, забранной в вакуумные системы с К3-ЭДТА. Предварительно на градиенте плотности раствора фиколла-урографина (1,077 г/см³) из крови получена фракция мононуклеарных клеток, а далее с помощью проточной цитометрической сортировки — CD14⁺-моноциты. Использовалась панель конъюгированных моноклональных антител против маркеров CD45, CD56, CD14 и 7-AAD (см. табл. 2). Сортировка образцов

проводилась на клеточном сортере MoFlo XDP (Beckman Coulter, США).

Сортировку моноцитов выполняли в режиме Purify 1–2; эффективность сортировки в данном режиме составляла 70 %, а чистота целевой популяции — 98–99 %. Далее из полученного лизата клеток не более чем через 60 мин выделяли тотальную РНК с использованием набора RNAeasy mini kit plus (Qiagen, Германия). Качество полученной РНК оценивали с помощью станции автоматического капиллярного электрофореза TapeStation 4150 (Agilent Technology, США). Показатель

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика больных раком молочной железы (n = 50)
Table 1. Clinical characteristics of patients with breast cancer in this study (n = 50)

Показатель Parameter	Число пациентов, абс. (%) Number of patients, abs. (%)
Состояние менструальной функции: Menses:	
сохранена saved	24 (48,2)
пременопауза + перименопаза premenopausal + perimenopause	26 (51,8)
постменопауза postmenopausal	—
Стадия: Stage:	
I	7 (14,0)
II	23 (46)
III	20 (40)
Молекулярно-биологический подтип: Molecular subtype:	
люминальный B luminal B	25 (50,0)
трижды негативный подтип triple-negative	19 (38,0)
HER2-положительный HER2-positive	6 (12,0)
Лимфогенное метастазирование: Lymph node metastases:	
есть yes	22 (46,5)
нет no	28 (53,5)
Эффект неоадьювантной химиотерапии: Neoadjuvant chemotherapy clinical response:	
полная + частичная регрессия complete response + partial response	34 (68,0)
стабилизация stable disease	8 (16,0)
прогрессирование progression disease	8 (16,0)

Примечание. HER2 — рецептор эпидермального фактора роста человека 2.
Note. HER2 — human epidermal growth factor receptor-2.

Таблица 2. Антитела и изотипические контроли, применяемые для фенотипирования моноцитов
Table 2. Antibodies and isotype controls

Антитела, красители Antibodies, dyes	Клон Clone	Изотип Isotype	Производитель Manufacturer
CD45-APC-Cy7	2D1	Mouse IgG1, κ	BD Bioscience, США BD Bioscience, USA
CD14-FITC	M5E2	Mouse IgG2a, κ	
CD16-APC	3G8	Mouse IgG1, κ	
CD163-PE	GHI/61	Mouse IgG1, κ	
HLA-DR-PE-Cy5	G46-6	Mouse IgG2a, κ	
Isotype PE-Cy TM 5	G155-178	Mouse IgG2a, κ	
7-AAD	—	—	
CD56-PE-Cy7	CMSSB	Mouse IgG1, κ	eBioscience, Thermo Fisher Scientific, США eBioscience, Thermo Fisher Scientific, USA
Isotype PE	P3.6.2.8.1	Mouse IgG1, κ	

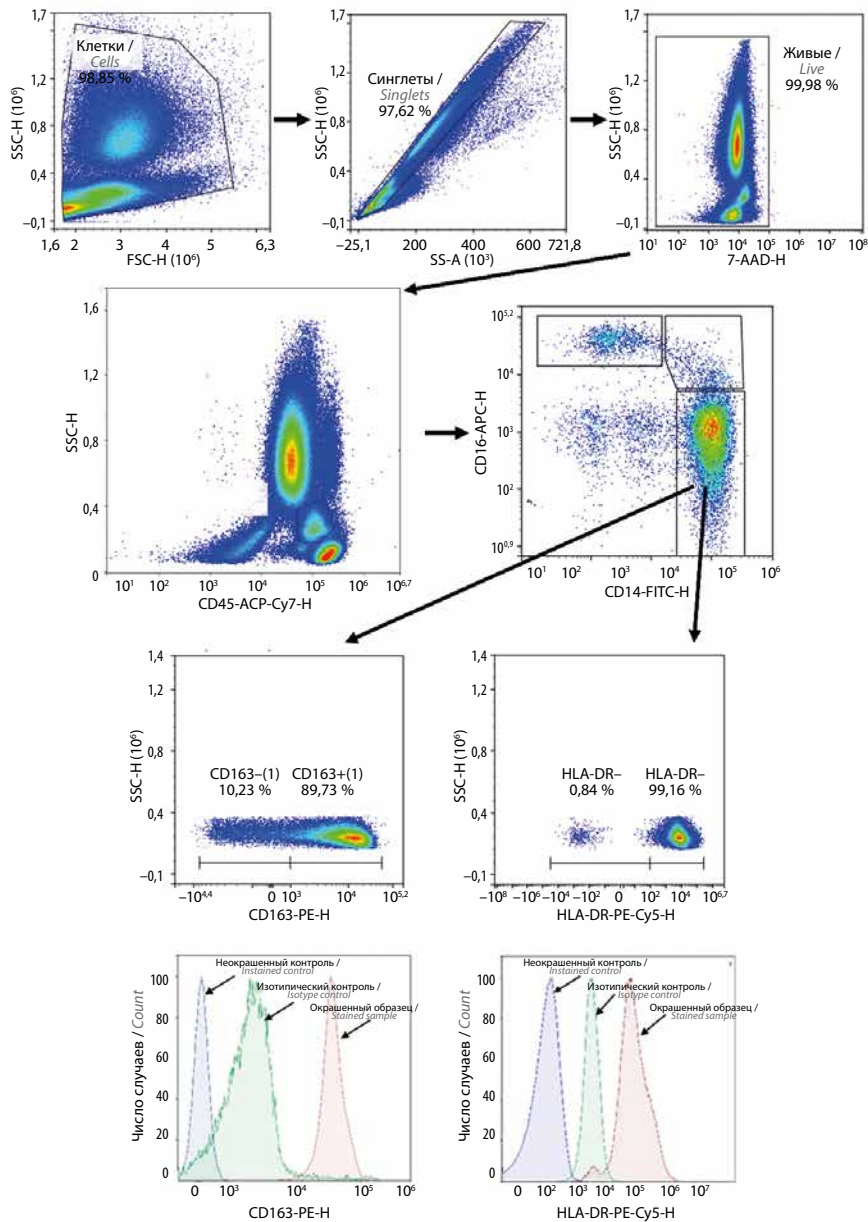


Рис. 1. Тактика гейтирования для идентификации фенотипа моноцитов крови
Fig. 1. Flow cytometry gating strategy for the identification of human monocytes

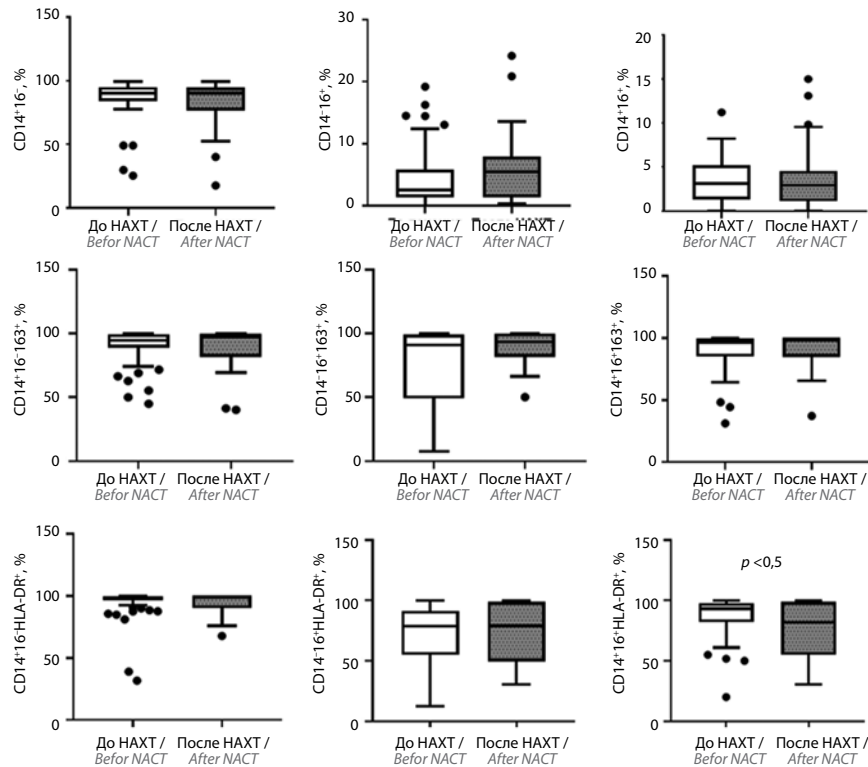


Рис. 2. Субпопуляционный состав моноцитов у больных раком молочной железы до и после 4 курсов неoadъювантной химиотерапии (НАХТ)
Fig. 2. Circulating monocytes subsets in breast cancer patient before and after neoadjuvant chemotherapy (NACT)

целостности РНК (RIN) составил 8,5–9,9. Пробы тотальной РНК хранились при -80°C .

Полнотранскриптомный профиль моноцитов определен с помощью массового параллельного секвенирования. Библиотеки для него готовили с использованием набора NEXT flex Rapid Directional qRNA-SeqKit и одноконцевых индексов NEXTflex-qRNA-8nt-Barcodes (Perkin Elmer, США) по стандартному протоколу. Избавление от рибосомальной РНК осуществлялось с помощью набора NEBNext® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (New England Biolabs, США). Из подготовленных библиотек формировали общий эквимольный пул и проводили секвенирование на платформе NextSeq500 (Illumina, США) с набором реактивов для одноконцевого чтения 1x75 (single read); осуществляли 50 циклов. На каждую библиотеку в среднем приходилось около 5 млн ридов.

Методы статистической и биоинформатической обработки данных. Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 8.0 for Windows (StatSoft Inc., США). Для проверки законов распределения исследуемых переменных на нормальность использовали критерий Колмогорова–Смирнова. После проверки все полученные числовые данные были представлены в виде медианы (LQu–UQu). Для определения статистически значимых различий в зависи-

мых группах использовали критерий Уилкоксона. Для построения математической модели применяли методы дискриминантного анализа и нелинейной логистической регрессии. Результаты проточной цитометрии представлены с помощью программы GraphPad Prism 8 software (GraphPad Soft Inc., США). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Картирование ридов на геном проводили с помощью программы STAR 2.5 [17]; в качестве референса использовали геномную сборку GRCh38 и аннотации GENCODE.R34. После картирования получали данные о количестве картирующихся ридов на индивидуальные гены с использованием программы QoRTs [18]. Затем с помощью программного пакета DESeq2, входящего в состав среды R, оценивали дифференциальную экспрессию генов в контрольных и экспериментальных группах. Для обогащения по биохимическим и регуляторным путям с использованием списков генов, ранжированных по уровню экспрессии log2FoldChange и p -value, применяли программы fgsea (<https://github.com/ctlab/fgsea>) и Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>), а для эксперимента — базы данных Hallmark gene sets, Reactome и GO. Данные визуализировали с помощью программ FGSEA, Enricher и Phantasus (<https://genome.ifmo.ru/phantasus>), а также средствами среды R.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменение субпопуляционного состава и транскриптомного профиля моноцитов до и после неоадьювантной химиотерапии. Проведено исследование фенотипа моноцитов крови до и после проведения 4 курсов НАХТ. Эта терапия не влияла на состав основных популяций моноцитов и экспрессию на них рецептора CD163 (рис. 2). Экспрессия HLA-DR на моноцитах CD14⁺16⁺-классической и CD14⁺16⁺-неклассической популяций также сохранялась на прежнем уровне после НАХТ. Однако количество CD14⁺16⁺HLA-DR⁺ менялось после проведения химиотерапевтического лечения и составило до НАХТ 94 % (84,51–98,44 %), после нее – 84 % (62,61–98,87 %) ($p = 0,04$) (см. рис. 2).

Транскриптомный профиль моноцитов проанализирован у 9 больных РМЖ до и после НАХТ с помощью метода главных компонент: различий до и после НАХТ выявлено не было (рис. 3а). Однако сравнение показателей каждого пациента показало индивидуальные различия в изменении транскриптомного профиля моноцитов после лечения (см. рис. 3а), а сравнение с помощью кластерного анализа – различия в этом профиле до и после химиотерапии (рис. 3б).

Анализ дифференциальной экспрессии отдельных генов позволил получить генную сигнатуру, характерную для моноцитов больных после проведения НАХТ (рис. 3в). Неоадьювантная химиотерапия инициировала повышение экспрессии в моноцитах 152 генов при $\log_2\text{FoldChange} > 0,75$ и $p\text{-value} < 0,001$; наиболее выраженными среди которых были гены гемоглобина бета (*HBB*), моноацилглицерол липазы (*MGLL*), транскрипционного фактора (*NR4A2*), уридин-цитидин киназы (*UCK1*), деубиквитиназы (*YOD2*), белка-транспортера (*ABCA2*), 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат синтазы 2 (*PAPSS2*), транспортера аденозинтрифосфата (АТФ) (*ATP10A*) и компонент комплекса ГТФазы (*SEPTIN1*). Снижение экспрессии отмечено для 89 генов с $\log_2\text{FoldChange} > 0,75$ и $p\text{-value} < 0,001$, среди которых наиболее выражены гены регулятора нуклеоплазматического транспорта кариоферина $\alpha 2$ (*KPNA2*), субъединицы эндонуклеазы (*ERCC4*), трансмембранного компонента эндоплазматического ретикулума (*JAGN1*), компонента аутофагосом (*RUBCNL*), катализатора метилирования гистонов (*SMYD4*) и галактозилтрансферазы (*B3GALT4*) (рис. 3в, г).

После проведения НАХТ в моноцитах активируются процессы, связанные с модификацией тубулина, ретроградная транспортировка липидов из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи с активацией каскада Rho ГТФазы, а также процессы формирования аггросом (рис. 4) [19]. При этом подавляются процессы, ассоциированные с ответом на чужеродные молекулы и сигнальными путями интерферонов γ и α (см. рис. 4).

Предсказание эффективности неоадьювантной химиотерапии при раке молочной железы с учетом особенностей субпопуляций моноцитов. Результаты, полученные с помощью метода нелинейной логистической регрессии, позволили нам разработать математическую модель прогноза для предсказания плохого ответа на НАХТ у больных РМЖ. При построении модели были использованы данные о популяционной структуре моноцитов у пациенток до лечения. Расчет вероятности ответа на НАХТ у больных РМЖ выполнялся по следующей формуле:

$$Y = 100,67 - 0,3X_1 - 0,08X_2 + 0,185X_3 + 0,259X_4 - 0,007X_5 + 0,503X_6,$$

где Y – функция, характеризующая больных РМЖ с отсутствием ответа на НАХТ; X_1 – относительное количество CD14⁺16⁺-моноцитов в крови; X_2 – относительное количество CD14⁺16⁺-моноцитов в крови; X_3 – относительное количество CD14⁺16⁺-моноцитов в крови; X_4 – относительное количество CD14⁺16⁺HLA-DR⁺-моноцитов в крови; X_5 – относительное количество CD14⁺16⁺HLA-DR⁺-моноцитов в крови; X_6 – относительное количество CD14⁺16⁺HLA-DR⁺-моноцитов в крови.

Параметры модели: $F(9,31) = 3,12$; λ Уилкса = 0,59; $p < 0,017$.

Чувствительность предсказательной модели составила 83 %, специфичность – 96 %.

ОБСУЖДЕНИЕ

Современная химиотерапия основана на системном введении одного препарата или комбинации лекарственных средств, обладающих цитостатическим и цитотоксическим действием. Помимо уничтожения раковых клеток химиотерапевтическое лечение влияет на другие делящиеся клетки организма [12]. Поскольку многие клетки иммунной системы, в частности моноциты, происходят из гемопоэтических клеток-предшественников, данная терапия может угнетать продукцию зрелых форм моноцитов [12, 13]. Исследования, которые сосредоточены на изучении влияния цитотоксических и цитостатических препаратов на моноциты в условиях *in vitro*, не позволяют учесть весь комплекс факторов организма. В этом аспекте НАХТ, которая проводится до резекции опухоли, является оптимальной биологической моделью исследования модулирующего влияния химиотерапии на клетки моноцитарно-макрофагального ряда.

Неоадьювантная химиотерапия в разной степени влияет на популяции циркулирующих моноцитов (см. рис. 2). Мы обнаружили, что данная терапия снижает содержание CD14⁺16⁺HLA-DR⁺-клеток (см. рис. 2). Ранее нами было продемонстрировано, что пониженное

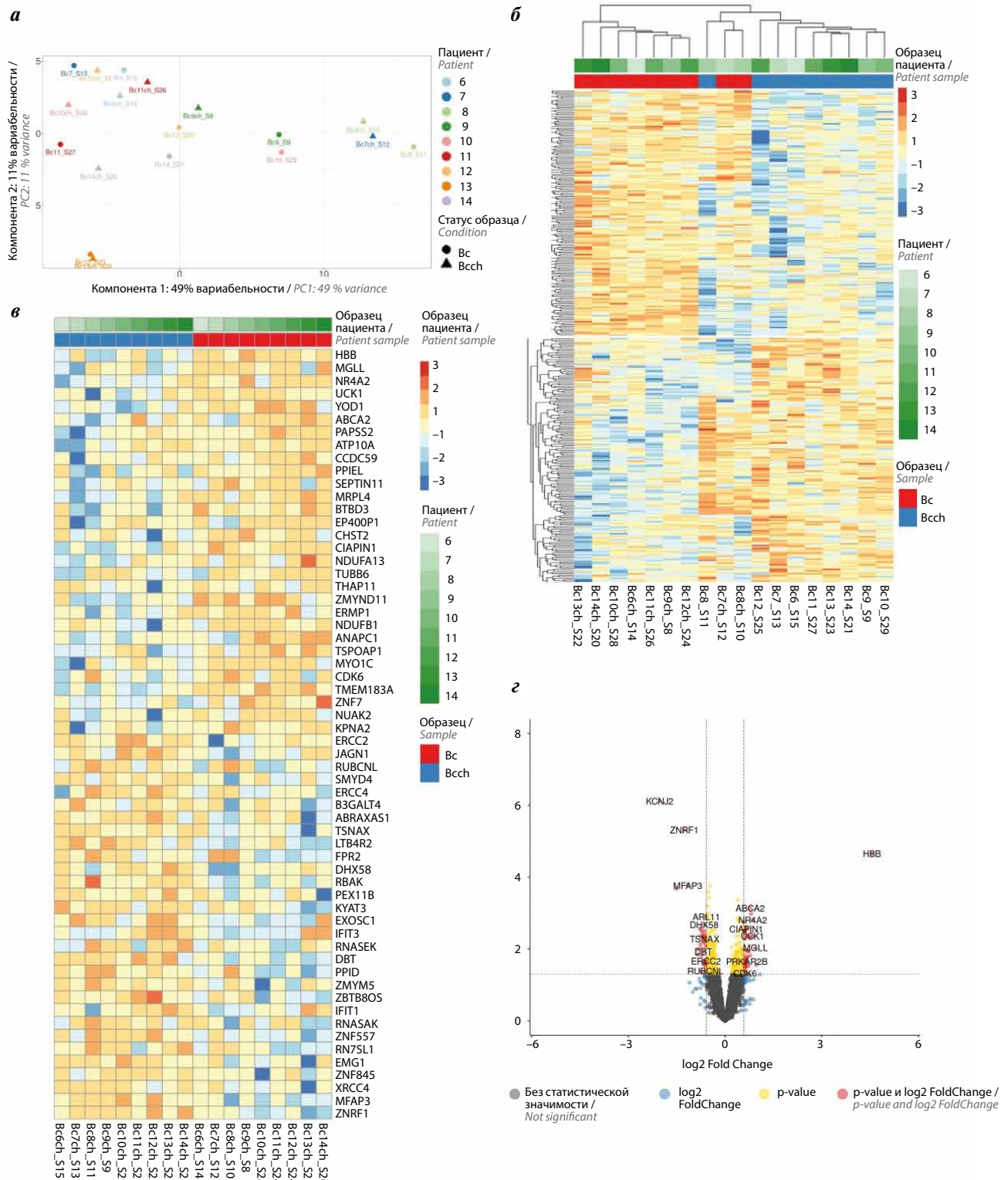


Рис. 3. Влияние неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) на транскриптомный профиль циркулирующих моноцитов больных раком молочной железы до и после лечения: а — распределение образцов до (Bc) и после (Bcch) НАХТ при использовании метода главных компонент; б — различия в транскриптоме, выявленные с помощью иерархического кластерного анализа; в — топ-20 генов, характеризующихся наибольшей и наименьшей экспрессией в моноцитах больных раком молочной железы до и после НАХТ на основании дифференциальной экспрессии с log2FoldChange; г — Volcano-диаграмма распределения генов РНК-секвенирования до (слева) и после (справа) НАХТ

Fig. 3. Neoadjuvant chemotherapy (NACT) alteration to the transcriptome of circulating monocytes in breast cancer patients: а — principal-component analysis plot of genes expressed in monocytes from breast cancer patients before (Bc, circles) and after (Bcch, triangles) NACT; б — hierarchical clustering of all differentially expressed genes between monocytes before (Bc) and after (Bcch) NACT; в — top 20 differentially expressed genes log2FoldChange genes between monocytes before (Bc) and after (Bcch) NACT; г — Volcano-plot of RNA-Seq data between monocytes before (left) and after (right) NACT

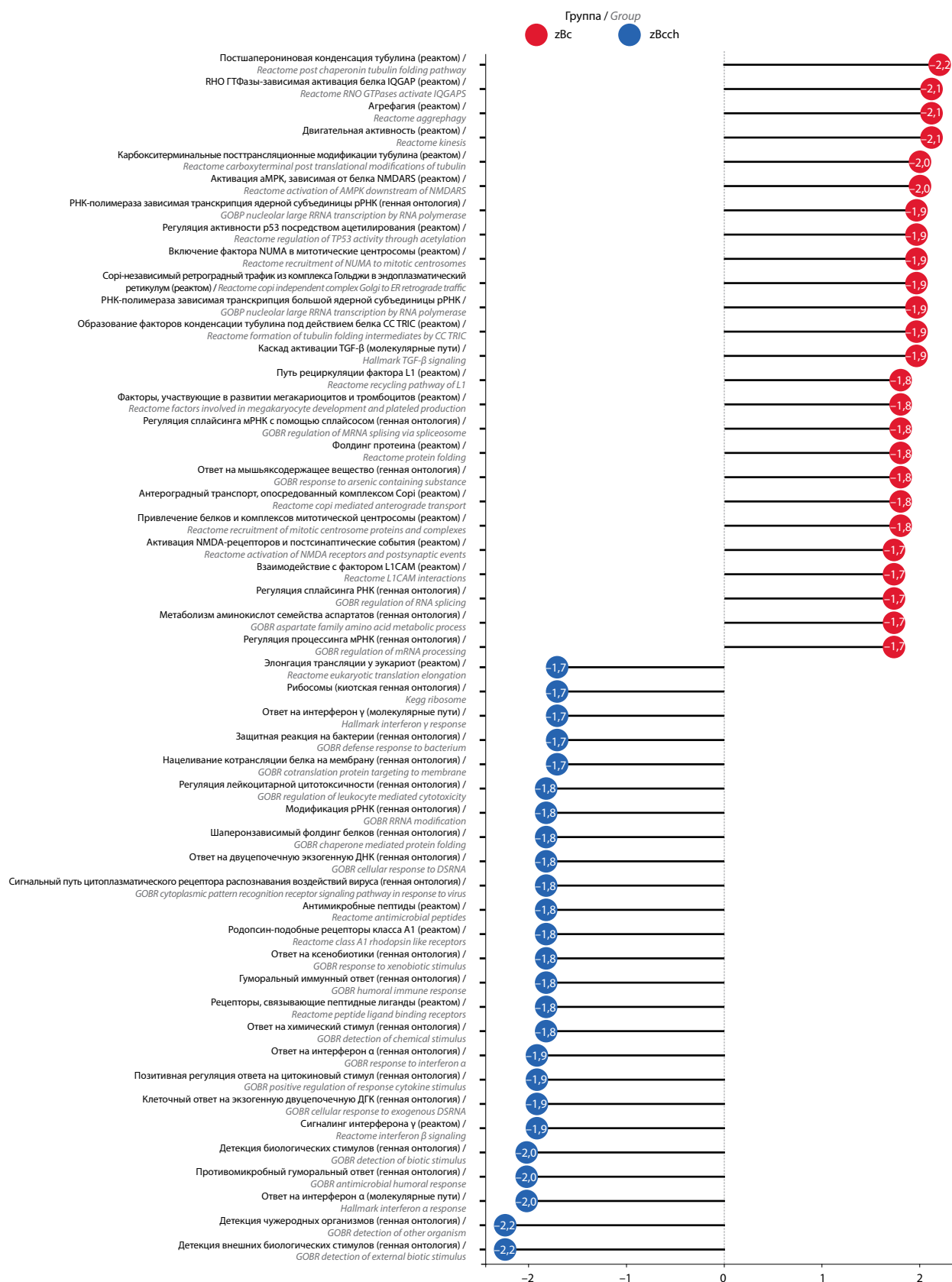


Рис. 4. Сигнальные пути, активированные (красный цвет) и угнетенные (синий цвет) в моноцитах у больных раком молочной железы после введения неоадьювантной химиотерапии. аВс — сигнальные пути со сниженной активацией; зВсч — сигнальные пути с повышенной активацией; NES — нормализованный показатель обогащения; TGF-β — фактор некроза опухоли β; мРНК — матричная РНК

Fig. 4. The results demonstrate top up-regulated (red) and down-regulated (blue) signaling pathways in monocytes of breast cancer patients. аВс — signaling pathways with reduced activation; зВсч — signaling pathways with increased activation; NES — normalized enrichment index; TGF-β — tumor necrosis factor β; mRNA — matrix RNA

количество клеток этой популяции характерно для пациентов, не отвечающих на НАХТ [10]. Доказано, что $CD14^+16^+$ -клетки являются активными продуцентами основного провоспалительного цитокина — фактора некроза опухоли [20, 21], в то время как низкая экспрессия рецептора HLA-DR на моноцитах происходит при их дифференцировке в миелоидные клетки-супрессоры, которые подавляют иммунный ответ [22]. Таким образом, сниженная экспрессия рецептора HLA-DR на моноцитах $CD14^+16^+$ -популяции может быть связана с иммуносупрессией, а содержание $CD14^+16^+HLA-DR^+$ -моноцитов — являться чувствительным к НАХТ параметром, что позволяет рассматривать его в качестве маркера для прогнозирования эффективности данной терапии при РМЖ. Разработанная нами математическая модель для предсказания результата НАХТ подтверждает это предположение. Данная модель учитывает содержание основных популяций моноцитов и экспрессию на них HLA-DR и обладает высокими чувствительностью и специфичностью. Полученные результаты являются основанием для их дальнейшей верификации на больших выборках больных РМЖ с возможностью трансляции результатов в клиническую практику.

Ранее показано, что транскриптомный профиль моноцитов больных РМЖ и здоровых женщин имеет выраженные различия в модельных организмах и группах больных [6, 10, 23]. Неoadъювантная химиотерапия у больных РМЖ оказывает менее выраженное влияние на транскриптомный профиль моноцитов (см. рис. 3). Анализ с помощью метода главных компонент не показал сильных различий между группами образцов до и после лечения (см. рис. 3а). Однако сравнение образцов для каждой больной попарно до и после НАХТ показывает, что у большинства пациенток химиотерапия вызывает изменения в транскриптоме моноцитов, но на индивидуальном уровне (см. рис. 3а). Кроме того, результаты кластерного анализа подтвердили различия в транскриптомном профиле моноцитов до и после НАХТ (рис. 3б). Таким образом, отмечено моделирующее влияние данной терапии не только на абсолютное количество моноцитов крови, как это было показано ранее, но и на транскриптомный профиль и биологию клеток [24].

Сигнатура дифференциально экспрессированных генов свидетельствует об изменении биологических процессов в моноцитах после проведения химиотерапии (см. рис. 3в, г). После НАХТ в моноцитах повышается экспрессия транскриптов молекул, ответственных за транспорт липидов, таких как моноацилглице-

роллипаза (MGLL), и белка-транспортера ABCA2 [25, 26]. Последнее согласуется с активацией процесса транспортировки везикул из аппарата Гольджи в эндоплазматический ретикулум (см. рис. 4). Интересно, что дефицит MGLL способствует TLR4-зависимой активации модельных макрофагов, что свидетельствует о способности MGLL подавлять провоспалительную активность моноцитов и макрофагов [26]. Известно, что моноциты и макрофаги, находящиеся в состоянии противовоспалительной M2-подобной поляризации, характеризуются активацией липидного обмена [27]. Кроме того, после НАХТ в моноцитах повышается экспрессия ядерного фактора NR4A2, который обеспечивает их противовоспалительную активность [28, 29]. Повышение экспрессии этих генов свидетельствует об активации в моноцитах процессов, направленных на подавление воспаления. Кроме того, сигнальные пути, связанные с ответом иммунных клеток на интерфероны, эндогенную ДНК и цитокиновые стимулы, подавляются после НАХТ (см. рис. 4).

Известно, что цитостатические препараты, входящие в состав схем НАХТ, действуют на предшественники моноцитов и макрофагов. После НАХТ наблюдается повышение уровня экспрессии генов *UCK1* и *YOD1* в моноцитах (рис. 3в, г). Известно, что белки UCK1 и YOD1 обеспечивают в клетке процесс деубиквитинизации, связанный со снятием «меток смерти» с клеточной ДНК [30, 31]. Ранее в отношении моноцитов активация системы деубиквитинизации в ответ на действие цитостатических агентов описана не была. Мы предполагаем, что это может быть одним из механизмов восстановления пула моноцитов в ответ на НАХТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе сравнительного исследования содержания HLA-DR⁺- и CD163⁺-моноцитов при РМЖ до и после НАХТ обнаружено снижение уровня $CD14^+16^+$ -клеток, экспрессирующих рецептор HLA-DR, после лечения. Показано, что после НАХТ индивидуальный транскриптомный профиль моноцитов каждого пациента изменяется, а экспрессия генов, связанных с липидным обменом, подавлением воспалительного ответа и деубиквитинизации, повышается в моноцитах всех больных. Применение метода математического моделирования, определяющего содержание $CD14^+16^+$, $CD14^+16^-$ и $CD14^-16^+$ -моноцитов до лечения и экспрессию рецептора HLA-DR на них, позволяет предсказать эффективность НАХТ с чувствительностью 83,3 % и специфичностью 96 %.

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

1. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. 252 с. Malignant tumors in Russia in 2022 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, A.O. Shakhzadova. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena — filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2022. 250 p. (In Russ.).
2. Kim G., Pastoriza J.M., Qin J. et al. Racial disparity in distant recurrence-free survival in patients with localized breast cancer: a pooled analysis of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project trials. *Cancer* 2022;128(14):2728–35. DOI: 10.1002/cncr.34241
3. Qiu S.Q., Waaijer S.J.H., Zwager M.C. et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: innocent bystander or important player? *Cancer Treat Rev* 2018;70:178–89. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.08.010
4. Linde N., Casanova-Acebes M., Sosa M.S. et al. Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis. *Nature Commun* 2018;9(1):21. DOI: 10.1038/s41467-017-02481-5
5. Larionova I., Tuguzbaeva G., Ponomaryova A. et al. Tumor-associated macrophages in human breast, colorectal, lung, ovarian and prostate cancers. *Front Oncol* 2020;10:566511. DOI: 10.3389/fonc.2020.566511
6. Cassetta L., Fragkogianni S., Sims A.H. et al. Human tumor-associated macrophage and monocyte transcriptional landscapes reveal cancer-specific reprogramming, biomarkers, and therapeutic targets. *Cancer Cell* 2019;35(4):588–602.e10. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.02.009
7. Ziegler-Heitbrock L. Blood monocytes and their subsets: established features and open questions. *Front Immunol* 2015;6:423. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00423
8. Olingy C.E., Dinh H.Q., Hedrick C.C. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol* 2019;106(2):309–22. DOI: 10.1002/JLB.4RI0818-311R
9. Zhang B., Cao M., He Y. et al. Increased circulating M2-like monocytes in patients with breast cancer. *Tumour Biol* 2017;39(6):1010428317711571. DOI: 10.1177/1010428317711571
10. Patysheva M., Larionova I., Stakheyeva M. et al. Effect of early-stage human breast carcinoma on monocyte programming. *Front Oncol* 2022;11:800235. DOI: 10.3389/fonc.2021.800235
11. Cassetta L., Pollard J.W. A timeline of tumour-associated macrophage biology. *Nat Rev Cancer* 2023;23(4):238–57. DOI: 10.1038/s41568-022-00547-1
12. Galluzzi L., Buqué A., Kepp O. et al. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. *Cancer Cell* 2015;28(6):690–714. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.10.012
13. Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F. et al. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008;8(1):59–73. DOI: 10.1038/nri2216
14. Hughes R., Qian B.-Z., Rowan C. et al. Perivascular M2 macrophages stimulate tumor relapse after chemotherapy. *Cancer Res* 2015;75(17):3479–91. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3587
15. Kroemer G., Galassi C., Zitvogel L. et al. Immunogenic cell stress and death. *Nat Immunol* 2022;23(4):487–500. DOI: 10.1038/s41590-022-01132-2
16. Stakheyeva M., Eidenzon D., Slonimskaya E. et al. Integral characteristic of the immune system state predicts breast cancer outcome. *Exp Oncol* 2019;41(1):32–8.
17. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 2013;29(1):15–21. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts635
18. Hartley S.W., Mullikin J.C. QoRTs: a comprehensive toolset for quality control and data processing of RNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics* 2015;16(1):224. DOI: 10.1186/s12859-015-0670-5
19. van Helden S.F., Anthony E.C., Dee R. et al. Rho GTPase expression in human myeloid cells. *PLoS One* 2012;7(8):e42563. DOI: 10.1371/journal.pone.0042563
20. Belge K.U., Dayyani F., Horelt A. et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002;168(7):3536–42. DOI: 10.4049/jimmunol.168.7.3536
21. Myśliwska J., Smardzewski M., Marek-Trzonkowska N. et al. Expansion of CD14+CD16+ monocytes producing TNF- α in complication-free diabetes type 1 juvenile onset patients. *Cytokine* 2012;60(1):309–17. DOI: 10.1016/j.cyto.2012.03.010
22. Mengos A.E., Gastineau D.A., Gustafson M.P. The CD14(+)HLA-DR(lo/neg) monocyte: an immunosuppressive phenotype that restrains responses to cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2019;10:1147. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01147
23. Robinson A., Burgess M., Webb S. et al. Systemic influences of mammary cancer on monocytes in mice. *Cancers* 2022;14(3):833. DOI: 10.3390/cancers14030833
24. Foulds G.A., Vadakekolathu J., Abdel-Fatah T.M.A. et al. Immune-phenotyping and transcriptomic profiling of peripheral blood mononuclear cells from patients with breast cancer: identification of a 3 gene signature which predicts relapse of triple negative breast cancer. *Front Immunol* 2018;9:2028. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02028
25. Rahaman O., Ganguly D. Endocannabinoids in immune regulation and immunopathologies. *Immunology* 2021;164:242–52. DOI: 10.1111/imm.13378
26. Xiang W., Shi R., Kang X. et al. Monoacylglycerol lipase regulates cannabinoid receptor 2-dependent macrophage activation and cancer progression. *Nat Commun* 2018;9(1):2574. DOI: 10.1038/s41467-018-04999-8
27. Li L., Tian Y. The role of metabolic reprogramming of tumor-associated macrophages in shaping the immunosuppressive tumor microenvironment. *Biomed Pharmac* 2023;161:114504. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114504
28. Navone N.D., Perga S., Martire S. et al. Monocytes and CD4+ T cells contribution to the under-expression of NR4A2 and TNFAIP3 genes in patients with multiple sclerosis. *J Uroimmunol* 2014;272(1–2): 99–102. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2014.04.017
29. Crean D., Cummins E.P., Bahar B. et al. Adenosine modulates NR4A orphan nuclear receptors to attenuate hyperinflammatory responses in monocytic cells. *J Immunol* 2015;195(4):143648. DOI: 10.4049/jimmunol.1402039
30. Matchett E.C., Ambrose E.C., Kornbluth J. Characterization of uridine-cytidine kinase like-1 nucleoside kinase activity and its role in tumor growth. *Biochem J* 2022;479(11):1149–64. DOI: 10.1042/BCJ20210770
31. Han Z., Jia Q., Zhang J. et al. Deubiquitylase YOD1 regulates CDK1 stability and drives triple-negative breast cancer tumorigenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 2023;42(1):228. DOI: 10.1186/s13046-023-02781-3

Вклад авторов

М.Р. Патышева: разработка дизайна исследования, выполнение проточной цитометрии, РНК-секвенирование моноцитов крови, анализ данных, написание текста статьи;
М.Н. Стахеева: разработка концепции и дизайна исследования, анализ данных, написание текста статьи;
Е.С. Григорьева: выполнение проточной цитометрии и проточной цитометрической сортировки моноцитов крови;
П.С. Ямшиков: биоинформатическая обработка данных РНК-секвенирования;
И.В. Ларионова: подготовка библиотек секвенирования;
А.А. Будницкая: обработка данных проточной цитометрии, подготовка базы данных о пациентах, подготовка иллюстративного материала;
Н.А. Тарабановская: подбор пациентов, сбор клинических данных о пациентах;
Н.В. Чердынцева: разработка дизайна исследования, обработка и анализ результатов;
Ю.Г. Кжышкова: разработка концепции исследования, поиск грантовой поддержки исследования, обработка и анализ результатов.

Authors' contribution

M.R. Patysheva: development of the study design, execution of flow cytometry, RNA sequencing of blood monocytes, data analysis, article writing;
M.N. Stakheeva: development of the concept and design of the study, data analysis, article writing;
E.S. Grigorieva: performing flow cytometry and flow cytometric sorting of blood monocytes;
P.S. Yamshchikov: bioinformatic processing of RNA sequencing data;
I.V. Larionova: preparation of sequencing libraries;
A.A. Budnitskaya: processing of flow cytometry data, preparation of a patient database, preparation of illustrative material;
N.A. Tarabanovskaya: selection of patients, collection of clinical data on patients;
N.V. Cherdyntseva: development of the research design, processing and analysis of the results;
Yu.G. Kzhyshkovska: development of the research concept, search for grant support for the research, processing and analysis of the results.

ORCID авторов / ORCID authors

М.Р. Патышева / M.R. Patysheva: <https://orcid.org/0000-0003-2865-7576>
М.Н. Стахеева / M.N. Stakheeva: <https://orcid.org/0000-0003-0601-2240>
Е.С. Григорьева / E.S. Grigoryeva: <https://orcid.org/0000-0003-4671-6306>
П.С. Ямшиков / P.S. Iamshchikov: <https://orcid.org/0000-0002-0646-6093>
И.В. Ларионова / I.V. Larionova: <https://orcid.org/0000-0001-5758-7330>
Н.А. Тарабановская / N.A. Tarabanovskaya: <https://orcid.org/0000-0003-1630-4466>
Н.В. Чердынцева / N.V. Cherdyntseva: <https://orcid.org/0000-0003-1526-9013>
Ю.Г. Кжышкова / J.G. Kzhyshkovska: <https://orcid.org/0000-0003-0898-3075>

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 Российского научного фонда (грант № 22-25-00435).

Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 22-25-00435).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным комитетом по биоэтике Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (протокол № 10 от 05.12.2019 г.).

Все участники 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 Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (protocol No. 10 dated 05.12.2019).

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

Статья поступила: 09.11.2023. **Принята к публикации:** 13.02.2024.

Article submitted: 09.11.2023. **Accepted for publication:** 13.02.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-90-98>

Снижение способности клеток НСТ116 к выходу из стадии индуцированного терапией старения при увеличении длительности воздействия доксорубицином

Н.А. Персиянцева¹, С.Ю. Вихрова^{1,2}, М.С. Короткова^{1,2}, Д.Б. Казанский¹, В.В. Татарский³, М.А. Замкова^{1,3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России; Россия, 119048 Москва, ул. Трубецкая, 8/2;

³ФГБУ «Институт биологии гена Российской академии наук»; Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 34/5

Контакты: Мария Анатольевна Замкова zamkovam@gmail.com

Введение. Применение химиопрепаратов в низких концентрациях в связи с токсичностью их высоких доз приводит к развитию в опухолевых клетках фенотипа клеточного старения, характеризующегося остановкой прогрессии клеточного цикла и отсутствием деления, а также изменениями в транскрипционном и метаболическом профилях клеток. Негативным последствием этого фенотипа является приобретение отдельными клетками способности к выходу из нее и возврату к повторной пролиферации.

Цель исследования – оценить влияние длительности воздействия химиопрепаратом на способность клеток опухоли НСТ116 к выходу из стадии индуцированного старения.

Материалы и методы. Фенотип старения определяли с помощью анализа изменения активности β-галактозидазы, а также оценки распределения клеток по фазам цикла и уровня белков методом вестерн-блоттинга. Колонии окрашивали кристаллическим фиолетовым.

Результаты. Выявлено, что продолжительность инкубации клеток НСТ116 с низкой дозой доксорубицина влияет на их способность к возврату к повторной пролиферации: увеличение времени инкубации при одинаковой дозе препарата снижает колониюобразование. Длительность воздействия доксорубицином не изменяет процесс формирования фенотипа старения, что было подтверждено нами при анализе различных маркеров данной стадии (изменение активности β-галактозидазы, распределение клеток по фазам цикла, уровни белков p21 и p-γH2AX). Однако наблюдается замедление развития ответа клеток на повреждения ДНК, вызванные доксорубицином, в клетках, подвергнутых более продолжительной инкубации с ним (повышение активности β-галактозидазы, формирование полиплоидных клеток).

Заключение. Длительность воздействия доксорубицином на клетки рака НСТ116 влияет на долгосрочные последствия, снижая способность «стареющих» клеток к выходу из стадии старения при удлинении времени инкубации с препаратом.

Ключевые слова: НСТ116, доксорубин, клеточное старение, колониюобразование

Для цитирования: Персиянцева Н.А., Вихрова С.Ю., Короткова М.С. и др. Снижение способности клеток НСТ116 к выходу из стадии индуцированного терапией старения при увеличении длительности воздействия доксорубицином. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):90–8. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-90-98>

Decreasing the ability of HCT116 cells to escape from therapy induced senescence by increasing the duration of doxorubicin treatment

N.A. Persiyantseva¹, S. Yu. Vikhrova^{1,2}, M.S. Korotkova^{1,2}, D.B. Kazansky¹, V.V. Tatarsky³, M.A. Zamkova^{1,3}

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119048, Russia;

³Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences; 34/5 Vavilova St., Moscow 119334, Russia

Contacts: Maria Anatolievna Zamkova zamkovam@gmail.com

Introduction. Due to the toxicity of high doses of chemotherapy, low concentrations used in cancer treatment leads to the development of senescence phenotype in tumor cells, characterized by a block in the cell cycle progression and the absence of division; changes in the transcriptional and metabolic profile of cells. A negative consequence of this stage is acquisition of individual cells the ability to escape from senescence and return to re-proliferation.

Aim. To estimate the effect of the duration of drug treatment of HCT116 tumor cells on their ability to escape from therapy induced senescence.

Materials and methods. The senescence phenotype was confirmed by the analysis of β -galactosidase activity; cell cycle analysis; estimation of protein levels by western blotting. Colonies were stained with crystal violet dye.

Results. In our study, we showed that the duration of HCT116 cells incubation with low-dose doxorubicin affects their ability to return to re-proliferation – increasing the treatment time using same drug dose reduces the process of colony formation. The duration of doxorubicin treatment does not affect the formation of the senescence phenotype, which was confirmed by analyzing different markers of this stage (changes in β -galactosidase activity, cell cycle analysis, assessment of p21 and γ H2AX protein levels). However, there is a delay in the development of cellular response to DNA damage caused by doxorubicin in cells exposed to prolong treatment protocol (increase in β -galactosidase activity, formation of polyploid cells).

Conclusion. The duration of doxorubicin treatment of HCT116 cancer cells affects long-term consequences, reducing the ability of senescent cells to escape this stage when the incubation time with the drug is extended.

Keywords: HCT116, doxorubicin, senescence, colony formation

For citation: Persiyantseva N.A., Vikhrova S.Yu., Korotkova M.S. et al. Decreasing the ability of HCT116 cells to escape from therapy induced senescence by increasing the duration of doxorubicin treatment. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(1):90–8. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-90-98>

ВВЕДЕНИЕ

Применение высоких доз химиотерапевтических препаратов при лечении злокачественных новообразований сопровождается развитием неблагоприятных для организма побочных эффектов, вплоть до летального исхода [1]. Снижение частоты их возникновения и степени достигается за счет уменьшения доз препаратов, применения коротких интервальных курсов терапии и т. п. [2, 3]. Однако невысокие концентрации веществ приводят к формированию в опухолевых клетках фенотипа клеточного старения, характеризующегося отсутствием их пролиферации [4]. Установление стадии старения не является благоприятным исходом терапии, поскольку отдельные опухолевые клетки способны к выходу из нее и к возврату к повторной пролиферации, что вызывает рецидив опухоли [5].

Фенотип индуцированного терапией клеточного старения имеет характерные особенности [6]. Его развитие сопровождается повышением уровней белков p21 и p16, являющихся негативными регуляторами прогрессии клеточного цикла, вследствие чего происходит его остановка на стадии G1 или G2/M [7]. Изменяются размер и морфология клеток, повышается активность фермента β -галактозидазы, формируется секреторный фенотип. «Стареющая» клетка имеет особые транскрипционный и метаболический профили. Изменения, происходящие в клетке, направлены на устранение повреждений ДНК, вызванных действием химиопрепарата, и на поддержание ее жизнеспособности [4, 8].

В исследованиях с использованием модельных клеточных линий, находящихся в стадии индуцированного терапией старения, применяют разные схемы

индукции данной стадии, в частности различающиеся по времени инкубации с химиопрепаратом [9, 10]. В одних работах применяют короткое воздействие лекарственного средства (до 24 ч) [10, 11], тогда как в других – длительную инкубацию тех же клеток в присутствии препарата (от 3 до 7 дней, в зависимости от типа клеток) [9, 12]. В обоих случаях в клетках формируется фенотип старения. Однако остается непонятным влияние продолжительности воздействия химиопрепарата на долгосрочные последствия этой стадии, такие как степень развития секреторного фенотипа и опосредуемых им паракринных эффектов, способность отдельных клеток к повторной пролиферации после окончания действия лекарственного средства и др. Режимы (непрерывный режим, пульс-терапия, вариации длительности интервалов между воздействиями) и дозы препаратов во многом определяют эффективность химиотерапии [13]. Предлагаются математические модели, которые учитывают разные параметры, определяющие успех терапии [14]. Выявлено, что при одних схемах воздействия доксорубином клетки были способны к возобновлению пролиферации в долгосрочной перспективе, тогда как при других – нет [15].

Для выявления различий в развитии негативных долгосрочных последствий применения короткого и длительного воздействий химиотерапии на модельные культуры опухолевых клеток проведена оценка влияния продолжительности инкубации на способность отдельных клеток к выходу из стадии старения и формированию колоний. На клетках колоректального рака HCT116 мы показали, что при коротком протоколе воздействия (24 ч) на них доксорубином колониеобразующая способность «стареющих» клеток

была значительно выше, чем у тех же культур, прошедших более длительную инкубацию с данным химиопрепаратом. При этом в обоих случаях клетки приобретали фенотип старения, о чем свидетельствует наличие характерных для этой стадии признаков. Данные результаты указывают на то, что, несмотря на приобретение старения, процесс перепрограммирования транскрипции определенных генов, сопровождающий стадию старения, может различаться в клетках, подвергнутых разным по длительности воздействия протоколам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки и препарат. Клетки колоректального рака HCT116 культивировали в среде DMEM (C455п, «ПанЭко», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (S1810, Biowest, Южная Америка), антибиотика пенициллин/стрептомицин («ПанЭко», Россия) и глутамина («ПанЭко», Россия). Доксорубицин (Sigma, США) разводили в дистиллированной воде для получения 10 мМ стокового раствора.

Окраска клеток для определения активности β -галактозидазы (SA- β -Gal и C12FDG). Иммуноцитохимическую окраску клеток проводили с использованием коммерческого набора (Cell Signaling, США) согласно протоколу производителя. Развитие окраски, отражающее активность β -галактозидазы, оценивали под микроскопом Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония; объектив 20 $\times$). Для анализа активности β -галактозидазы с помощью проточной цитофлуориметрии клетки HCT116, предварительно обработанные 300 мкМ хлорохина (Sigma, США) в течение 30 мин, окрашивали флуоресцентным красителем C12FDG (ThermoFisher Scientific, США) (2 ч в CO₂-инкубаторе). Анализ флуоресценции проводили в канале FITC на проточном цитофлуориметре (BD FACSAria™ III, BD Biosciences, США).

Клеточный цикл. Распределение клеток по фазам клеточного цикла проводили с помощью проточного цитофлуориметра. Клетки предварительно инкубировали в буфере (0,1 % цитрат натрия; 0,3 % NP-40; 100 мкг/мл РНКазы А; 50 мкг/мл пропидия иодида) в течение 30 мин. Анализ результатов проводили с помощью программы FlowJo_v10.8.1 (BD Biosciences, США).

Вестерн-блоттинг. Клетки HCT116 лизировали в буфере RIPA (150 мМ хлорида натрия; 1 % NP-40; 0,5 % дезоксихолата натрия; 0,1 % SDS; 50 мМ TRIS; pH 8,0). Для проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле в лунку вносили 20 мкг белка. Белки переносили на мембрану PVDF (1620177, Bio-Rad, США). Для предотвращения неспецифического связывания антител мембрану инкубировали в 5 % нежирном молоке (Bio-Rad, США) в течение часа. Мембрану окрашивали следующими антителами: p21 (2947, Cell Signaling, США), PARP1 (A18303, Abclonal, Китай), cleaved PARP1 (5625, Cell Signaling, США), фосфо- γ H2AX (9718, Cell Signaling, США), β -актин

(AC026, Abclonal, Китай). Инкубацию проводили в течение ночи при температуре +4 °C. После отмывки от первичных антител мембрану обрабатывали вторичными антителами (анти-кролик), конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (7074, Cell Signaling, США) в течение 40 мин при комнатной температуре. Детекцию сигнала осуществляли с помощью хемилюминесцентного HRP-субстрата (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, США) на хемилюминесцентном ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare, США).

Окраска кристаллическим фиолетовым. Клетки фиксировали 4 % раствором параформальдегида (Sigma, США) в течение 10 мин. После отмывки к ним добавляли кристаллический фиолетовый. Краситель отмывали дистиллированной водой.

Анализ колониеобразующей способности клеток. После инкубации с доксорубицином клетки HCT116 рассеивали для анализа колониеобразующей способности по 10 000 клеток на лунку 6-луночного планшета (SPL Lifesciences, Корея) в трех повторках. Далее проводили окраску колоний с помощью кристаллического фиолетового (см. выше).

Статистический анализ. Оценку различий между выборками определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Низкие дозы химиопрепаратов, в отличие от высоких, не вызывают в обработанных ими опухолевых клетках апоптоз, а приводят к становлению в них стадии клеточного старения [4, 16]. Для разных типов опухолей показаны определенные дозы препаратов, воздействие которыми индуцирует данный фенотип. Так, для клеток HCT116 100–200 нМ доксорубицина приводят к формированию стадии старения [17, 18].

Мы воздействовали на клетки колоректального рака HCT116 200 нМ доксорубицина в течение 24 ч (короткая инкубация) и 72 ч (длительная инкубация). Схема эксперимента представлена на рис. 1.

Для подтверждения установления в клетках фенотипа клеточного старения мы провели иммуноцитохимическую окраску клеток, чтобы определить активность β -галактозидазы (рис. 2, а). На 9-е сутки от начала эксперимента увеличение активности фермента наблюдалось в обоих экспериментальных протоколах воздействия. Данные результаты подтверждены с помощью проточной цитофлуориметрии с применением флуоресцентного красителя C12FDG, который также используется для детекции активности β -галактозидазы [19]. Кроме того, мы проследили динамику развития окраски и обнаружили, что при применении короткого протокола инкубации активность фермента начинала увеличиваться на 3-и сутки от начала эксперимента (анализ через 72 ч), тогда как при длительном воздействии доксорубицина она проявлялась на 5-е сутки (анализ через 5 сут) (рис. 2, б).

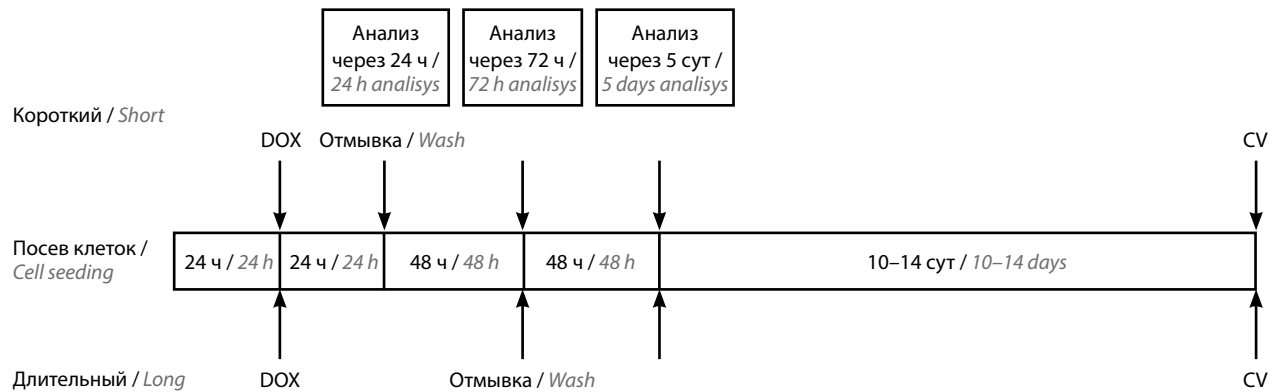


Рис. 1. Схема эксперимента. Вверху показан короткий протокол инкубации с доксорубицином (DOX), внизу — длительный. Началом эксперимента считали день внесения препарата в культуральную среду с клетками. CV — кристаллический фиолетовый
Fig. 1. Experimental design. The top shows a short incubation protocol with doxorubicin (DOX), the bottom — a long one. The day the drug was added to the culture medium was considered as the beginning of the experiment. CV — crystal violet dye

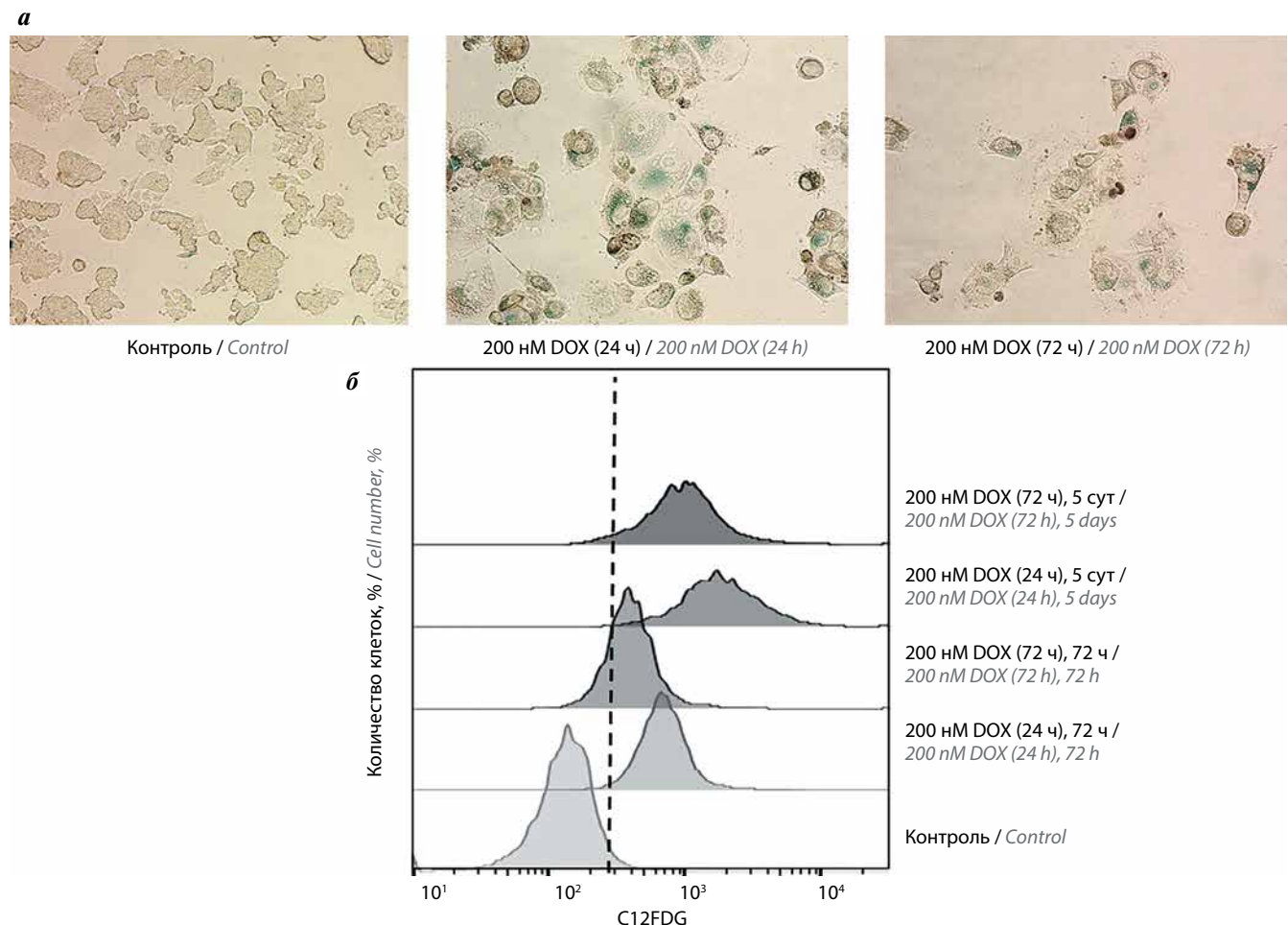


Рис. 2. Оценка активности β -галактозидазы в клетках HCT116, обработанных 200 нМ доксорубицина (DOX) в течение 24 и 72 ч, с помощью иммуноцитохимического окрашивания клеток (а) и метода проточной цитофлуориметрии с применением флуоресцентного красителя C12FDG (б): а — фиксацию и окраску клеток выполняли на 9-е сутки от начала эксперимента. Развитие окраски оценивали на световом микроскопе (объектив 20 $\times$); б — анализ активности β -галактозидазы проводили через 72 ч и 5 сут от начала эксперимента. Контроль — контрольные, не обработанные доксорубицином клетки в логарифмической фазе роста. Вследствие остановки деления клеток под действием доксорубицина их плотность не увеличивалась со временем, что позволяет использовать вышеуказанный контроль
Fig. 2. Estimation of β -galactosidase activity in HCT116 cells treated with 200 nM doxorubicin (DOX) for 24 and 72 h with immunocytochemical (a) and flow cytometry using the fluorescent dye C12FDG methods (b): a — cells were fixed and stained on the 9th day from the start of the experiment. Color development was assessed using a light microscope (objective 20 $\times$); b — analysis of β -galactosidase activity was carried out 72 h and 5 days from the beginning of the experiment. Control — doxorubicin-untreated cells in logarithmic growth phase. Due to the arrest of cell division under doxorubicin treatment, their density did not increase over time, which allows to use the above control

Характерным признаком стадии старения является прекращение деления клеток [20]. Анализ распределения клеток НСТ116 по фазам клеточного цикла показал остановку его прогрессии на стадии G2/M (4n), что отмечается уже через 24 ч инкубации с препаратом (рис. 3). На 3-и сутки от начала эксперимента наблюдалось повышение доли полиплоидных клеток (>4n) в группе, подвергнутой короткому протоколу воздействия (см. рис. 3). При 72-часовой инкубации с пре-

паратом количество полиплоидов возросло на 5-е сутки, но их было меньше по сравнению с 24-часовой обработкой. Таким образом, мы наблюдаем, что динамика развития ответа клеток, подвергнутых короткому воздействию доксорубина, «опережает» таковую в клетках, обработанных препаратом в течение 72 ч.

В клетках НСТ116 отсутствует экспрессия гена *CDKN2A* (белок p16), поэтому оценка развития фенотипа старения проводилась с помощью анализа из-

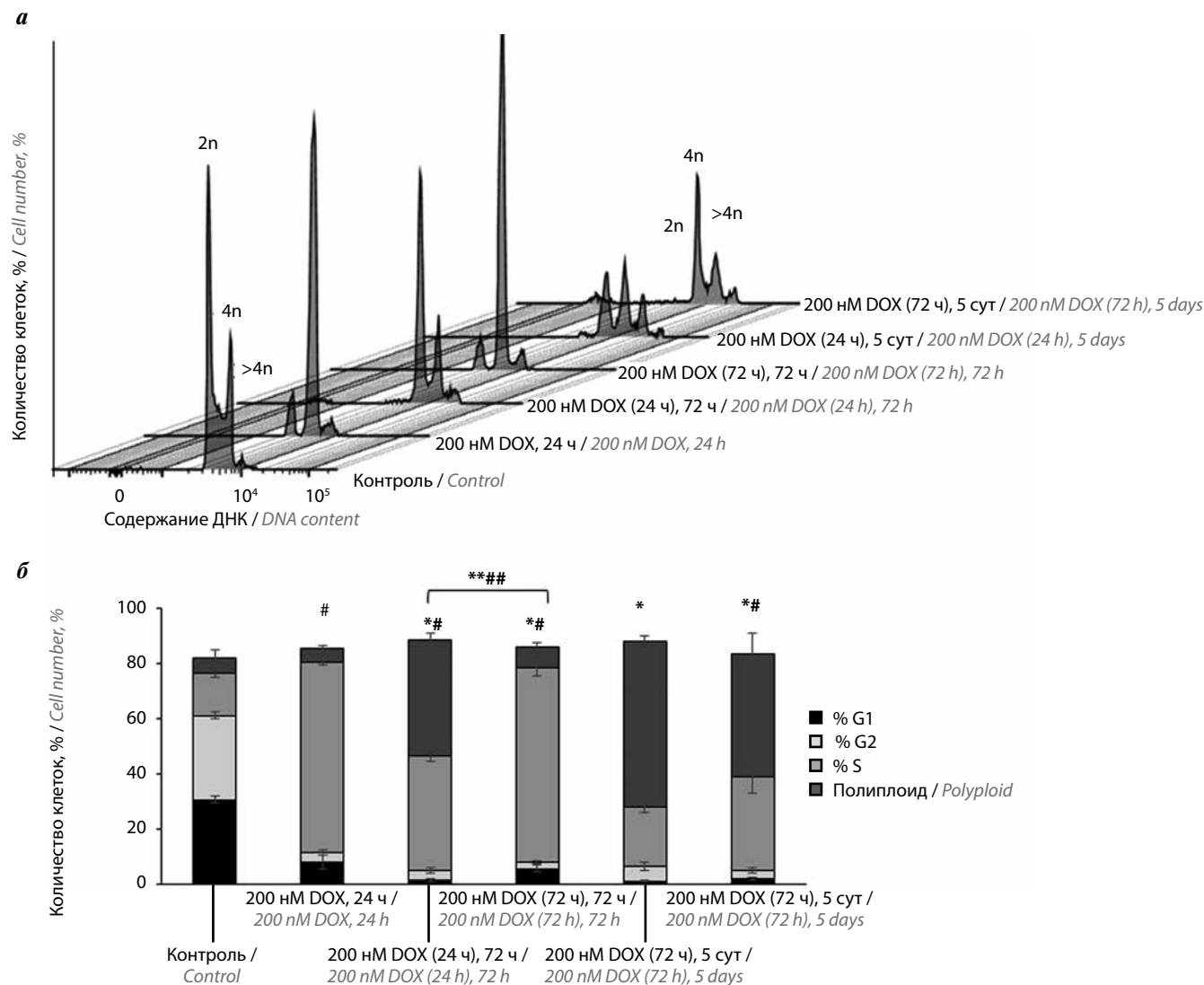


Рис. 3. Анализ распределения клеток НСТ116, подвергнутых короткой и длительной инкубациям с доксорубином (DOX), по фазам клеточного цикла. Оценку проводили через 24, 72 ч и 5 сут от начала эксперимента: а – репрезентативные результаты одного из трех повторов; б – гистограмма, отражающая распределение клеток по фазам клеточного цикла. Сравнительная оценка доли полиплоидов (*) и клеток в стадии G2/M (**) в экспериментальных группах по сравнению с контролем ($p < 0,01$), а также количества полиплоидов (**) и клеток в стадии G2/M (**) между двумя экспериментальными группами (24- и 72-часовое воздействие) ($p < 0,01$) на 3-и сутки от начала эксперимента. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,01$. Контроль – контрольные, не обработанные доксорубином клетки в логарифмической фазе роста. Вследствие остановки деления клеток под действием доксорубина, их плотность не увеличивалась со временем, что позволяет использовать вышеуказанный контроль

Fig. 3. Cell cycle analysis of HCT116 cells subjected to short and long incubation with doxorubicin (DOX). The assessment was carried out 24 h, 72 hours and 5 days from the start of the experiment: a – a representative result from one of three biological replicates is shown; б – histogram reflecting the distribution of cells according to the phases of the cell cycle. Comparative assessment of the proportion of polyploids (*) and cells in the G2/M stage in the experimental groups compared with the control ($p < 0.01$), as well as the number of polyploids (**) and cells in the G2/M stage (**) between two experimental groups (24- and 72-hour exposure) ($p < 0.01$) on the 3rd day from the beginning of the experiment. The differences were considered statistically significant at $p < 0.01$. Control – doxorubicin-untreated cells in logarithmic growth phase. Due to the arrest of cell division under doxorubicin treatment, their density did not increase over time, which allows to use the above control

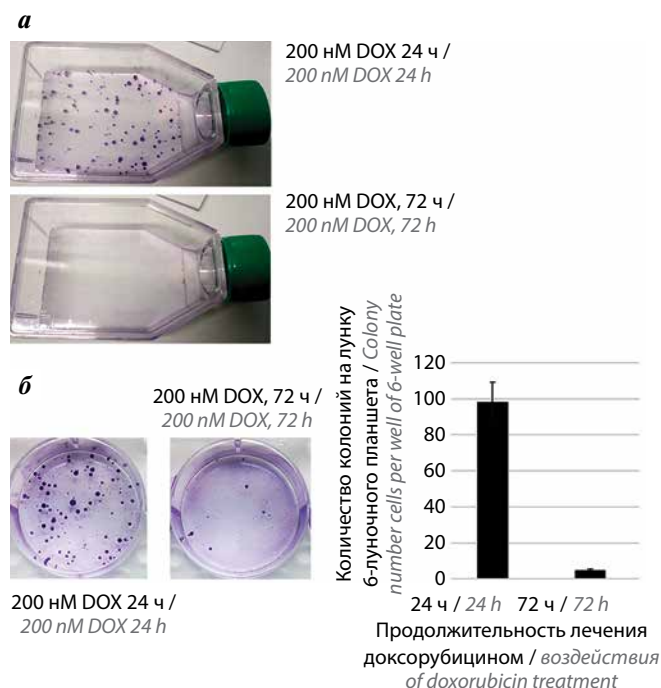


Рис. 5. Анализ способности клеток HCT116, подвергнутых короткой и длительной инкубациям с доксорубицином, к выходу из стадии клеточного старения. Клетки подвергали 24- и 72-часовому воздействию и окрашивали кристаллическим фиолетовым через 10–14 сут от начала эксперимента (по мере развития сформированных колоний, без пересева) (а). Оценка колониеобразующей способности клеток через 3 сут после начала эксперимента (б, слева). Клетки рассевали на колонии по 10 000 клеток на лунку 6-луночного планшета в обеих экспериментальных группах. Окрашку проводили кристаллическим фиолетовым через 10–14 сут (по мере развития сформированных колоний). Гистограмма, отображающая количество сформировавшихся колоний на лунку 6-луночного планшета ($n = 6$) через 10–14 сут после воздействия на клетки доксорубицином (24 и 72 ч) (б, справа)

Fig. 5. Analysis of the ability of HCT116 cells subjected to short and long incubation with doxorubicin to escape from senescence. Cells were treated with doxorubicin for 24 and 72 h and stained with crystal violet 10–14 days from the start of the experiment (as the colonies develop, without subculture) (a). Assessment of the colony-forming ability of cells – 3 days after the start of the experiment, the cells were seeded into colonies of 10,000 cells per well of 6-well plate in both experimental groups (b, left). Staining was carried out with crystal violet dye after 10–14 days (as the colonies develop) (b, right) Histogram shows the number of colonies per well of 6-well plate ($n = 6$) in 10–14 days after doxorubicin treatment (24 and 72 h)

некоторое время после прекращения действия препарата. Использовались 2 протокола инкубации с 200 нМ: 24-часовой (короткий) и 72-часовой (длительный). Клетки приобретали фенотип старения в обоих случаях, что было подтверждено анализом специфических маркеров данной стадии (оценка активности β -галактозидазы, распределения клеток по фазам клеточного цикла, уровней белка p21 и фосфорилированной формы гистона γ H2AX). Однако долгосрочные последствия применения разных протоколов показали значительные различия в поведении клеток. В результате 24-часовой обработки клеток доксорубицином образовалось множество колоний, что указывает на приобретение «стареющими» клетками из данной экспериментальной группы способности к возврату к пов-

торной пролиферации. Мы не обнаружили подобный эффект при применении длительного протокола. Авторы других исследований также указывают на различия в ответе клеток на длительность воздействия химиопрепаратом [26].

Динамика ответа клеток на доксорубицин также различалась между двумя исследуемыми группами. Так, в ходе анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла мы обнаружили, что формирование полиплоидов при коротком протоколе инкубации происходит на 3-и сутки от начала эксперимента, тогда как при 72-часовом воздействии – на 5-е сутки, т.е. и в первом, и во втором случае приблизительно через 2 сут после удаления доксорубицина из культуральной среды. Похожая динамика наблюдается и в отношении активности β -галактозидазы (см. рис. 2, в и 3). Процесс полиплоидизации является своего рода приспособительным механизмом, направленным на сохранение выживаемости клеток, подвергнутых стрессовому воздействию [27, 28]. По данным некоторых исследований, результатом деполиплоидизации является возврат «стареющих» клеток к повторной пролиферации [29, 30]. В настоящей работе мы показали, что только клетки, подвергнутые короткому протоколу воздействия, были способны к процессу колониеобразования, несмотря на то, что формирование полиплоидов наблюдалось в обеих экспериментальных группах (с разницей по времени появления).

Формирование полиплоидных клеток обратно коррелирует с динамикой уровня циклина B1. Мы наблюдали повышение его количества через 24 и 72 ч от начала воздействия, что соответствовало преобладанию клеток в фазе G2/M, и снижение уровня этого белка на 5-е сутки эксперимента, что сопровождалось значительным увеличением доли полиплоидов (см. рис. 3). Данные результаты согласуются с другим исследованием, в котором также отмечалось наличие негативной корреляции между уровнем циклина B1 и долей полиплоидов при распределении клеток по фазам цикла [23].

Таким образом, мы показали, что, несмотря на установление фенотипа старения в клетках, подвергнутых разному по продолжительности воздействию одинаковой (низкой) дозой доксорубицина (200 нМ), они имеют различные долгосрочные последствия пребывания в этой стадии. Способность к выходу из нее и возврату к повторной пролиферации преобладает у клеток, прошедших короткую инкубацию с препаратом. Разная динамика развития ответа может указывать на различия в степени повреждения/скорости репарации ДНК (уровень гистона γ H2AX), активации определенных сигнальных путей, что, несомненно, требует проведения дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, способность отдельных клеток, находящихся в стадии индуцированного низкой дозой

доксорубина старения, к выходу из этой стадии зависит от продолжительности воздействия. Наблюдается значительное преобладание повторно делящихся клеток в группе, подвергнутой короткому протоколу

инкубации. Используемые протоколы воздействия приводят к становлению фенотипа клеточного старения, однако динамика ответа на вызванные повреждения ДНК различается между двумя группами.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Schirmacher V. From chemotherapy to biological therapy: a review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol* 2019;54(2):407–19. DOI: 10.3892/ijo.2018.4661
- Cockrell C., Axelrod D.E. Optimization of dose schedules for chemotherapy of early colon cancer determined by high-performance computer simulations. *Cancer Inform* 2019;18:1176935118822804. DOI: 10.1177/1176935118822804
- De Souza R., Zahedi P., Badame R.M. et al. Chemotherapy dosing schedule influences drug resistance development in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 2011;10 (7):1289–99. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0058
- Zamkova M.A., Persiyantseva N.A., Tatarskiy V.V. et al. Therapy-induced tumor cell senescence: mechanisms and circumvention. *Biochemistry (Mosc)* 2023;88(1):86–104. DOI: 10.1134/S000629792301008X
- Yang L., Fang J., Chen J. Tumor cell senescence response produces aggressive variants. *Cell Death Discov* 2017;3:17049. DOI: 10.1038/cddiscovery.2017.49
- Fitsiou E., Soto-Gamez A., Demaria M. Biological functions of therapy-induced senescence in cancer. *Semin Cancer Biol* 2022; 81:5–13. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.03.021
- Kumari R., Jat P. Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:645593. DOI: 10.3389/fcell.2021.645593
- Hernandez-Segura A., Nehme J., Demaria M. Hallmarks of cellular senescence. *Trends Cell Biol* 2018;28 (6):436–53. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.02.001
- El-Far A.H., Darwish N.H.E., Mousa S.A. Senescent colon and breast cancer cells induced by doxorubicin exhibit enhanced sensitivity to curcumin, caffeine, and thymoquinone. *Integr Cancer Ther* 2020;19:1534735419901160. DOI: 10.1177/1534735419901160
- Mosieniak G., Sliwinska M.A., Alster O. et al. Polyploidy formation in doxorubicin-treated cancer cells can favor escape from senescence. *Neoplasia* 2015;17(12):882–93. DOI: 10.1016/j.neo.2015.11.008
- Bojko A., Staniak K., Czarnecka-Herok J. et al. Improved autophagic flux in escapers from doxorubicin-induced senescence/polyplody of breast cancer cells. *Int J Mol Sci* 2020;21(17). DOI: 10.3390/ijms21176084
- Pacifico F., Mellone S., D'Incalci M. et al. Trabectedin suppresses escape from therapy-induced senescence in tumor cells by interfering with glutamine metabolism. *Biochem Pharmacol* 2022;202:115159. DOI: 10.1016/j.bcp.2022.115159
- Mathur D., Taylor B.P., Chatila W.K. et al. Optimal strategy and benefit of pulsed therapy depend on tumor heterogeneity and aggressiveness at time of treatment initiation. *Mol Cancer Ther* 2022;21(5):831–43. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0574
- Borges F.S., Iarosz K.C., Ren H.P. et al. Model for tumour growth with treatment by continuous and pulsed chemotherapy. *Biosystems* 2014;116:43–8. DOI: 10.1016/j.biosystems.2013.12.001
- Howard G.R., Jost T.A., Yankeelov T.E. et al. Quantification of long-term doxorubicin response dynamics in breast cancer cell lines to direct treatment schedules. *PLoS Comput Biol* 2022; 18 (3):e1009104. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1009104
- Wang B., Kohli J., Demaria M. Senescent cells in cancer therapy: friends or foes? *Trends Cancer* 2020;6(10):838–57. DOI: 10.1016/j.trecan.2020.05.004
- Kitada K., Pu F., Toi M. Occurrence of senescence-escaping cells in doxorubicin-induced senescence is enhanced by PD0332991, a cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, in colon cancer HCT116 cells. *Oncol Lett* 2019;17(1):1153–9. DOI: 10.3892/ol.2018.9657
- Chang B.D., Swift M.E., Shen M. et al. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99 (1):389–94. DOI: 10.1073/pnas.012602599
- Cahu J., Sola B. A sensitive method to quantify senescent cancer cells. *J Vis Exp* 2013;78:50494. DOI: 10.3791/50494
- Ewald J.A., Desotelle J.A., Wilding G. et al. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010;102 (20):1536–46. DOI: 10.1093/jnci/djq364
- Myohanen S.K., Baylin S.B., Herman J.G. Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res* 1998;58(4):591–3.
- Gruosso T., Mieulet V., Cardon M. et al. Chronic oxidative stress promotes H2AX protein degradation and enhances chemosensitivity in breast cancer patients. *EMBO Mol Med* 2016;8(5):527–49. DOI: 10.15252/emmm.201505891
- Kikuchi I., Nakayama Y., Morinaga T. et al. A decrease in cyclin B1 levels leads to polyploidization in DNA damage-induced senescence. *Cell Biol Int* 2010;34(6):645–53. DOI: 10.1042/CBI20090398
- Saleh T., Tyutyunyk-Massey L., Gewirtz D.A. Tumor cell escape from therapy-induced senescence as a model of disease recurrence after dormancy. *Cancer Res* 2019;79(6):1044–6. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3437
- Afifi M.M., Crncec A., Cornwell J.A. et al. Irreversible cell cycle exit associated with senescence is mediated by constitutive MYC degradation. *Cell Rep* 2023;42(9):113079. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.113079
- Lupertz R., Watjen W., Kahl R. et al. Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology* 2010;271(3):115–21. DOI: 10.1016/j.tox.2010.03.012
- Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. Polyploidy and myc proto-oncogenes promote stress adaptation via epigenetic plasticity and gene regulatory network rewiring. *Int J Mol Sci* 2022;23(17):9691. DOI: 10.3390/ijms23179691
- Meierjohann S. Effect of stress-induced polyploidy on melanoma reprogramming and therapy resistance. *Semin Cancer Biol* 2022;81:232–40. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.02.005
- Puig P.E., Guilly M.N., Bouchot A. et al. Tumor cells can escape DNA-damaging cisplatin through DNA endoreduplication and reversible polyploidy. *Cell Biol Int* 2008;32(9):1031–43. DOI: 10.1016/j.cellbi.2008.04.021
- Sikora E., Czarnecka-Herok J., Bojko A. et al. Therapy-induced polyploidization and senescence: coincidence or interconnection? *Semin Cancer Biol* 2022;81:83–95. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.11.015

Благодарности

Авторы выражают благодарность А.М. Щербакову за ценные комментарии.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to A.M.

Вклад авторов

Н.А. Персиянцева: постановка экспериментов, обработка результатов;

С.Ю. Вихрова, М.С. Короткова: постановка экспериментов;

Д.Б. Казанский, В.В. Татарский: техническое обеспечение работы;

М.А. Замкова: постановка экспериментов, обработка результатов, написание текста статьи.

Authors' contributions

N.A. Persiyantseva: performed experiments, analyzed results;

S.Yu. Vikhrova, M.S. Korotkova: performed experiments;

D.B. Kazansky, V.V. Tatarsky: technical support of study;

M.A. Zamkova: performed experiments, analyzed results, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.А. Персиянцева / N.A. Persiyantseva: <https://orcid.org/0000-0002-2097-5986>

Д.Б. Казанский / D.B. Kazansky: <https://orcid.org/0000-0002-4179-8421>

В.В. Татарский / V.V. Tatarsky: <https://orcid.org/0000-0002-9080-5683>

М.А. Замкова / M.A. Zamkova: <https://orcid.org/00000-0002-4687-7444>

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 № 22-24-00212; <https://www.rscf.ru/project/22-24-00212/?CODE=22-24-00212>).

Funding. The work was carried out with financial support from the Russian Science Foundation (grant No. 22-24-00212; <https://www.rscf.ru/project/22-24-00212/?CODE=22-24-00212>).

Статья поступила: 14.11.2023. Принята к публикации: 13.02.2024.

Article submitted: 14.11.2023. Accepted for publication: 13.02.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-99-104>

CC BY 4.0

Роль циркулирующих нейтрофилов в прогрессировании рака почки

И.Р. Мягдиева¹, Т.В. Абакумова¹, Д.Р. Долгова¹, О.Ю. Горшков², Т.П. Генинг¹¹ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»; Россия, 432017 Ульяновск, ул. Льва Толстого, 42;²ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер»; Россия, 432017 Ульяновск, ул. 12 Сентября, 90**Контакты:** Илья Ринатовна Мягдиева ilseya2015@yandex.ru

Введение. В настоящее время остается актуальным вопрос о роли нейтрофилов в прогрессировании рака почки. Эти клетки способны проявлять проопухолевые свойства посредством секреции цитокинов, хемокинов, факторов роста, которая определяется экспрессией генов данных молекул. Функциональная гетерогенность нейтрофилов характеризуется различиями в паттернах экспрессии генов.

Цель исследования – оценка роли циркулирующих нейтрофилов в прогрессировании рака почки.

Материалы и методы. В циркулирующих нейтрофилах пациентов с верифицированным раком почки светлоклеточного типа I–III стадии по классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TNM) ($n = 88$) до хирургического лечения и условно здоровых доноров (контрольная группа) ($n = 20$) методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией определяли экспрессию генов *NGAL*, *MMP-13* и *VEGF-A*.

Результаты. Отмечены повышение экспрессии гена *NGAL* в циркулирующих нейтрофилах при РП начальных стадий ($p = 0,05$) и ее снижение при РП поздних стадий ($p = 0,03$). Выявлена высокая экспрессия гена *MMP-13* в циркулирующих нейтрофилах при раке почки всех стадий относительно контрольных значений (при I стадии $p = 0,005$; при II – $p = 0,003$; при III – $p = 0,0008$). При раке почки I стадии наблюдалась прямая корреляционная связь между экспрессией генов *NGAL* и *MMP-13* в нейтрофилах ($r = 0,696$; $p = 0,003$). Также в группе пациентов с раком почки обнаружена прямая корреляция между экспрессией генов *NGAL* и *VEGF-A* ($r = 0,322$; $p = 0,049$). В мультивариантной регрессионной модели Кокса в отношении безрецидивной выживаемости выявлена предиктивная ценность экспрессии генов *VEGF-A* и *NGAL* в циркулирующих нейтрофилах. При увеличении экспрессии этих генов в нейтрофилах на 1 единицу риск возникновения метастазов возрастает в 0,80 (0,65–0,99; $p = 0,043$) и 1,42 (1,01–2,00; $p = 0,046$) раза соответственно. Анализ безрецидивной выживаемости по методу Каплана–Майера у пациентов с раком почки показал влияние уровня экспрессии *NGAL* в циркулирующих нейтрофилах на выживаемость без прогрессирования. В группе пациентов с высокой экспрессией *NGAL* медиана наблюдения составила 31,7 мес, в группе с низкой экспрессией этого гена – более 36 мес (log-rank-test; $p = 0,017$).

Заключение. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что циркулирующие нейтрофилы играют ведущую роль в прогрессировании рака почки. Уровень экспрессии генов *NGAL* и *VEGF-A* в этих клетках может быть использован при прогнозировании безрецидивного периода у пациентов с данным заболеванием.

Ключевые слова: циркулирующие нейтрофилы, рак почки, ангиогенез, *NGAL*, *VEGF-A*, *MMP-13*

Для цитирования: Мягдиева И.Р., Абакумова Т.В., Долгова Д.Р. и др. Роль циркулирующих нейтрофилов в прогрессировании рака почки. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):99–104. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-99-104>

The role of circulating neutrophils in the progression of kidney cancer

I.R. Magdieva¹, T.V. Abakumova¹, D.R. Dolgova¹, O.Y. Gorshkov², T.P. Gening¹¹Ulyanovsk State University; 42 L'va Tolstogo St., Ulyanovsk 432017, Russia;²Regional Clinical Oncological Dispensary; 90 12th September St., Ulyanovsk 432017, Russia**Contacts:** Ilseya Rinatovna Myagdieva ilseya2015@yandex.ru

Introduction. Currently, the question of the role of neutrophils in the progression of kidney cancer remains relevant. Neutrophils are capable of exhibiting protumor properties through the secretion of cytokines, chemokines, and growth factors, which is determined by the expression of genes for these molecules. And the functional heterogeneity of neutrophils is characterized by differences in gene expression patterns.

Aim. To assess the role of circulating neutrophils in the progression of kidney cancer.

Materials and methods. In circulating neutrophils of patients with verified clear cell kidney cancer at stages I–III according to Tumor, Nodus and Metastasis (TNM) ($n = 88$) before surgical treatment and conditionally healthy donors (control group) ($n = 20$), the expression of *NGAL* genes was determined using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, *MMP-13* and *VEGF-A*.

Results. There was an increase in *NGAL* gene expression in circulating neutrophils ($p = 0.05$) at the initial stage and a decrease in it at advanced stages of kidney cancer ($p = 0.03$). High expression of the *MMP-13* gene by circulating neutrophils was detected at all stages of kidney cancer relative to control values (at stage I $p = 0.005$; at stage II $p = 0.003$; at stage III $p = 0.0008$). A significant direct correlation was observed between the expression of the *NGAL* and *MMP-13* genes in neutrophils at stage I kidney cancer ($r = 0.696$; $p = 0.003$). In the group of patients with kidney cancer, a direct correlation was found between the expression of the *NGAL* and *VEGF-A* genes ($r = 0.322$; $p = 0.049$). A multivariable Cox regression model for disease-free survival revealed the predictive value of *VEGF-A* and *NGAL* genes expression in circulating neutrophils. With an increase in the expression of the *VEGF-A* and *NGAL* genes in neutrophils by 1 unit, the risk of metastases increases by 0.80 (0.65–0.99; $p = 0.043$) and 1.42 (1.01–2.00; $p = 0.046$) times, respectively. The Kaplan–Meier analysis of disease-free survival in patients with kidney cancer showed the influence of *NGAL* expression in circulating neutrophils on progression-free time. In the group of patients with high *NGAL* expression, the median follow-up was 31.7 months, and in the group with low *NGAL* expression – more than 36 months (log-rank-test; $p = 0.017$).

Conclusion. Thus, the data obtained suggest that circulating neutrophils play a leading role in the progression of kidney cancer. The level of expression of *NGAL* in circulating neutrophils can be used to predict the relapse-free period in patients with kidney cancer.

Keywords: circulating neutrophils, kidney cancer, angiogenesis, *NGAL*, *VEGF-A*, *MMP-13*

For citation: Magdieva I.R., Abakumova T.V., Dolgova D.R. et al. The role of circulating neutrophils in the progression of kidney cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(1):99–104. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-99-104>

ВВЕДЕНИЕ

Светлоклеточный рак почки (РП) — наиболее распространенный тип рака данной локализации (более 90 % случаев), возникающий из эпителиальных клеток почечных канальцев. Рак почки считается иммуногенным новообразованием; чувствительность опухоли к иммунотерапии определяется ее микроокружением [1].

Развитие опухоли и ее реакция на терапию зависят от воспаления, в инициации, развитии и разрешении которого участвуют цитокины и факторы роста [2]. Имунокомпетентные клетки (нейтрофилы (Нф), тучные клетки, NK-клетки (NK — естественные киллеры), дендритные клетки, макрофаги) способны стимулировать развитие опухолевого ангиогенеза посредством выделения проангиогенных факторов [3].

Нейтрофилы являются ключевыми эффекторными клетками врожденного иммунитета и играют решающую роль в воспалении, вызванном инфекциями, а также в опухолиассоциированном воспалении. Они могут обладать как противоопухолевой (N1), так и проопухолевой (N2) активностью [4].

Проопухолевые Нф способствуют развитию канцерогенеза [5] посредством выработки факторов роста, включая матриксную металлопротеиназу-9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9), фактор роста эндотелия сосудов A (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A), фактор некроза опухоли α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) и хемокины (в том числе интерлейкин-8 (IL-8)), что также приводит к увеличению проницаемости сосудов и способствует дополнительному привлечению иммунных клеток [6].

Экспрессия VEGF-A коррелирует с инвазивностью опухоли, плотностью сосудов, метастазирова-

нием, развитием рецидивов и прогнозом при раке яичников и колоректальном раке [7]. Нейтрофилы, секретируя MMP-9, способствуют, в свою очередь, высвобождению VEGF-A [8]. При этом матриксная металлопротеиназа-13 (matrix metalloproteinase 13, MMP-13, коллагеназа 3) играет ведущую роль в каскаде активации матриксных металлопротеиназ. Однако образование комплекса MMP-9/NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin — липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой) защищает MMP-9 от протеолитической деградаци и усиливает ее ферментативную активность. Известно, что уровень *NGAL* в моче в значительной степени связан со стадией РП, поэтому его рассматривают как потенциальный биомаркер для оценки прогноза при данной патологии [9].

Гипотеза, объясняющая роль *NGAL* в канцерогенезе, состоит в том, что Нф, рекрутирующие в опухоль, подвергаются апоптозу и высвобождают гранулы, содержащие *NGAL* [10].

Показано, что Нф изменяют свою поляризацию в сторону N1 или N2 под влиянием факторов, выделяемых опухолью, еще в кровотоке [11]. Функциональная гетерогенность Нф определяется различиями в паттернах экспрессии генов этих клеток [12]. При стимуляции Нф факторами воспаления изменяется профиль экспрессии генов [13], что приводит к смене фенотипа и функционального потенциала Нф [14].

Таким образом, анализ экспрессии генов ангиогенных факторов и факторов воспаления позволяет оценить потенциальную роль циркулирующих Нф в неопластическом ангиогенезе.

Цель исследования — оценка роли циркулирующих Нф в прогрессировании РП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы Нф крови пациентов с РП светлоклеточного типа до лечения. Медиана возраста больных составила 60 лет (Q_1-Q_3 : 58,5–63,5 года). Характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика пациентов с раком почки, включенных в исследование

Table 1. Characteristics of patients with kidney cancer included in the study

Показатель Parameter	Число пациентов ($n = 88$) Number of patients ($n = 88$)
Пол Sex:	
мужской male	45
женский female	43
Статус курения Smoking status:	
курящие smokers	20
некурящие non-smokers	68
Стадия заболевания Disease stage:	
I	28
II	30
III	30
Распространенность первичной опухоли по классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TNM) Prevalence of the primary tumor according to the classification of Tumor, Nodus and Metastasis (TNM):	
T1	28
T2	30
T3	30
Наличие метастазов: Metastases:	
нет no	78
есть yes	10
Локализация метастазов Metastasis sites:	
лимфатические узлы lymph nodes	2
легкие lungs	6
кости bones	2

Нейтрофилы выделяли из взвеси лейкоцитов на двойном градиенте плотности растворов фиколаверографина ($\rho_1 = 1,076$ г/мл; $\rho_2 = 1,117$ г/мл) и довели до концентрации $5 \cdot 10^6$ клеток/мл. РНК выделяли из фракции Нф периферической крови на магнитных частицах SileksMagNA («Силекс», Россия). Проводили

реакцию обратной транскрипции и определяли экспрессию генов методом количественной полимеразной цепной реакции с использованием праймеров, синтезированных на базе ООО «ЕврогенЛаб» (Россия) (табл. 2). Расчет нормализованной экспрессии исследованных генов относительно гена-рефери (*GAPDH*) выполняли с использованием программного обеспечения CFX Manager Bio-Rad Laboratories [15].

Таблица 2. Последовательности праймеров исследованных генов в нейтрофилах

Table 2. Primer sequences of the studied genes in neutrophils

Ген Gene	Последовательность Sequence
<i>NGAL</i>	F 5'-TGAGCACCAACTACAACCAG-3' R 5'-AGAGATTTGGAGAAGCGGATG-3' [16]
<i>VEGF-A</i>	F 5'-AGGGCAGAATCATCACGAAGT-3' R 5'-AGGGTCTCGATTGGATGGCA-3' [17]
<i>MMP-13</i>	F 5'-CACTTTATGCTTACTGATGACG-3' R 5'-TCCTCGGAGACTGGTAATGG-3' [18]
<i>GAPDH</i>	F 5'-GGACTCATGACCACAGTCCA-3' R 5'-CCAGTAGAGGCAGGGATGAT-3' [19]

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение STATISTICA 13 (разработчик StatSoft. Inc), Jamovi 1.6.8. Для сравнения независимых переменных применяли U-критерий Манна–Уитни ($p < 0,05$), для изучения связи между исследуемыми параметрами – коэффициент ранговой корреляции Спирмена ($p < 0,05$). Анализ выживаемости пациентов проводили по методу Каплана–Майера. Прогностическую значимость исследуемых параметров определяли с помощью регрессии Кокса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования показали повышение экспрессии гена *NGAL* в циркулирующих Нф при РП начальных стадий ($p = 0,05$) и ее снижение при РП поздних стадий ($p = 0,03$) (табл. 3). Выявлена высокая экспрессия гена *MMP-13* в Нф на всех стадиях РП относительно контрольных значений (при I стадии $p = 0,005$; при II – $p = 0,003$; при III – $p = 0,0008$) (см. табл. 3). Однако различия в экспрессии гена *VEGF-A* в циркулирующих Нф при РП начальных и поздних стадий оказались статистически незначимыми.

Отмечена заметная прямая корреляция между экспрессией генов *NGAL* и *MMP-13* в Нф при РП I стадии ($r = 0,696$; $p = 0,003$). Кроме того, в группе пациентов с РП обнаружена прямая корреляционная связь между экспрессией генов *NGAL* и *VEGF-A* ($r = 0,322$; $p = 0,049$).

В мультивариантной регрессионной модели Кокса прогностической ценностью в отношении безрецидивной выживаемости обладала экспрессия генов *VEGF-A* (отношение рисков (OR) 1,06; 95 % доверительный

Таблица 3. Экспрессия генов *NGAL*, *MMP-13*, *VEGF-A* в циркулирующих нейтрофилах в зависимости от стадий рака почки, Ме (Q1–Q3)
Table 3. Expression of genes *NGAL*, *MMP-13*, *VEGF-A* in circulating neutrophils depending on the stages of kidney cancer, Me (Q1–Q3)

Ген Gen	Контроль Control	I стадия Stage I	II стадия Stage II	III стадия Stage III
<i>NGAL</i>	1,09 (0,48–3,54)	3,00* (0,55–9,54)	0,24 (0,23–1,11)	1,00 (0,36–3,33)
<i>VEGF-A</i>	1,92 (0,65–3,62)	2,25 (0,18–7,11)	3,34 (0,86–5,14)	1,096 (0,65–3,96)
<i>MMP-13</i>	0,293 (0,1–0,92)	1,49* (1,00–10,59)	2,01* (1,05–6,98)	2,15* (0,91–6,46)

*Статистически значимые различия по сравнению с группой контроля ($p \leq 0,05$).
*Statistically significant differences compared to the control ($p < 0.05$).

интервал (ДИ) 0,72–1,57; $p = 0,001$)) и *NGAL* (ОР 0,93; 95 % ДИ 0,62–1,40; $p = 0,007$)) в Нф до лечения. При увеличении на 1 единицу экспрессии гена *VEGF-A* в Нф риск возникновения метастазов возрастал в 0,80 раза (95 % ДИ 0,65–0,99; $p = 0,043$), а при увеличении экспрессии гена *NGAL* – в 1,42 раза (95 % ДИ 1,01–2,00; $p = 0,046$).

Анализ безрецидивной выживаемости по методу Каплана–Майера (log-rank-test) продемонстрировал, что у пациентов с РП с низкой и высокой экспрессией *VEGF-A* в циркулирующих Нф различия по этому показателю оказались статистически незначимыми ($p = 0,83$).

Анализ безрецидивной выживаемости по методу Каплана–Майера (log-rank-test) у пациентов с РП показал влияние уровня экспрессии *NGAL* в циркулирующих Нф на выживаемость без прогрессирования. В группе больных с высокой экспрессией *NGAL* медиана наблюдения составила 31,7 мес, в группе больных с низкой экспрессией этого гена – более 36 мес (log-rank-test; $p = 0,017$).

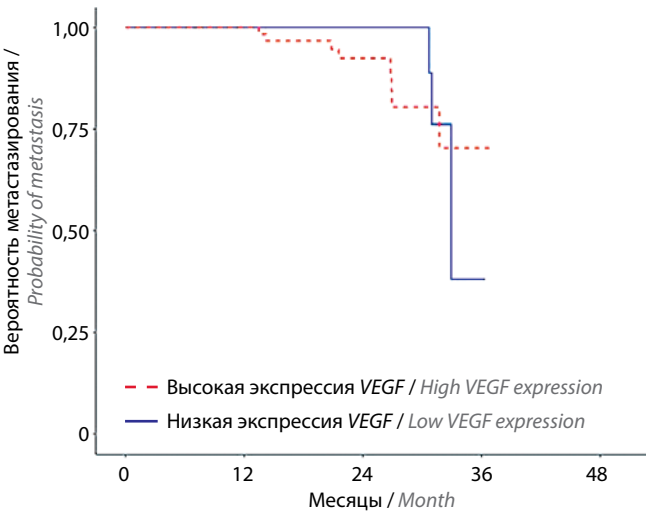


Рис. 1. Выживаемость без прогрессирования у пациентов с раком почки в зависимости от экспрессии гена *VEGF-A* в циркулирующих нейтрофилах
Fig. 1. Progression-free time curve of patients with kidney cancer depending on the expression of the *VEGF-A* gene in circulating neutrophils

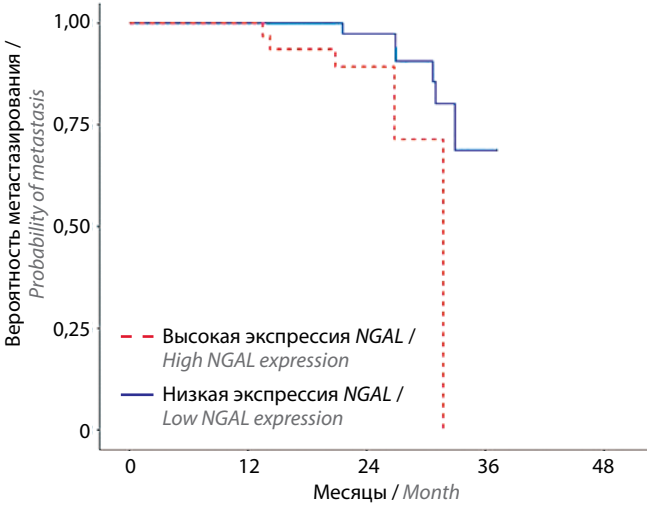


Рис. 2. Выживаемость без прогрессирования у пациентов с раком почки в зависимости от экспрессии гена *NGAL* в циркулирующих нейтрофилах
Fig. 2. Progression-free time curve of patients with kidney cancer depending on the expression of the *NGAL* gene in circulating neutrophils

ОБСУЖДЕНИЕ

Недавние исследования продемонстрировали, что опухолевые клетки изменяют иммунный ландшафт, секретируя цитокины, хемокины и факторы роста и облегчая метастазирование и прогрессирование опухоли [20].

Применение иммунотерапии показало многогранность иммунных процессов при канцерогенезе. Опухоль может использовать множественные механизмы иммунного ингибирования, приводящие к ее ускользанию от иммунного ответа и развитию неопластического ангиогенеза [21]. Высказано предположение о проопухолевой активности Нф при гепатоцеллюлярной карциноме, раке желудка, меланоме и фибросаркоме [22]. На модели опухоли печени показано, что усиленная гипоксия и воспаление поддерживают рекрутирование Нф, которые, в свою очередь, способствуют опухолевому ангиогенезу и прогрессии [23]. Выявлено, что Нф человека высвобождают внутриклеточный пул *VEGF-A* посредством дегрануляции, а также активируют проангиогенные функции других

иммунных клеток [22]. По данным недавних исследований, анти-VEGF-терапия способствует привлечению в опухоль Нф, которые, проявляя проангиогенные свойства, способствуют ее росту, что приводит к неэффективности данного вида лечения [6]. В связи с вышесказанным необходима разработка терапевтических подходов, нацеленных на Нф, и на связанные с ними процессы ангиогенеза. Сочетание антиангиогенной терапии и иммунотерапии уже продемонстрировало свою эффективность в лечении рака [24].

Анализ экспрессии генов ангиогенных факторов и факторов воспаления позволяет оценить потенциальную роль циркулирующих Нф в прогрессировании РП. Известно, что MMP-13 участвует в неопластическом ангиогенезе, так как способна активировать MMP-9, которая в комплексе с NGAL усиливает высвобождение VEGF-A. Согласно данным исследований [25, 26], MMP-13 не обнаруживается в нормальных тканях, но экспрессируется в опухоли при различных типах рака (рак желудка, простаты, почки, молочной железы).

Повышенная экспрессия гена *NGAL* в Нф при РП начальных стадий подтверждает их проопухолевую роль, которая заключается в потенциальной способности усиливать неопластический ангиогенез через выработку MMP-13 [26]. Экспрессия гена MMP-13, по нашим данным, повышена в Нф при РП всех стадий.

Кроме того, NGAL способствует опухолевому росту путем образования комплекса MMP-9/NGAL [10].

Исследование L. Roli и соавт. (2017) показывает, что высокие уровни NGAL в биологических жидкостях, таких как сыворотка и моча, могут быть использованы для прогнозирования безрецидивной выживаемости пациентов с колоректальным раком и раком молочной железы [27]. Однако его прогностическая и диагностическая значимость для опухолей почек остается неясной.

Проведенные ранее исследования [8, 28] показывают, что высокие уровни экспрессии NGAL и VEGF-A связаны с неблагоприятным прогнозом РП. Мы выявили предиктивную значимость экспрессии генов *NGAL* и *VEGF-A* в Нф в мультивариантной модели Кокса при метастазировании РП. Прогностическую значимость показала также экспрессия гена *NGAL* в циркулирующих Нф при РП, что может свидетельствовать о значительном вкладе NGAL в этих клетках в прогрессировании РП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что циркулирующие Нф играют ведущую роль в прогрессировании РП. Уровень экспрессии NGAL в этих клетках может быть использован для прогнозирования безрецидивного периода у пациентов с данной патологией.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- deVivar Chevez A.R., Finke J., Bukowski R. The role of inflammation in kidney cancer. *Inflammation and Cancer. Adv Exp Med Biol* 2014;816:197–234. DOI: 10.1007/978-3-0348-0837-8_9
- Zhao H., Wu L., Yan G. et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6(1):263. DOI: 10.1038/s41392-021-00658-5
- Крамарь Т.В. Патофизиологические аспекты воспалительного и невоспалительного неоангиогенеза. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины* 2020;3:59–63. Kramar T.V. Pathophysiological aspects of inflammatory and non-inflammatory neoangiogenesis. *Krymskij zhurnal eksperimental'noj i klinicheskoy mediciny = Crimean Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2020;3:59–63. (In Russ.).
- Долгушин И.И. Нейтрофильные гранулоциты: новые лица старых знакомых. *Бюллетень сибирской медицины* 2019;18(1):30–7. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-1-30-37 Dolgushin I.I. Neutrophil granulocytes: new faces of old acquaintances. *Byulleten' sibirskoy mediciny = Bulletin of Siberian Medicine* 2019;18(1):30–7. (In Russ.) DOI: 10.20538/1682-0363-2019-1-30-7. (In Russ.).
- Kowanetz M., Wu X., Lee J. et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020;107(50):21248–55. DOI: 10.1073/pnas.1015855107
- Ozel I., Duerig I., Domnich M. et al. The good, the bad, and the ugly: neutrophils, angiogenesis, and cancer. *Cancers (Basel)* 2022;14(3):536. DOI: 10.3390/cancers14030536
- Apte R.S., Chen D.S., Ferrara N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development. *Cell* 2019;176(6):1248–64. DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.021
- Purohit A., Saxena S., Varney M. et al. Host Cxcr2-dependent regulation of pancreatic cancer growth, angiogenesis, and metastasis. *Am J Pathol* 2021;191(4):759–71. DOI: 10.1016/j.ajpath.2021.01.002
- Ben Khadhra H., Rose-Robert F., Herpe Y.E. et al. ARCHITECT® urine-neutrophil gelatinase-associated lipocalin (u-NGAL) assay as new prognostic marker for clear cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC) (preliminary results). *Int Urol Nephrol* 2020;53(1):59–67. DOI: 10.1007/s11255-020-02604-w
- Chakraborty S., Kaur S., Guha S., Batra S.K. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012;1826(1):129–69. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.03.008
- Zhu S., Li S., Yi M. et al. Roles of microvesicles in tumor progression and clinical applications. *Int J Nanomed* 2021;16:7071–90. DOI: 10.2147/IJN.S325448
- Maskarinec S.A., McKelvy M., Boyle K. et al. Neutrophil functional heterogeneity is a fixed phenotype and is associated with distinct gene expression profiles. *J Leukoc Biol* 2022;112(6):1485–95. DOI: 10.1002/JLB.4A0322-164R
- Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011;11(8):519–31. DOI: 10.1038/nri3024

14. Liu K., Sun E., Wang L. et al. Gene expression in human polymorphonuclear neutrophils (PMNs) stimulated by bacillus Calmette–Guérin (BCG). *Inflammation* 2020;43(6):2098–108. DOI: 10.1007/s10753-020-01277-y
15. Ramezani A. CtNorm: realtime PCR cycle of threshold (Ct) normalization algorithm. *J Microbiol Methods* 2021;187:106267. DOI: 10.1016/j.mimet.2021.106267
16. Mir S.U., Jin L., Craven R.J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) expression is dependent on the tumor-associated sigma-2 receptor S2RPrmc1. *J Biol Chem* 2012;287(18):14494–501. DOI: 10.1074/jbc.M111.324921
17. Zhang Q., Lu D., Liu W. et al. Effects of KIF2A on the prognosis of nasopharyngeal carcinoma and nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol Lett* 2019;18(3):2718–23. DOI: 10.3892/ol.2019.10597
18. Sofia V., Nasrul E., Manjas M., Revilla G. Analysis of the relationship between RELA gene expression and MMP-13 gene expression in synovial cells after mesenchymal stem cell wharton jelly. *Open Access Maced J Med Sci* 2019;7(4):543–8. DOI: 10.3889/oamjms.2019.135
19. Irvani Saadi M., Salami J., Abdi H. et al. Expression of interleukin 1, interleukin 27, and TNF- α genes in patients with ischemic cardiomyopathy versus idiopathic dilated cardiomyopathy: a case-control study. *Health Sci Rep* 2022;5(4):e701. DOI: 10.1002/hsr.2.701
20. Varricchi G., Galdiero M.R., Marone G. et al. Controversial role of mast cells in skin cancers. *Exp Dermatol* 2017;26:11–7. DOI: 10.1111/exd.13107
21. Chen D.S., Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 2017;541(7637):321–30. DOI: 10.1038/nature21349
22. Jablonska J., Leschner S., Westphal K. et al. Neutrophils responsive to endogenous IFN- β regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J Clin Invest* 2010;120(4):1151–64. DOI: 10.1172/JCI37223
23. Zhao Y., Huang X., Ding T.W., Gong Z. Enhanced angiogenesis, hypoxia and neutrophil recruitment during Myc-induced liver tumorigenesis in zebrafish. *Sci Rep* 2016;6:31952. DOI: 10.1038/srep31952
24. Lee W.S., Yang H., Chon H.J., Kim C. Combination of anti-angiogenic therapy and immune checkpoint blockade normalizes vascular-immune crosstalk to potentiate cancer immunity. *Exp Mol Med* 2020;52(9):1475–85. DOI: 10.1038/s12276-020-00500-y
25. Shah M., Huang D., Blick T. et al. An MMP13-selective inhibitor delays primary tumor growth and the onset of tumor-associated osteolytic lesions in experimental models of breast cancer. *PLoS One* 2012;7(1):e29615. DOI: 10.1371/journal.pone.0029615
26. Li S., Pritchard D.M., Yu L.G. Regulation and function of matrix metalloproteinase-13 in cancer progression and metastasis. *Cancers (Basel)* 2022;14(13):3263. DOI: 10.3390/cancers14133263
27. Roli L., Pecoraro V., Trenti T. Can NGAL be employed as prognostic and diagnostic biomarker in human cancers? A systematic review of current evidence. *Int J Biol Markers* 2017;32(1):e53–61. DOI: 10.5301/jbm.5000245
28. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Усынин Е.А. и др. Влияние транскрипционных факторов, VEGF и протеиназы на прогрессирование рака почки. *Сибирский онкологический журнал* 2018;17(4):67–74. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-4-67-74
- Spirina L.V., Kondakova I.V., Usynin E.A. et al. Impact of transcription factors, VEGF and proteases on kidney cancer progression. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2018;17(4):67–74. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-4-67-74

Вклад авторов

И.Р. Мягдиева: проведение полимеразной цепной реакции, анализ полученных данных, написание текста статьи;
Т.В. Абакумова: научное руководство, разработка концепции и дизайна исследования;
Д.Р. Долгова: подбор праймеров;
О.Ю. Горшков: подбор групп пациентов, сбор клинических данных;
Т.П. Генинг: научное редактирование.

Authors' contribution

I.R. Myagdieva: conducting a polymerase chain reaction, analyzing the data obtained, article writing;
T.V. Abakumova: scientific guidance, development of the concept and design of the study;
D.R. Dolgova: selection of primers;
O.Y. Gorshkov: selection of patient groups, collection of clinical data;
T.P. Gening: scientific editing.

ORCID авторов / ORCID authors

И.Р. Мягдиева / I.R. Magdieva: <https://orcid.org/0000-0002-3908-0840>
Т.В. Абакумова / T.V. Abakumova: <https://orcid.org/0000-0001-7559-5246>
Д.Р. Долгова / D.R. Dolgova: <https://orcid.org/0000-0001-5475-7031>
Т.П. Генинг / T.P. Gening: <https://orcid.org/0000-0002-5117-1382>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Института медицины, экологии и физической культуры ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (протокол № 1 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 Institute of Medicine, Ecology and Physical Culture of the Ulyanovsk State University.

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

Статья поступила: 28.11.2023. **Принята к публикации:** 12.02.2024.

Article submitted: 28.11.2023. Accepted for publication: 12.02.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-105-112>

Генетические факторы тромбоза *FII G20210A*, *FV G1691A (Arg506Gln)* у больных со злокачественными опухолями торакоабдоминальной локализации

А.А. Королева¹, С.С. Герасимов¹, Л.Н. Любченко^{2, 3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, Москва 125284, 2-й Боткинский проезд; Россия, Москва 125284, 2-й Боткинский проезд, 3;

³Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 105425 Москва, 3-я Парковая ул., 51, стр. 1

Контакты: Анна Анатольевна Королева anna.korolyova@hotmail.com

Введение. Злокачественная опухоль является одним из ведущих факторов развития как венозного, так и артериального тромбоза. Несмотря на то что нет данных о необходимости диагностического тестирования онкологических больных на генетическую предрасположенность к тромботическим состояниям, ряд полиморфизмов генов системы гемостаза относят к доказанным факторам высокого кумулятивного тромбогенного риска, а белки, кодируемые этими генами, являются непосредственными звеньями в каскадах патологической гиперкоагуляции при неопластических процессах.

Цель исследования – выявить среди пациентов со злокачественными опухолями торакоабдоминальной локализации больных с высоким генетическим риском развития тромботических осложнений.

Материалы и методы. Для выявления однонуклеотидных полиморфных вариантов генов протромбина (*FII G20210A*) и проакцелерина (*FV G1691A (Arg506Gln)*) 223 больным раком легкого, желудка и пищевода, прооперированным в 2018–2019 гг. в отделении торакальной онкологии Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, выполнено ДНК-тестирование. В исследуемые группы вошли пациенты, перенесшие инфаркт миокарда ($n = 62$), ишемический инсульт ($n = 24$), а также пациенты с венозными тромбозомболическими осложнениями ($n = 40$) и без сердечно-сосудистой патологии, но с их наличием в семейном анамнезе ($n = 33$). В контрольную группу включен 81 пациент.

Результаты. Определена статистически значимая разница в частоте носительства гетерозиготного генотипа *FV 1691GA (Arg506Gln)* у пациентов со злокачественными опухолями торакоабдоминальной локализации, перенесших инфаркт миокарда ($\chi^2 = 4,0$; $p = 0,046$), венозный тромбоз/тромбозомболию легочной артерии ($\chi^2 = 4,118$; $p = 0,043$), и у больных с отягощенным семейным анамнезом ($\chi^2 = 4,997$; $p = 0,026$) по сравнению с контрольной группой. Статистически значимая разница в частоте носительства гетерозиготного варианта мутации в гене *FII G20210A* относительно контрольной группы выявлена у пациентов, перенесших ишемический инсульт ($\chi^2 = 6,881$; $p = 0,009$), а также у пациентов с отягощенным семейным анамнезом ($\chi^2 = 7,563$; $p = 0,006$).

Заключение. Для оценки риска развития и дальнейшей профилактики тромботических осложнений в периоперационном периоде больным злокачественными опухолями торакоабдоминальной локализации, перенесшим инфаркт миокарда, ишемический инсульт, венозные тромбозомболические осложнения, а также пациентам без выраженной сердечно-сосудистой патологии, но с тромботическими состояниями у родственников 1-й степени на догоспитальном этапе целесообразно выполнять ДНК-диагностику для выявления полиморфизмов генов *FII G20210A* и *FV G1691A (Arg506Gln)*.

Ключевые слова: мутация Лейдена, мутация протромбина *G(20210)A*, злокачественные опухоли торакоабдоминальной локализации, инфаркт миокарда, ишемический инсульт, венозный тромбозомболизм

Для цитирования: Королева А.А., Герасимов С.С., Любченко Л.Н. Генетические факторы тромбоза *FII G20210A*, *FV G1691A (Arg506Gln)* у больных со злокачественными опухолями торакоабдоминальной локализации. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):105–12. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-105-112>

Genetic factors of thrombosis *FII G20210A*, *FV G1691A* (*Arg506Gln*) in patients with thoracoabdominal malignant tumors

A.A. Korolyova¹, S.S. Gerasimov¹, L.N. Lyubchenko^{2,3}

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 2nd Botkinskij Proezd, Moscow 3125284, Russia;

³N.A. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology – branch National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of Russia;

Bld. 1, 51 3rd Parkovaya St., Moscow 105425, Russia

Contacts: Anna Anatolyevna Koroleva anna.korolyova@hotmail.com

Introduction. Malignant tumor is one of the leading factors of venous and arterial thrombosis. But there is no data on the need for a genetic testing protocol of cancer patients for genetic predisposition thrombotic conditions, despite the fact that a number of polymorphisms of hemostasis genes are considered to be unconditionally proven factors of high cumulative thrombogenic risk, and proteins encoded by these genes are direct links in the cascades of pathological hypercoagulation in neoplastic processes.

Aim. To identify groups of high genetic risk of thrombotic complications among patients with malignant thoracoabdominal tumors.

Materials and methods. The study included 223 patients with malignant tumors of the lung, stomach, esophagus, operated in the Department of Thoracic Oncology of the N.N. Blokhin National Research Center of Oncology in 2018–2019. The study groups consisted of patients with myocardial infarction ($n = 62$), ischemic stroke ($n = 24$), venous thrombosis/venous thromboembolic complications ($n = 40$), patients without cardiovascular diseases, but with a family history burdened by cardiovascular diseases ($n = 33$). The control group included 81 patients.

Results. Among patients with malignant tumors of thoracoabdominal localization, a statistically significant difference was determined in the frequency of carriage of the heterozygous genotype *FV 1691GA* (*Arg506Gln*) in patients who had a myocardial infarction ($\chi^2 = 4.0$; $p = 0.046$), who had venous thrombosis ($\chi^2 = 4.118$; $p = 0.043$), in the group of patients with burdened with a family history ($\chi^2 = 4.997$; $p = 0.026$) in comparison with the control group. Statistically significant difference in the frequency of carriage of the heterozygous variant of the mutation in the *FII G20210A* gene relative to the control group, it was determined in the group of patients who had an acute cerebrovascular accident ($\chi^2 = 6.881$; $p = 0.009$) and among patients with a burdened history ($\chi^2 = 7.563$; $p = 0.006$).

Conclusion. In order to assess the risk of development and prevention of thrombotic complications in the perioperative period in patients with malignant thoracoabdominal tumors, who have suffered myocardial infarction, ischemic stroke, venous thrombosis/venous thromboembolic complications, as well as patients without cardiovascular pathology, but with thrombotic conditions in relatives of the first degree, it is advisable to perform DNA diagnostics at the prehospital stage to identify of gene polymorphisms *FII G20210A* и *FV G1691A* (*Arg506Gln*).

Keywords: factor V Leiden, prothrombin *G(20210)A* mutation, malignant thoracoabdominal tumors, myocardial infarction, ischemic stroke, venous thromboembolism

For citation: Korolyova A.A., Gerasimov S.S., Lyubchenko L.N. Genetic factors of thrombosis *FII G20210A*, *FV G1691A* (*Arg506Gln*) in patients with thoracoabdominal malignant tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(1):105–12. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-105-112>

ВВЕДЕНИЕ

Вопрос профилактики тромботических состояний в онкологии остается в настоящее время открытым. Прежде всего, это касается наиболее информативных детерминант, позволяющих своевременно оценить риск развития таких осложнений, как тромбогенность крови, которая требует коррекции, и состояния тромботической готовности [1].

Вместе с тем существует доказанная ассоциация таких полиморфизмов генов системы гемостаза, как мутации Лейдена *FV G1691A* (*Arg506Gln*), протромбина *FII G20210A*, дефициты протеинов С и S, антитромбина (АТ) III с тромботическими состояниями. Данные мутации объединены термином «классическая наследственная тромбофилия»; они существенно увеличивают риск развития дебюта венозных тромбоэмболических осложнений (ВТЭО), а также артериальных тромбозов.

Однако наличие в генотипе даже комбинации прокоагулянтных полиморфизмов не всегда проявляется в виде тромбоза. Пенетрантность фенотипа тромботических состояний зависит от кумулятивного эффекта наследственных и экзогенных факторов [2–9].

Онкологический процесс (так называемый активный рак) также рассматривается как приобретенная тромбофилия. У пациентов со злокачественными новообразованиями в зависимости от биологии опухоли вероятность развития ВТЭО может превышать общепопуляционные риски в 4–60 раз. По данным литературы, у 70–90 % онкологических больных уже на догоспитальном этапе наблюдаются признаки гиперкоагуляции и хронического внутрисосудистого свертывания крови. Индуцированная опухолевыми клетками гиперкоагуляция является ведущим фактором тромбообразования у таких пациентов.

К факторам риска развития тромботических состояний у онкологических больных относят стадию и длительность заболевания, хирургическое лечение, лучевую и химиотерапию, катетер-ассоциированные вмешательства, локализацию и гистологический тип опухоли, повышенный уровень С-реактивного белка, Р-селектина, тканевого фактора, D-димера, фибриногена, фибрин-мономера и др. Пациент-ассоциированными рисками также признаны такие сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) в анамнезе, как инфаркт миокарда (ИМ), инсульт и ВТЭО [10–14].

Цель исследования — выявление среди оперированных больных раком желудка, легкого и пищевода пациентов с высоким генетически обусловленным тромбогенным потенциалом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

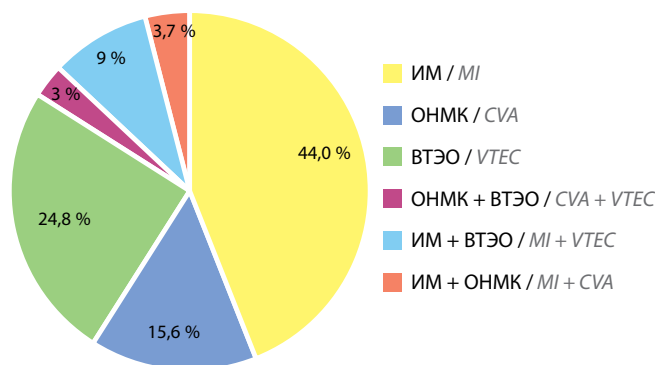
В ходе нерандомизированного ретроспективного контролируемого клинического исследования проанализированы данные 223 больных злокачественными опухолями легкого, желудка, пищевода, прооперированных в 2018–2019 гг. в отделении торакальной онкологии Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина.

В основную группу включены 109 пациентов с сердечно-сосудистой патологией в анамнезе и/или в периоперационном периоде. Отдельно мы анализировали группу больных без ССЗ ($n = 33$), у родственников 1-й степени которых отмечались острые нарушения мозгового кровообращения (ОНМК), ИМ и ВТЭО. В группу контроля вошли пациенты без ССЗ, в том числе в семейном анамнезе ($n = 81$). Группы сопоставимы по локализации первичной опухоли, ее морфологии, стадии заболевания, полу, возрасту и методам проведенного лечения.

Большинство пациентов (51,1 %) относились к возрастной группе 60–69 лет. Больные раком легкого составили 42,2 %, желудка — 40,4 %, пищевода — 17,4 %. Среди исследуемых мужчин было 80 % (178/223), женщин — 20 % (45/223).

Основная группа пациентов дифференцирована на 3 подгруппы: перенесшие ИМ ($n = 62$), ОНМК ($n = 24$) и ВТЭО ($n = 40$). У 2 больных с венозным тромбозом, диагностированным в раннем послеоперационном периоде, в анамнезе отмечено ОНМК, у 10 пациентов с тромбозом — ИМ. У 1 пациента с тромбозом легочной артерии, возникшей на 9-е сутки после дистальной субтотальной резекции желудка, также в анамнезе зафиксирован ишемический инсульт. У 4 больных в анамнезе отмечены и ОНМК, и ИМ. При включении этих пациентов ($n = 17$) в подгруппы были учтены все манифестации сердечно-сосудистой патологии (см. рисунок).

Средний возраст пациентов с ИМ составил 67,7 года. Инфаркт миокарда зафиксирован в анамнезе у 60 (96,8 %) больных (у 9 из них он носил рецидивирующий характер). У 2 (3,2 %) пациентов ИМ возник



Распределение пациентов основной группы по наличию венозных тромбозных осложнений (ВТЭО), инфаркта миокарда (ИМ), острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) в периоперационном периоде и/или в анамнезе

Distribution of patients of the main group by the presence of venous thromboembolic complications (VTEC), myocardial infarction (MI), acute cerebrovascular accident (CVA)

в раннем послеоперационном периоде, 1 из них скончался. Средний возраст больных с ишемическим инсультом составил 68 лет. В послеоперационном периоде ОНМК диагностировано в 1 (4,2%) случае; больной скончался. Острое нарушение мозгового кровообращения в анамнезе отмечено у 23 (95,8 %) пациентов.

Подгруппу ВТЭО составили 40 больных. Все случаи диагностированы в послеоперационном периоде. У 70 % (28/40) пациентов наблюдался тромбоз глубоких и/или поверхностных вен нижних конечностей, кубитальных и подключичных вен на фоне использования венозного катетера, у 12,5 % (5/40) — изолированная тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА), у 17,5 % (7/40) — ТЭЛА на фоне тромбоза глубоких вен нижних конечностей. Средний возраст больных данной подгруппы составил 65 лет. Летальный исход зафиксирован у 8 пациентов с ТЭЛА.

В целом у пациентов, перенесших в послеоперационном периоде ИМ, ТЭЛА и ишемический инсульт, летальность составила 66,7 %.

Средний возраст пациентов без ССЗ, но с отягощенным по ОНМК, ИМ и ВТЭО семейным анамнезом составил 64 года. Инфаркт миокарда в анамнезе исследуемых пробандов отмечен в 66,7 % случаев (22/33), ОНМК — в 21,2 % (7/33), ВТЭО — в 9,1 % (3/33), ИМ + ОНМК — в 3 % (1/33).

В контрольную группу вошел 81 пациент: 35 (43,2%) с диагнозом «рак желудка», 34 (42 %) — с диагнозом «рак легкого», 12 (14,8 %) — с диагнозом «рак пищевода». Средний возраст больных этой группы составил 67,5 года.

Для получения ДНК из лимфоцитов периферической венозной крови использовались реагенты «Проба-Репид-Генетика» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), для определения однонуклеотидных полиморфизмов генов *FII G20210A* и *FV G1691A(Arg506Gln)* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени — комплект реагентов «КардиоГене-

тика Тромбофилия» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Статистическая значимость различий полученных результатов в группах оценена по критерию χ^2 (Пирсона). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В группе пациентов, перенесших ИМ, фактор V Лейдена *FVL(1961)GA* выявлен в 4,8 % (3/62) наблюдений. Все случаи ИМ отмечены в анамнезе. У 1 пациента инфаркт носил рецидивирующий характер. В группе контроля мутация Лейдена *FVL(1961)GA* не выявлена ни в одном случае ($\chi^2 = 4,0$; $p = 0,046$), о чем указывалось ранее [15, 16].

Минорный аллель А гена *FV* в группе больных, перенесших ВТЭО, определен в 5 % (2/40) случаев; различия при сравнении с контрольной группой также статистически достоверны ($\chi^2 = 4,118$; $p = 0,043$). Один пациент — носитель мутации — скончался в послеоперационном периоде в результате ТЭЛА на фоне рака желудка; в анамнезе больного выявлено ОНМК по ишемическому типу. Другой пациент перенес тромбоз катетеризированной кубитальной вены; в анамнезе отмечен ИМ [17].

В ходе нашего исследования мутация Лейдена *FVL(1961)GA* в группе пациентов с ОНМК выявлена в 4,2 % (1/24) случаев; различия в отношении группы контроля не были статистически значимыми ($\chi^2 = 3,407$; $p = 0,065$) [16, 18].

Полиморфный маркер *G20210A* гена *FII*, кодирующего ключевой белок каскада коагуляции, отмечен у 3,2 % (2/62) пациентов, перенесших ИМ. Все случаи ИМ зафиксированы в анамнезе; в 1 из них наблюдался тромбоз стентированной коронарной артерии. В контрольной группе данный полиморфизм не выявлен. Разница в частоте носительства мутации в исследуемой и контрольной группах статистически незначима ($\chi^2 = 2,65$; $p = 0,104$) [15, 16].

Среди пациентов, перенесших инсульт, 8,3 % были носителями полиморфизма G/A гена *F2* ($\chi^2 = 6,881$; $p = 0,009$). Один из них в возрасте 42 лет перенес лакунарный инфаркт головного мозга [16, 18]. Мутация гена *FII* протромбина отмечена также у 1 (2,5 %) пациен-

та с массивной ТЭЛА и тромбозом глубоких вен обеих нижних конечностей на фоне рака легкого ($\chi^2 = 2,042$; $p = 0,154$) [17].

Интересные результаты получены у пациентов с ССЗ в семейном анамнезе: полиморфизм G/A гена *F2* встречался чаще, чем у больных, перенесших ССЗ, и отмечен в 9,1 % (3/33) случаев ($\chi^2 = 7,563$; $p = 0,006$). Частота носительства мутации фактора V Лейдена у данной категории пациентов составила 6,1 % (2/33), что также выше, чем у пациентов с ИМ, ОНМК и ВТЭО, и значимо выше, чем в группе контроля ($\chi^2 = 4,997$; $p = 0,026$).

Гомозиготный вариант мутаций анализируемых генов, так же как и комбинированное носительство полиморфизмов, выявлен не был. Результаты исследования представлены в таблице.

ОБСУЖДЕНИЕ

Гликопротеин фактор V (проакцелерин) является кофактором при образовании тромбина из протромбина. Неактивный фактор V может проявлять как прокоагулянтный, так и антикоагулянтный эффект. В свою очередь, тромбин является активатором формы фактора V, обладающей прокоагулянтной активностью [19].

Для мутации Лейдена характерны приобретение коагуляционным фактором V устойчивой к инактивирующему действию белка С формы и встраивание в протромбиназный комплекс. Вместе с тем инактивированная форма фактора V необходима для инактивации VIII фактора комплексом протеинов С и S, а также для блокировки активированным протеином С образования активированного фактора X, являющегося составной частью протромбиназного комплекса (фактор V + фактор X + кальций + тромбоциты). Кроме того, мутация Лейдена ассоциирована с фибринолитическими свойствами фактора V, следствием чего является ингибирование процессов фибринолиза. Данная aberrация носит аутосомно-доминантный тип наследования. Среди европейцев она является наиболее часто встречающейся доказанной врожденной коагулопатией. Ее распространенность составляет в среднем 5–8 %, достигая 15 % в Греции и Швеции и 20–40 % у пациентов, перенесших ВТЭО. Гомозигот-

Частота носительства генотипов *FII 20210GA* и *FV 1691GA* у пациентов со злокачественными опухолями торакоабдоминальной локализации в исследуемых и контрольной группах, n (%)

Frequency of carrying genotypes *FII 20210GA* and *FV 1691GA* in patients with thoracoabdominal tumors in the study and control groups, n (%)

Генотип Genotype	Инфаркт миокарда Myocardial infarction	Ишемический инсульт Ischemic stroke	Венозные тромбозэмболические осложнения Venous thromboembolic complications	Сердечно-сосудистые заболевания в семейном анамнезе Cardiovascular diseases in the family history	Контрольная группа Control group
<i>FII 20210GA</i>	2 (3,2); $p = 0,104$	2 (8,3); $p = 0,009$	1 (2,5); $p = 0,154$	3 (9,1); $p = 0,006$	—
<i>FV 1691GA</i>	3 (4,8); $p = 0,046$	1 (4,2); $p = 0,065$	2 (5); $p = 0,043$	2 (6,1); $p = 0,026$	—

ный вариант мутации Лейдена встречается с частотой 1 : 1000. В общей популяции риск развития венозного тромбоза при носительстве гетерозиготного варианта мутации возрастает в 7 раз, при гомозиготном варианте — в 80–100 раз. В исследовании I. Pabinger и соавт. показано, что частота возникновения ВТЭО у онкологических больных в случае носительства мутации Лейдена составляла 13,9 %, без нее — 7,6 %: через 6 мес — 13 и 5,7 %, через 1 год — 15 и 7,3 % соответственно. Кроме того, ряд исследований показали значимый рост риска развития ишемии миокарда и ишемического инсульта у носителей мутации Лейдена [4–7, 20–32].

В нашем исследовании у больных злокачественными опухолями торакоабдоминальной локализации определены статистически значимые различия в отношении группы контроля в частоте носительства гетерозиготной формы мутации гена *FV (1691)GA* у пациентов, перенесших ИМ ($\chi^2 = 4,0$; $p = 0,046$) и венозный тромбоз/ТЭЛА ($\chi^2 = 4,118$; $p = 0,043$). Частота носительства мутации Лейдена составила 4,8 и 5 % в группах с ИМ и ВТЭО соответственно. Среди пациентов, перенесших ишемический инсульт, 4,2 % были носителями мутации Лейдена. Показательно, что в группе больных без ССЗ, у родственников 1-й степени которых была эта патология, частота носительства гетерозиготного варианта мутации Лейдена составила 6,1 %, что также статистически достоверно отличается от показателей контрольной группы ($\chi^2 = 4,997$; $p = 0,026$). Это доказывает тот факт, что носительство данной мутации необязательно проявит себя фенотипически, для этого нужны сверхпороговые факторы для конкретного пациента.

По данным литературы, в качестве одного из показателей лабораторного фенотипа мутации Лейдена можно рассматривать уровень резистентности к активированному протеину С (АПС-Р). Однако коагулогический метод оценки АПС-Р не исключает ошибочных результатов на фоне острого тромбоза, при приеме антикоагулянтных препаратов, антифосфолипидном синдроме и др. Вместе тем при носительстве мутации Лейдена отмечается повышенная генерация тромбина. Один из глобальных тестов гемостаза — тест генерации тромбина — также предлагается в качестве метода оценки венозного предтромбоза при носительстве мутаций *FII G20210A* и *FV G1691A (Arg506Gln)* [33–37].

Протромбин является витамин-К-зависимым ферментом, который под воздействием активированного фактора свертывания X превращается в тромбин. Распространенность мутации протромбина *F2G(20210)A*, впервые описанной в 1996 г., зависит от этнической принадлежности и составляет 0,7–6,5 %, достигая максимума в Испании. При данной мутации структура молекулы протромбина не изменяется, но в 1,5–2 раза повышаются относительно нормы его плазматический уровень и активность. Полиморфизм носит аутосомно-доминантный тип наследования и определяет 6–20 % тромботических событий. У носителей гетерозиготного

варианта гена *F2(20210)GA* риск развития инсульта в 5 раз превышает общепопуляционные риски. У пациентов, перенесших ишемический инсульт, данная мутация встречается в 1–7,6 % случаев (обратно пропорционально возрасту). Распространенность гомозиготного варианта мутации гена протромбина *F2(20210)AA* составляет 1 случай на 100 тыс. и ассоциирована с тяжелым течением и частыми рецидивами венозного тромбоза. В нашей стране для пациентов с криптогенным ишемическим инсультом предусмотрен скрининг тромбофилических состояний (в том числе мутаций гена протромбина *G20210A* и фактора V Лейдена) [8, 9, 38–46].

Наше исследование показало статистически значимые различия в отношении группы контроля в частоте носительства гетерозиготного варианта мутации гена протромбина *F2(20210)GA* у пациентов, перенесших ишемический инсульт ($\chi^2 = 6,881$; $p = 0,009$). В этой подгруппе каждый 12-й (8,3 %) больной являлся носителем генотипа *F2(20210)GA*. Среди пациентов, перенесших ИМ, частота носительства данной мутации составила 3,2 %, ВТЭО — 2,5 %. В группе больных с тромботическими состояниями у родственников 1-й степени генотип *F2(20210)GA* выявлен в 9,1 % (3/33) случаев ($\chi^2 = 7,563$; $p = 0,006$). Так же как и в случае с мутацией Лейдена, полиморфизм G/A гена протромбина не всегда имеет тромботическое проявление.

По результатам исследования, выполненного под руководством ведущего российского эксперта А.П. Момота, в качестве маркера прогнозирования развития клинического события в виде как венозного, так и артериального тромбоза при генотипе *F2(20210)GA* предлагается использовать показатель активности протромбина. При этом антикоагулянтная профилактика должна обсуждаться при активности протромбина выше 174,8 % [47].

В исследовании мы не акцентировали внимание на особенностях акушерского анамнеза исследуемых пациенток и наличии осложнений вынашивания беременности в семейном анамнезе исследуемых мужчин, однако гестационные осложнения также могут указывать на наличие прокоагулянтных мутаций в генах *FII* и *FV* [48].

Интерес к мутациям Лейдена *FV G1691A (Arg506Gln)* и *FII G20210A* у онкологических пациентов связан с тем, что для таких больных характерны снижение уровня протеина С и АТ, рост активности фактора VIII. Это также наравне с мутацией протромбина *G20210A* (за счет повышенного образования тромбина, приводящего к большому потреблению протеина С) может стать причиной приобретенной формы АПС-Р и обуславливает тромботический риск. Кроме того, опухолевая клетка сама способна образовывать рецептор к фактору V и потенцировать формирование протромбиназного комплекса, активируя тем самым прокоагулянтное звено свертывающей системы [14, 49–56].

Таким образом, у онкологических пациентов — носителей мутаций Лейдена *FV G1691A (Arg506Gln)* или

FII G20210A — можно с большей вероятностью ожидать фенотипическую реализацию кумулятивного эффекта генетического и приобретенных факторов тромбоза.

Современные исследования применения лекарственных средств при наследственных классических тромбофилиях в настоящее время единичны, а их данные нередко противоречивы. Однако признается целесообразность отказа от назначения варфарина данной категории пациентов при значимой АПС-Р вследствие риска развития варфаринового некроза кожи, причиной которого является тромбоз, вызванный снижением концентрации естественных витамин-К-зависимых антикоагулянтов [23, 57–60].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании на выборке онкологических пациентов отмечена ассоциация тромбоза как венозных, так и артериальных сосудов с наследственными

формами тромбофилии. С учетом склонности к гиперкоагуляции при наличии злокачественной опухоли мы считаем необходимым обратить внимание на роль прокоагулянтных мутаций генов системы гемостаза в развитии тромботических осложнений у данной категории больных. Также важно рассмотреть вопрос оценки риска развития и дальнейшей профилактики сердечно-сосудистых осложнений, в частности в периоперационном периоде, у пациентов со злокачественными новообразованиями торакоабдоминальной локализации, перенесших ИМ, ишемический инсульт, ВТЭО, а также у пациентов без сопутствующих ССЗ, но с их наличием у родственников 1-й степени с использованием ДНК-диагностики на догоспитальном этапе. В целом необходимо более глубокое изучение индивидуальных факторов риска развития тромботических состояний у онкологических больных с оценкой преобладающих механизмов тромбообразования и целенаправленным воздействием на них.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Суворин П.А., Хороненко В.Э., Жарков П.А., Баскаков Д.С. Профилактика венозных тромбоэмболий у онкологических больных. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена* 2017;6(1):71–5. DOI: 10.17116/onkolog20176171-75
2. Momot A.P., Khoronenko V.E., Zharkov P.A., Baskakov D.S. Prevention of venous thromboembolism in cancer patients. *Onkologiya. Zhurnal im. P.A. Gercena = Oncology. P.A. Herzen Journal* 2017;6(1):71–5. (In Russ.). DOI: 10.17116/onkolog20176171-75
3. Момот А.П. Проблема тромбофилии в клинической практике. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2015;2(1):36–48. DOI: 10.17650/2311-1267-2015-1-36-48
4. Momot A.P. The problem of thrombophilia in clinical practice. *Rossiiskij zhurnal detskoj gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2015;2(1):36–48. (In Russ.). DOI: 10.17650/2311-1267-2015-1-36-48
5. Venous thromboembolic diseases: diagnosis, management and thrombo-philia testing. London: National Institute for Health and Care Excellence (UK); 2020 Mar 26. Available at: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng158>.
6. Ye Z., Liu E.H.C., Higgins J.P.T. et al. Seven hemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet* 2006;367(9511):651–8. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68263-9
7. Kathiresan S., Voight B.F., Purcell S. et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet* 2009;41(3):334–41. DOI: 10.1038/ng.327
8. Mannucci P.M., Asselta R., Duga S. et al. The association of factor V Leiden with myocardial infarction is replicated in 1880 patients with premature disease. *J Thromb Haem* 2010;8(10):2116–21. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.03982.x
9. Zdravkovic S., Wienke A., Pedersen N.L. et al. Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. *J Intern Med* 2002;252(3):247–54. DOI: 10.1046/j.1365-2796.2002.01029.x
10. De Stefano V., Chiusolo P., Paciaroni K. et al. Prothrombin G20210A mutant genotype is a risk factor for cerebrovascular ischemic disease in young patients. *Blood* 1998;91(10):3562–5.
11. Rallidis L.S., Gialeraki A., Tsirebolos G. et al. Prothrombotic genetic risk factors in patients with very early ST-segment elevation myocardial infarction. *J Thromb Thrombolysis* 2017;44(2):267–73. DOI: 10.1007/s11239-017-1520-2
12. Heit J.A. Thrombophilia: clinical and laboratory assessment and management. In: *Consultative hemostasis and thrombosis*. Ed. by C.S. Kitchens, C.M. Kessler, B.A. Konkle. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2013. Pp. 205–39.
13. Wun T., White R.H. Epidemiology of cancer-related venous thromboembolism. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009;22(1):9–23. DOI: 10.1016/j.beha.2008.12.001
14. Shaib W., Deng Y., Zilberman D. et al. Assessing risk and mortality of venous thromboembolism in pancreatic cancer patients. *Anticancer Res* 2010;30(10):4261–4.
15. Сомонова О.В. Лечение рак-ассоциированного тромбоза: от рекомендаций к реальной клинической практике. *Клиническая онкология* 2019;21(1):60–5. DOI: 10.26442/18151434.2019.1.190247
16. Simonova O.V. Treatment of cancer-associated thrombosis: from recommendations to real clinical practice. *Klinicheskaya onkologiya = Clinical Oncology* 2019;21(1):60–5. (In Russ.). DOI: 10.26442/18151434.2019.1.190247
17. Сомонова О.В., Антух Э.А., Варданян А.В. и др. Практические рекомендации по профилактике и лечению тромбоэмболических осложнений у онкологических больных. *Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO #3s2* 2022(12):159–70. DOI: 10.18027/2224-5057-2022-12-3s2-159-170
18. Somonova O.V., Antukh E.A., Vardanyan A.V. et al. Practical recommendations for the prevention and treatment of thromboembolic complications in cancer patients. *Zlokachestvenny'e opuxoli: Prakticheskie rekomendacii RUSSCO = Malignant tumors: Practical Recommendations of RUSSCO #3s2* 2022(12):159–70. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2022-12-3s2-159-170
19. Королева А.А., Герасимов С.С., Кононец П.В., Любченко Л.Н. Роль полиморфизмов генов свертывающей системы крови в развитии инфаркта миокарда у пациентов со злокачественными опухолями торакоабдоминальной локализации. *Современная онкология* 2020;22(4):66–70.
20. Korolyova A.A., Gerasimov S.S., Kononets P.V., Lyubchenko L.N. The role of polymorphisms of blood coagulation genes in the development of myocardial infarction in patients with malignant tumors of thoracoabdominal localization. *Sovremennaya onkologiya = Modern Oncology* 2020;22(4):66–70. (In Russ.).

16. Королева А.А., Герасимов С.С., Любченко Л.Н. Молекулярно-генетические детерминанты артериального тромбоза у больных злокачественными опухолями торакоабдоминальной локализации. MD-ONCO 2022;2(4):46–55. DOI: 10.17650/2782-3202-2022-2-4-46-55. Korolyova A.A., Gerasimov S.S., Lyubchenko L.N. Molecular genetic determinants of arterial thrombosis in patients with malignant tumors of thoracoabdominal localization. MD-ONCO 2022;2(4):46–55. (In Russ.). DOI: 10.17650/2782-3202-2022-2-4-46-55
17. Королева А.А., Герасимов С.С., Кононец П.В., Любченко Л.Н. Оценка роли полиморфизмов генов системы гемостаза в развитии венозного тромбоза и тромбоземболии легочной артерии в периоперационном периоде у пациентов со злокачественными опухолями торакоабдоминальной локализации. Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал им. академика Б.В. Петровского 2021;9(1):55–62. DOI: <https://doi.org/10.33029/2308-1198-2021-9-1-55-62> Korolyova A.A., Gerasimov S.S., Kononets P.V., Lyubchenko L.N. Evaluation of the role of polymorphisms of hemostasis genes in the development of venous thrombosis and pulmonary embolism in the perioperative period in patients with malignant tumors of thoracoabdominal localization. Klinicheskaya i eksperimental'naya hirurgiya. Zhurnal imeni akademika B.V. Petrovskogo = Clinical and Experimental Surgery. Petrovsky Journal 2021;9(1):55–62. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.33029/2308-1198-2021-9-1-55-62>
18. Королева А.А., Герасимов С.С., Любченко Л.Н. Молекулярно-генетические факторы риска развития ишемического инсульта у больных злокачественными опухолями торакоабдоминальной локализации. Сибирский онкологический журнал 2023;22(1):66–73. Korolyova A.A., Gerasimov S.S., Lyubchenko L.N. Molecular genetic risk factors for ischemic stroke in patients with malignant tumors of thoracoabdominal localization. Sibirskij onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology 2023;22(1):66–73. (In Russ.).
19. Макацария А.Д., Бицадзе О.В. Тромбофилии и противотромботическая терапия в акушерской практике. М., 2003. Makaczariya A.D., Bic zadze O.V. Thrombophilia and antithrombotic therapy in obstetric practice. Moscow, 2003. (In Russ.).
20. Zoller B., Dahlback B., Garcia D.F. Thrombophilia as a multigenic disease. Haematologica 1999;84(1):59–70.
21. Rey E., Garnean P., David M. et al. Dalteparin for the prevention of recurrence of placenta-mediated complications of pregnancy in women without thrombophilia: a pilot randomized controlled trial. J Thromb Haemost 2009;7(1):58–64. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.03230.x
22. Caprini J.A., Glase C.J., Anderson C.B., Hathaway K. Laboratory markers in the diagnosis of venous thromboembolism. Circulation 2004;109(12):14–8. DOI: 10.1161/01.CIR.0000122869.59485.36
23. Aznar J., Mira Y., Vaya A. et al. Factor V Leiden and prothrombin *G20210A* mutations in young adults with cryptogenic ischemic stroke. Thromb Haemost 2004;91(5):1031–4. DOI: 10.1160/TH03-11-0690
24. Casas J.P., Hingorani A.D., Bautista L.E., Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18000 cases and 58000 controls. Arch Neurol 2004;61(11):1652–61. DOI: 10.1001/archneur.61.11.1652
25. Khan S., Dickerman J.D. Hereditary thrombophilia. Thromb J 2006;4:15. DOI: 10.1186/1477-9560-4-15
26. Mosnier L.O., Zlokovic B.V., Griffin J.H. The cytoprotective protein C pathway. Blood 2007;109(8):3161–72. DOI: 10.1182/blood-2006-09-003004
27. Pabinger I., Ay C., Dunkler D. et al. Factor V Leiden mutation increases the risk for venous thromboembolism in cancer patients – results from the Vienna Cancer And Thrombosis Study (CATS). J Thromb Haemost 2015;13(1):17–22.
28. Catto A., Carter A., Ireland H. et al. Factor V Leiden gene mutation and thrombin generation in relation to the development of acute stroke. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;15(6):783–5. DOI: 10.1161/01.atv.15.6.783
29. Aznar J., Mira Y., Vaya A. et al. Factor V Leiden and prothrombin *G20210A* mutations in young adults with cryptogenic ischemic stroke. Thromb Haemost 2004;91(5):1031–4. DOI: 10.1160/TH03-11-0690
30. Lalouschek W., Aull S., Series W. et al. The prothrombin *G20210A* mutation and factor V Leiden mutation in patients with cerebrovascular disease. Blood 1998;92(2):704–5.
31. Nowak-Gottl U., Strater R., Heinecke A. et al. Lipoprotein (a) and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin, and methylenetetrahydrofolate reductase are risk factors of spontaneous ischemic stroke in childhood. Blood 1999;94(11):3678–82.
32. Casas J.P., Hingorani A.D., Bautista L.E., Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18 000 cases and 58 000 controls. Arch Neurol 2004;61(11):1652–61. DOI: 10.1001/archneur.61.11.1652
33. Момот А.П., Николаева М.Г., Елыкомов В.А. и др. Значение величины резистентности фактора Va к активированному протеину С при мутации *FVL(1691)GA* для развития тромбозов. Медицинский алфавит 2018;1(5):21–4. Momot A.P., Nikolaeva M.G., Elykomov V.A. et al. The value of the resistance of factor Va to activated protein C in the mutation of *FVL(1691)GA* for the development of thrombosis. Medicinskij alfavit = Medical Alphabet 2018;1(5):21–4. (In Russ.).
34. Зотова И.В., Затеищikov Д.А. Наследственная тромбофилия и венозные тромбоземболические осложнения: правила тестирования в клинической практике. Российский кардиологический журнал 2020;25(S3):55–61. DOI: 10.15829/1560-4071-2020 Zotova I.V., Zatejshnikov D.A. Hereditary thrombophilia and venous thromboembolic complications: rules of testing in clinical practice. Russian Rossijskij kardiologicheskij zhurnal = Journal of Cardiology 2020;25(S3):55–61. (In Russ.). DOI: 10.15829/1560-4071-2020
35. Segers O., Simioni P., Tormene D., Castoldi E. Influence of single nucleotide polymorphisms on thrombin generation in factor V Leiden heterozygotes. Thromb Haemost 2014;111(3):438–46. DOI: 10.1160/TH13-05-0360
36. Kojima T., Takagi A., Murata M., Takagi Y. Antithrombin resistance: a new mechanism of inherited thrombophilia. Rinsho Ketsueki 2015;56(6):632–8. DOI: 10.11406/rinketsu.56.632
37. Dargaud Y., Treciak M., Bordet J. Use of calibr binography +/– thrombomodulin to recognize the prothrombotic phenotype. Thromb Haemost 2006;96(5):562–7.
38. Poort S.R., Rosendaal F.R., Reitsma P.H., Bertina R.M. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood 1996;88(10):3698–703.
39. Leroyer C., Mercier B., Oger E. et al. Prevalence of 20210 A allele of the prothrombin gene in venous thromboembolism patients. Thromb Haemost 1998;80(1):49–51.
40. Emmerich J., Rosendaal F.R., Cattaneo M. et al. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism – pooled analysis of 8 casecontrol studies including 2310 cases and 3204 controls. Study group for pooled analysis in venous thromboembolism. Thromb Haemost 2001;86(3):809–16.
41. Gehring N.H., Frede U., Neu-Yilik G. et al. Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. Nat Genet 2001;28(4):389–92. DOI: 10.1038/ng578
42. Bosler D., Mattson J., Crisan D. Phenotypic heterogeneity in patients with homozygous prothrombin 20210AA genotype. J Mol Diagn 2006;8(4):420–5. DOI: 10.2353/jmol.2006.060014
43. Korchagin V.I., Mironov K.O., Dribnokhodova O.P. et al. The role of genetic factors in the development of individual predisposition to ischemic stroke. Human Physiology 2017;43(8):886–97. DOI: 10.1134/S0362119717080047
44. Klein L., Bhardwaj V., Gebara B. Cerebral venous sinus thrombosis in a neonate with homozygous prothrombin *G20210A* genotype. J Perinatol 2004;24(12):797–9. DOI: 10.1038/sj.jp.7211187

45. Alatri A., Franchi F., Moia M. Homozygous G20210A prothrombin gene mutation without thromboembolic events: a case report. *Thromb Haemost* 1998;80(6):1028–9.
46. Клинические рекомендации. Ишемический инсульт и транзиторная ишемическая атака у взрослых. 2022. Доступно по: <https://neurology.ru/o-centre/news/klinicheskie-rekomendacii-ishemicheskij-insult-i-tranzitornaya-ishemicheskaya-ataka-u-vzroslyh.html>. Clinical recommendations. Ischemic stroke and transient ischemic attack in adults. 2022. (In Russ.). Available at: <https://neurology.ru/o-centre/news/klinicheskie-rekomendacii-ishemicheskij-insult-i-tranzitornaya-ishemicheskaya-ataka-u-vzroslyh.html>.
47. Николаева М.Г., Ясафова Н.Н., Момот А.П. и др. Фенотипические проявления мутации протромбина, генотип *F2(20210)G4*, у женщин репродуктивного возраста. *Флебология* 2019;13(4):285–92. DOI: 10.17116/lebo201913041285
Nikolaeva M.G., Asafova N.N., Momot A.P. et al. Phenotypic manifestations of prothrombin mutation, genotype *F2(20210)G4*, in women of reproductive age. *Flebologiya = Phlebology* 2019;13(4):285–92. (In Russ.). DOI: 10.17116/lebo201913041285
48. Момот А.П., Николаева М.Г. Генетические тромбофилии и гестационные осложнения. *Вестник гематологии* 2020;16(4):4–15. Momot A.P., Nikolaeva M.G. Genetic thrombophilia and gestational complications. *Vestnik gematologii = Bulletin of Hematology* 2020;16(4):4–15. (In Russ.).
49. Tafur A.J., Dale G., Cherry M. et al. Prospective evaluation of protein C and factor VIII in prediction of cancer-associated thrombosis. *Thromb Res* 2015;136(6):1120–5. DOI: 10.1016/j.thromres.2015.10.004
50. Vormittag R., Simanek R., Ay C. et al. High factor VIII levels independently predict venous thromboembolism in cancer patients: the cancer and thrombosis study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(12):2176–81. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.190827
51. Koster T., Rosendaal F.R., de Ronde H. et al. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993;342(8886–7):1503–6. DOI: 10.1016/s0140-6736(05)80081-9
52. Козинец Г.И., Макарова В.А. Исследование системы крови в клинической практике. М.: Триада-Х, 1997. Kozinets G.I., Makarova V.A. Investigation of the blood system in clinical practice. Moscow: Triada-X, 1997. (In Russ.).
53. Rosendaal F.R., Reitsma P.H. Genetics of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2009;7(1):301–4. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03394.x
54. Пизова Н.В., Степанова М.В. Тромбофилии, связанные с резистентностью к активированному протеину С: генетические полиморфизмы и инсульт. *Неврологический журнал* 2012;6:4–11. Pisova N.V., Stepanova M.V. Thrombophilia associated with resistance to activated protein C: genetic polymorphisms and stroke. *Nevrologicheskij zhurnal = Neurological Journal* 2012;6:4–11. (In Russ.).
55. Nicolaes G.A.F., Dahlback B. Activated protein C resistance (FV Leiden) and thrombosis: factor V mutations causing hypercoagulable states. *Hematol Oncol Clin N Am* 2003;17(1):37–61. DOI: 10.1016/s0889-8588(02)00097-7
56. Loreto M.F., Martinis D.E., Corsi M.P. Coagulation and cancer: implications for diagnosis and management. *Pathol Oncol Res* 2000;6(4):302–12. DOI: 10.1007/BF03187336
57. Cook R.M., Rondina M.T., Horton D.J. Rivaroxaban for the long-term treatment of spontaneous ovarian vein thrombosis caused by factor V Leiden homozygosity. *Ann Pharmacother* 2014;48(8):1055–60. DOI: 10.1177/1060028014533304
58. Jehangir W., Enakua S., Udezi V. et al. Treatment for factor V Leiden, stuck between a rock and a hard place: a case report and review of literature. *J Hematol* 2014;3(2):43–5. DOI: 10.14740/jh149w
59. Hermans C., Eeckhoudt S., Lambert C. Dabigatran etexilate (Pradaxa®) for preventing warfarin-induced skin necrosis in a patient with severe protein C deficiency. *Thromb Haemost* 2012;107(6):1189–91. DOI: 10.1160/TH11-11-0788
60. Бородина Е.Н., Бачурина М.А. Случай наследственной тромбофилии и варфаринового некроза кожи. *Пермский медицинский журнал* 2014;31(6):115–21. Borodina E.N., Bachurina M.A. A case of hereditary thrombophilia and warfarin necrosis of the skin. *Permskij medicinskij zhurnal = Perm Medical Journal* 2014;31(6):115–21. (In Russ.).

Вклад авторов

А.А. Королева: выполнение молекулярно-генетического исследования, анализ и статистическая обработка полученных данных, написание текста статьи;

С.С. Герасимов, Л.Н. Любченко: разработка концепции исследования, анализ данных, научное редактирование.

Author's contributions

A.A. Korolyova: performing molecular genetic research, analysis and statistical processing of the obtained data, writing the text of the article;

S.S. Gerasimov, L.N. Lyubchenko: development of the research concept, data analysis, scientific editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.А. Королева / A.A. Korolyova: <https://orcid.org/0000-0001-8501-7917>

С.С. Герасимов / S.S. Gerasimov: <https://orcid.org/0000-0002-0833-6452>

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was conducted without sponsorship.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

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 Ministry of Health of Russia.

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

Статья поступила: 26.03.2023. **Принята к публикации:** 23.10.2023.

Article submitted: 26.03.2023. **Accepted for publication:** 23.10.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-113-123>

Analysis of miRNAs miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p, -135b-5p, -451a, -495-3p and -136-5p in parental ovarian cancer cells and secreted extracellular vesicles

G.O. Skryabin¹, A.A. Beliaeva^{1,2}, A.D. Enikeev¹, D.V. Bagrov², A.M. Keremet², A.V. Komelkov¹, D.S. Elkin¹, D.M. Sylyantseva³, E.M. Tchekina¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia;

²M.V. Lomonosov Moscow State University; 1–12 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia;

³Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

Contacts: Elena Maximovna Tchekina tchekina@mail.ru

Introduction. The identification of markers for liquid diagnostics of ovarian cancer is one of the most urgent tasks of gynecologic oncology. Currently, extracellular vesicles (EVs) are of great interest as a source of oncomarkers, including miRNA markers. We have previously shown that the levels of miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p and 135b-5p are significantly elevated and miR-451a, -495-3p and -136-5p are significantly decreased in the EVs from uterine aspirates of ovarian cancer patients.

Aim. Analysis of miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p, 135b-5p, 451a, 495-3p and -136-5p levels in ovarian cancer cell cultures and secreted EVs.

Material and methods. Cultivation of ovarian cancer cell lines: OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-8 and SKOV3; EVs isolation from conditioned medium by ultracentrifugation; EVs validation by nanoparticle tracking analysis (NTA), transmission electron microscopy (TEM), western blot analysis of exosomal markers; isolation of miRNAs from cells and EVs; analysis of miRNAs by Stem-Loop – reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction.

Results. In all cell lines studied, the expression of miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p and -135b-5p significantly exceeds the expression of -451a, -495-3p and -136-5p. All ovarian cancer cell lines are featured by a “cells >EVs” ratio for highly expressed miRNAs and “EVs >cells” ratio for poorly expressed miRNAs.

Conclusion. The results of the study support the relation between the differential expression of studied miRNAs and the pathogenesis of ovarian cancer and confirm the high diagnostic potential of these molecules.

Keywords: ovarian cancer, extracellular vesicles, exosomes, miRNA, miR-125a-5p, miR-27a-5p, miR-193a-5p, miR-135b-5p, miR-451a, miR-495-3p, miR-136-5p

For citation: Skryabin G.O., Beliaeva A.A., Enikeev A.D. et al. Analysis of miRNAs miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p, -135b-5p, -451a, -495-3p and -136-5p in parental ovarian cancer cells and secreted extracellular vesicles. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(1):113–23. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-113-123>

Анализ микроРНК miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p, -135b-5p, -451a, -495-3p и -136-5p в клетках рака яичника и секретируемых ими экстраклеточных везикулах

Г.О. Скрыбин¹, А.А. Беляева^{1,2}, А.Д. Еникеев¹, Д.В. Багров², А.М. Керемет², А.В. Комельков¹, Д.С. Елкин¹, Д.М. Силантьева³, Е.М. Чевкина¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12;

³ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Елена Максимовна Чевкина tchevkina@mail.ru

Введение. Поиск маркеров для жидкостной диагностики рака яичника (РЯ) является одной из наиболее актуальных задач онкогинекологии. В настоящее время большой интерес в качестве источника онкомаркеров, в том числе микроРНК, вызывают экстраклеточные везикулы (ЭКВ). Ранее мы показали, что уровень miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p и -135b-5p достоверно повышен, а miR-451a, -495-3p и -136-5p значимо снижен в ЭКВ маточных аспиратов больных РЯ.

Цель исследования – анализ уровней miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p, -135b-5p, -451a, -495-3p и -136-5p в клеточных линиях РЯ и секретируемых ими ЭКВ.

Материалы и методы. Проведены культивирование клеточных линий РЯ (OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-8 и SKOV3), выделение ЭКВ из кондиционированной среды методом ультрацентрифугирования, валидация ЭКВ с помощью анализа траекторий наночастиц (NTA), трансмиссионной электронной микроскопии и вестерн-блот-анализа экзосомальных маркеров. Также выполнены выделение микроРНК из клеток и ЭКВ, анализ микроРНК методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени в модификации Stem-loop.

Результаты. В клетках исследуемых линий РЯ экспрессия молекул miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p и -135b-5p значительно превышала экспрессию miR-451a, -495-3p и -136-5p. Все линии клеток РЯ характеризуются соотношением «клетки >ЭКВ» для высоко экспрессируемых микроРНК и «ЭКВ >клетки» для низко экспрессируемых микроРНК.

Заключение. Результаты исследования свидетельствуют о связи дифференциальной экспрессии исследуемых микроРНК с патогенезом РЯ и подтверждают высокий диагностический потенциал данных молекул.

Ключевые слова: рак яичника, экстраклеточные везикулы, экзосомы, микроРНК, miR-125a-5p, miR-27a-5p, miR-193a-5p, miR-135b-5p, miR-451a, miR-495-3p, miR-136-5p

Для цитирования: Скрыбин Г.О., Беляева А.А., Еникеев А.Д. и др. Анализ микроРНК miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p, -135b-5p, -451a, -495-3p и -136-5p в клетках рака яичника и секретируемых ими экстраклеточных везикулах. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):113–23. (На англ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-113-123>

INTRODUCTION

Extracellular vesicles (EVs) are a heterogeneous class of secreted particles enclosed by a bilipid membrane and containing various bioactive molecules. They play a vital role in intercellular communication by transporting regulatory molecules over both short and long distances. Numerous data support the involvement of EVs in the malignant transformation of cells and the pathogenesis of tumors [1, 2]. Small EVs (30–150 nm), primarily exosomes and exosome-like vesicles, are secreted by most cells of the organism and are found in virtually all biological fluids. Signaling molecules, including proteins, lipids and various classes of nucleic acids (exosomal cargo), are incorporated into EVs through tightly controlled selection and loading mechanisms [3]. Due to the fact that the composition of secreted vesicles reflects the molecular profile of the parent cells, as well as the increasingly evident role of these structures at all stages of tumor progression, EVs are considered a promising source of markers for liquid non-invasive diagnosis of malignant neoplasms [4]. Furthermore, exosomal markers, including regulatory RNAs, have a number of advantages over both tissue and serological tumor markers, such as free circulating nucleic acids. These advantages include high information content, stability in biological fluids, including the bloodstream, and high concentration of molecules [5]. To date, several potential marker panels based on exosomal miRNAs have been proposed, including diagnostic markers for ovarian cancer (OC) [6–8]. However, the proposed sets of miRNAs vary greatly among different studies. This variation can be attributed to the natural heterogeneity of the vesicles and by the great variability in the methods used to isolate EVs from biological fluids and to analyze their

molecular composition [9, 10]. Previously, we showed for the first time that EVs corresponding to exosomes can be isolated from uterine aspirates and verified their compliance with the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) guidelines [9]. Analysis of the transcriptome of small exosomal RNAs in a pilot sample revealed significant differences in miRNA profiles between EVs from uterine aspirates of epithelial OC patients and healthy donors [11]. The differential expression (DE) of miRNAs in EVs from OC patients and controls was confirmed through subsequent analysis of an expanded sampling (data in press). The DE miRNAs included molecules that were significantly upregulated (UA-UP) and significantly downregulated (UA-DOWN) in EVs of uterine aspirates of OC patients.

To investigate the relationship between the identified changes (DE) and the pathogenesis of OC, we examined the levels of individual DE miRNAs in both OC cells and their secreted EVs. For this task, we selected four miRNAs from the up-regulated group and three miRNAs from the down-regulated group based on our data on their expression in EVs from uterine aspirates of OC patients (UA-OC EVs). The obtained results indicate that the levels of miRNAs from the UA-UP group were significantly higher than those from the UA-DOWN group in all examined OC cells. Comparison of the expression of the same miRNAs in parental cells and secreted EVs revealed that the levels of miRNAs from the UA-UP and UA-DOWN groups had opposite cell-to-EVs ratio (cell/EV ratio). Specifically, the levels of miRNAs from the UA-UP group were significantly higher in the cells of all OC lines while the levels of miRNA from the UA-DOWN group were significantly higher in the secreted EVs in all cases.

The **aim of this work** – to investigate the expression of the miRNAs miR-125a-5p, -27a-5p, miR-193a-5p, -135b-5p, -451a, -495-3p and -136-5p in OC cell lines and in EVs secreted by OC cells in culture.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures. Ovarian cancer cell lines OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-8 and SKOV3 were cultured in RPMI-1640 medium (PanEco, Russia) supplemented with 10 % fetal calf serum (FBS) (HyClone, Austria), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (PanEco) at 37 °C and 5 % CO₂. To obtain exosome-free medium, FBS pre-cleared of native vesicles by overnight ultracentrifugation at 110,000g was used. To collect conditioned medium, cells were seeded into six 175 cm² culture flasks. The following day, the medium was changed to exosome-free medium. Once the cells reached 90 % confluence, the medium was selected, pooled, and used to isolate EVs.

Isolation of small extracellular vesicles. The small EVs were isolated using the differential centrifugation method. The conditioned medium underwent serial centrifugation at 800g for 15 min, 2000g for 15 min, and 10,000g for 30 min, all at 4 °C. The supernatant obtained was then ultracentrifuged for 2 hours at 110,000g, 4 °C. The resulting pellet was dissolved in 5 ml of cold PBS and then precipitated again for 1 hour at 110,000g and 4 °C. The purified pellet, which mainly consists of small EVs, was dissolved in 120 µl of ice-cold PBS, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C until further analysis.

Nanoparticle tracking analysis. Particle size distribution and concentration were determined by nanoparticle tracking analysis (NTA) using a NanoSight LM14 instrument equipped with an integrated temperature sensor (Malvern Panalytical Ltd., UK), LM 14C laser unit (405 nm, 65 mW) and a high-sensitivity camera with CMOS sensor (C11440-50B, Hamamatsu Photonics, Japan). The measurements were conducted following the methodology previously described [11] and in accordance with ASTM E2834-12(2018).

Immunoblotting and antibodies. Protein concentration in EVs samples and cells lysed in RIPA buffer was determined using the NanoOrange™ Kit (N6666, ThermoFisher Scientific, USA) according to the manufacturer's recommendations. Immunoblotting was performed as previously described [11], except that 5 µg of protein was applied to SDS-PAGE and visualized using SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34095, ThermoFisher Scientific, USA). The antibodies used in this work were anti-Flotillin-2 (#3436S, 1 : 1000; Cell Signaling Technology, USA), anti-CD9 (#13174, 1 : 2000; Cell Signaling Technology, USA), anti-TSG-101 (ab125011, 1 : 5000; Abcam, UK), anti-PCNA (#sc-7907, 1 : 500; Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-mouse goat polyclonal antibody (#ab5887, 1 : 8000; Abcam, UK) and anti-rabbit goat polyclonal antibody (#29902, 1 : 80 000; Cell Signaling Technology, USA).

MiRNA isolation and analysis. Isolation of miRNA from cells and EVs was carried out using a kit for isolation

of total RNA and miRNA (LRU-100-50, Biolabmix, Russia) according to the manufacturer's recommendations. The concentration of miRNA in the obtained samples was measured using the Qubit™ miRNA assay kit (Q32881, Invitrogen, USA). MiRNA detection was performed by Stem-Loop reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) [12]. A total of 10 ng (for cell lines) and 2 ng (for EVs) miRNA was used in the reverse transcription reaction with 1 pmol Stem-Loop primer and 2 U MMuLV H Reverse Transcriptase (RT-10, Dialat Ltd., Russia). Primers for miRNAs were designed using miR-Base v22.1 and synthesized by DNA-Synthesis LLC (Moscow, Russia) (the sequences of all oligonucleotides used are given in supplement). The amplification efficiency was assessed by testing serial dilutions of cDNA derived from the reverse transcription reaction of synthetic miRNAs. The PCR parameters were adjusted to ensure that all primer sets had efficiencies between 1.95 and 2.05. The RT products were diluted two-fold with nuclease-free water prior to PCR, which was performed on a CFX96 amplifier (Bio-Rad Laboratories Inc.) in a 20 µL reaction with 20 pmol forward primers, 10 pmol reverse primers and 4 pmol TaqMan™ probe in 5x Mas^{CFE} MIX-2025 buffer (MCFE-100, Dialat) under the following conditions 94 °C 3', followed by 44 cycles of 94 °C 30', Tm 30', 72 °C 30' (Tm for each miRNA detection system are listed in supplement). The reactions were performed in triplicate, and only results with a standard deviation of less than 0.3 were considered acceptable. Bio-Rad CFX Maestro 1.1 v.4.1 software was used to analyze the data and calculate cycle thresholds (Ct). The relative expression level was determined using the –ΔCt index, where ΔCt = Ct (miRNA) – Ct (reference sequence); in cells, the normalizer used was small nuclear RNA U6, while in the case of EVs, the geometric mean Ct of miR-191-5p and miR-151a-3p was used. The negative value of ΔCt was employed to simplify the data presentation on the graph.

Statistical analysis. Statistical processing of the obtained data was performed in GraphPad Prism 9.4.0. The Mann–Whitney U test was used to compare groups of highly and poorly represented miRNAs in cells and EVs, and to compare the level of miRNA representation in cells and EVs of the corresponding cell line. Analysis of variance (one-factor ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test) was used for multiple comparisons of individual miRNAs in cells and EVs. Correlation analysis was performed using Pearson's correlation coefficient, $p < 0.05$.

RESULTS

Characterization of EVs isolated from the conditioned medium of OC cells. To confirm the nature of the samples obtained, EVs from all four OC cell lines were characterized using three different methods in accordance with the MISEV2018 guidelines [9]: NTA to evaluate particle size distribution and concentration, transmission electron microscopy (TEM) to analyze vesicle size and morphology, and immunoblotting to analyze exosomal markers. Based on TEM data, the isolated particles were found to have a membrane and a size of less

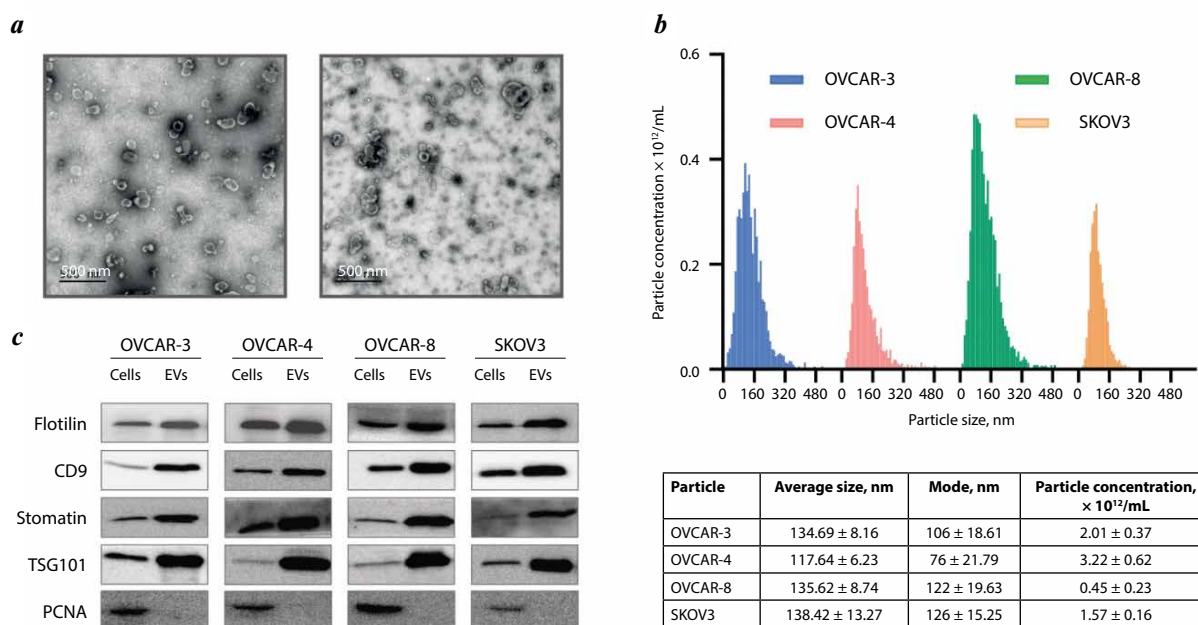


Fig. 1. Verification of extracellular vesicles (EVs) isolated from conditioned medium of ovarian cancer cells: *a* – transmission electron microscopy analysis of the EV morphology, scale bar 500 nm. Examples of EVs isolated from OVCAR-8 and SKOV3 cell lines; *b* – nanoparticle tracking analysis data for evaluation of the EV size distribution and concentration and mean values for the EV size, median, mode and concentration; *c* – Western blot analysis of exosomal markers in cells and secreted EVs. The PCNA protein was used to confirm the absence of cellular proteins of non-vesicular origin in EV preparations

than 200 nm. The particles exhibited a cup-shaped morphology common to this type of analysis (fig. 1, *a*).

The NTA analysis showed that all samples displayed a size distribution typical of small vesicles (fig. 1, *b*). To validate the nature of the obtained particles, exosomal markers were analyzed. For this task, we utilized various proteins from different intracellular compartments, including TSG101, a component of the ESCRT-I complex involved in exosome biogenesis, as well as CD9 tetraspanin and components of lipid rafts such as flotillin-2 and stomatin, in accordance with ISEV recommendations. We previously proposed the latter protein as a highly selective exosome marker [13]. The PCNA protein served as a negative control to confirm the absence of non-vesicular cellular particles in the EV samples. As depicted in fig. 1, *c*, all EV preparations demonstrated a pronounced enrichment of all exosomal markers and the absence of PCNA, which was solely detected in cell lysates of the corresponding OC cell lines.

Selection of reference molecules for reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction data normalization. A challenge in analyzing miRNAs in EVs using RT-qPCR is the absence of universally accepted reference sequences for data normalization. Although the small nuclear RNA U6 is the most frequently used normalizer for cellular miRNA analysis, numerous different sequences are employed as reference molecules in the study of EV molecular composition. Most studies do not provide justification for the selection of specific molecules or confirm their compliance with normalization criteria. To address this issue, we first validated U6 as a reference molecule for RT-PCR analysis of cellular

miRNAs and selected reference sequences for the analysis of EV miRNAs. Based on the data we obtained from the transcriptome analysis of small EV RNAs, we selected miR-342-3p and miR-191-5p, as well as miR-151a-3p, which was suggested as a normalizer [14], as potential references.

The screening of potential reference sequences by Stem-Loop RT-qPCR (fig. 2, *a*) and subsequent analysis using the RefFinder algorithm (<https://blooge.cn/RefFinder/?type=reference> [15]), which combines four methods to search for normalizers, resulted in the identification of an optimal combination of two reference sequences, miR-151a-3p and miR-191-5p (fig. 2, *b*).

MiRNAs upregulated in extracellular vesicles of ovarian cancer patients are characterized by higher expression in ovarian cancer cells. We analyzed the expression of seven miRNAs in OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-8, and SKOV3 cell lines: miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p, -135b-5p, -451a, -495-3p, and -136-5p. These miRNAs were previously shown to have significant DE in EVs from uterine aspirates of OC patients (UA-OC EVs) compared to healthy donors. The results of the Stem-Loop RT-qPCR were normalized relative to U6 for cells and to the selected reference molecules, miR-151a-3p and miR-191-5p, for EVs.

Based on the level of expression in cells, the studied miRNAs could be clearly divided into two distinct groups. These groups correspond precisely to the miRNAs that were significantly upregulated (UA-UP – miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p, and -135b-5p) and downregulated (UA-DOWN – miR-451a, -495-3p, -136-5p) in UA-OC EVs, according to our data.

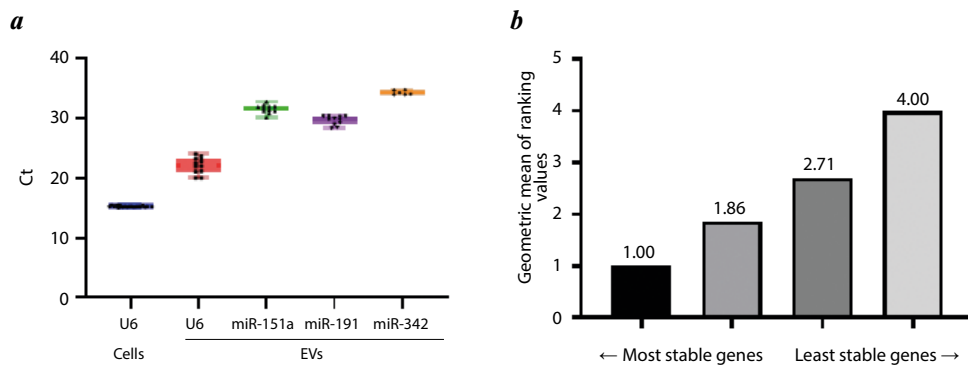


Fig. 2. Analysis of potential reference miRNAs for normalization of reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) data in cells and secreted extracellular vesicles (EVs): *a* – amplification cycles of endogenous U6, miR-151a, miR-191 and miR-342 measured by Stem-Loop RT-qPCR in cells and secreted EVs of four ovarian cancer cell lines; *b* – comprehensive gene stability in secreted EVs evaluated by RefFinder tool

Figure 3, *a* shows significantly higher expression levels of miRNAs belonging to the UA-UP group compared to miRNAs from the UA-DOWN group in all investigated cell lines (Mann–Whitney U test $p < 0.05$). Additionally, multiple pairwise comparisons using analysis of variance revealed that the level of each miRNA from the first group was significantly higher than that of each miRNA from the second group (ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test). On average, the difference in expression was 1500-fold, with miR-125a-5p exhibiting the highest expression level, 40,000-fold higher than the average mean for miRNAs from the UA-DOWN group. The least expressed miRNA was miR-136-5p, which was expressed about 7-fold lower than other miRNAs in the UA-DOWN group.

The miRNA expression pattern in EVs varied (fig. 3, *b*), but no statistically significant differences were found between the two groups. Among all the examined miRNAs miR-125a showed the highest level of expression in both EVs and cells. However, miR-451a from the UA-DOWN group exhibited the second-highest level of expression. Its level in EVs was only one order of magnitude lower than that of miR-125a. In cells, this difference reached four orders of magnitude. Meanwhile, miR-136-5p remained the least expressed of all the examined miRNAs.

MiRNAs from the UA-UP and UA-DOWN groups exhibit an inverse expression ratio between ovarian cancer cells and secreted vesicles. In the next step, we analyzed the ratio of each investigated miRNA in OC cells and the vesicles they

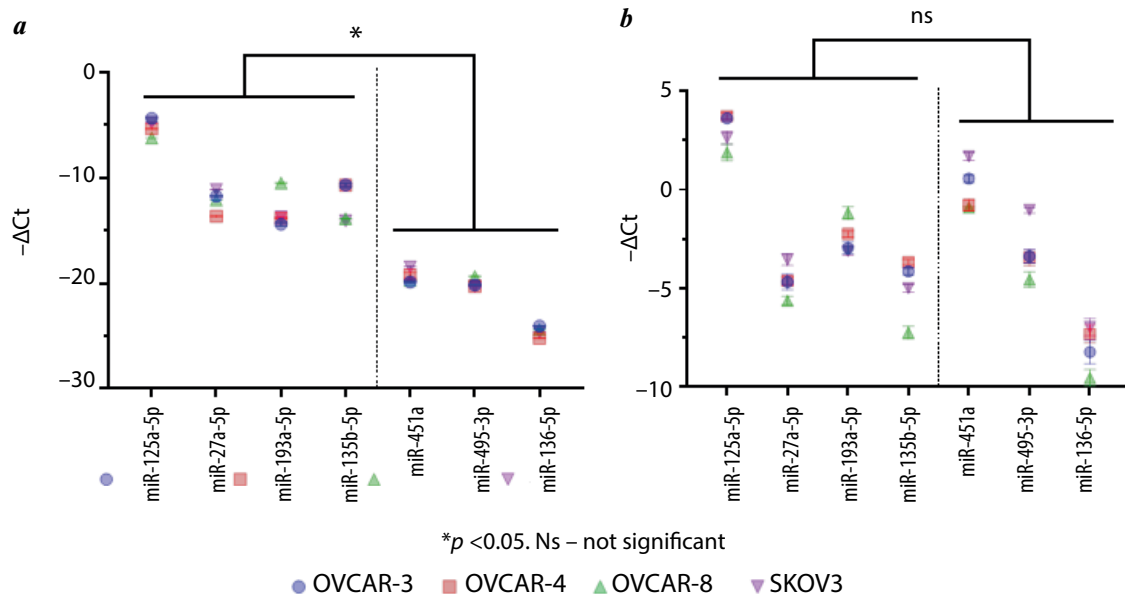


Fig. 3. MiRNA levels in parental cells of four ovarian cancer cell lines (*a*) and in the small extracellular vesicles (EVs) they secrete (*b*). The vertical dashed line separates miRNAs from the UA-UP and UA-DOWN groups. The normalized $-\Delta Ct$ value (negative value is used for convenience of data presentation on the graph) was calculated relative to the corresponding reference gene: U6 in case of cells (*a*) and geometric mean Ct of miR-191-5p and miR-151a-3p for EVs (*b*). $\Delta Ct = Ct(miR) - Ct(reference)$

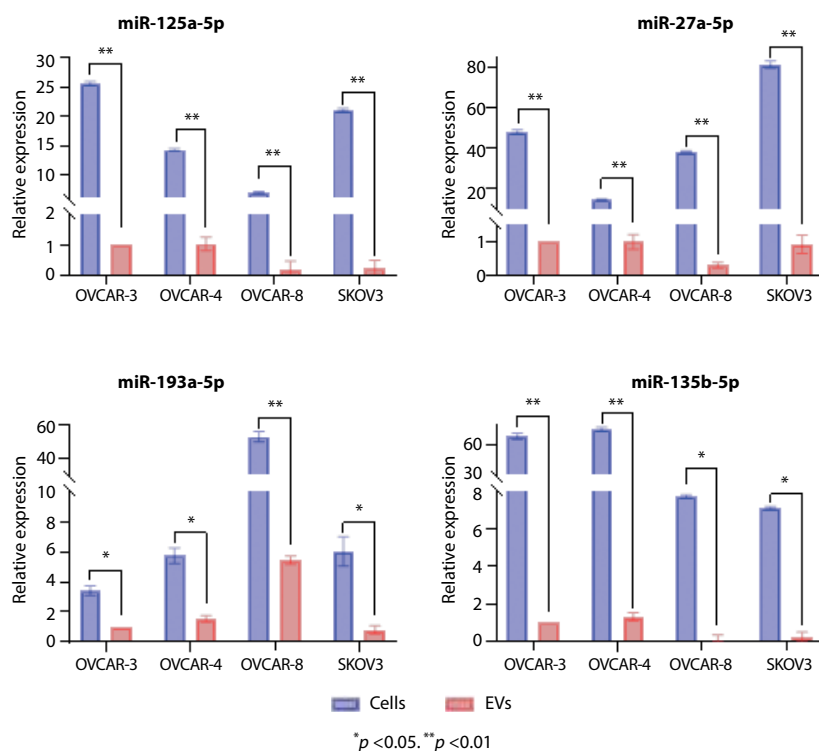


Fig. 4. Comparison of the level of miRNA of the UA-UP group in cells and secreted extracellular vesicles (EVs). Expression values are presented as relative to the level of the corresponding miRNA in EVs of OVCAR-3 line

produce. As there is currently no universal reference sequence for the simultaneous comparative analysis of miRNAs in cells and EVs, we determined the absolute expression level for each specific miRNA by normalizing it to the mass of total small RNA introduced into the reaction.

The results of the analysis indicated that the miRNAs from the UA-UP and UA-DOWN groups had an opposite expression ratio between the parental cells and their secreted vesicles (EV/cell ratio). In all lines studied, the levels of each miRNA from the UA-UP group (miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p, and -135b-5p) were significantly higher in cells than in their secreted vesicles (“cells > EVs”; $p < 0.05$), with an average difference of 47-fold (fig. 4). The difference was minimal for miR-193a, which showed a 3–10-fold higher level in cells than in EVs. This indicates a more balanced distribution of this miRNA between intracellular and vesicular compartments. The remaining miRNAs displayed more significant differences in expression ratios.

Interestingly, two miRNAs, specifically miR-193a and miR-135b, showed a strong positive correlation between expression levels in cells and EVs, with Pearson correlation coefficients of 0.99 and 0.98, respectively ($p < 0.05$). This suggests a stable distribution pattern of these miRNAs between these compartments.

For all miRNAs in the UA-DOWN group (miR-451a, -495-3p, -136-5p), the correlation was the opposite. In all cell lines, the level of each miRNA from this group was significantly higher in vesicles compared to the intracellular level (“EVs > cells”) ($p < 0.05$) (fig. 5).

In particular, miR-451a expression in EVs exceeded its intracellular level by 27–118-fold, depending on the cell line. For miR-495-3p, a 3-fold increase in EVs was detected in the OVCAR-8 line and an even more pronounced 36-fold increase in the SKOV-3 line compared to the cellular level. Similarly, the level of miR-136-5p in EVs was 3 times higher than the intracellular level in the OVCAR-8 line and 32 times higher in the OVCAR-4 line.

Therefore, we found that miRNAs differentially expressed in EVs from uterine aspirates of OC patients exhibit significant DE in OC cells, with a significant predominance of molecules upregulated in the EVs of OC patients. Additionally, these miRNAs display an inverse ratio between their levels in the parental cells and the secreted vesicles. The miRNAs that were found to be upregulated in the EVs of OC patients are characterized by “cells > EVs” ratio, while the downregulated miRNAs are characterized by the ratio “EVs > cells”.

The observed enrichment of OC cells with miRNA molecules that are upregulated in UA-OC EVs indicates their tumor-promoting activity. Conversely, the decreased levels of miRNAs that are downregulated in UA-OC EVs suggest their tumor-suppressive activity. Meanwhile, each miRNA from the latter group was significantly more represented in vesicles than in parental cells (“EVs > cells”) ($p < 0.05$) (fig. 5).

In summary, the analysis of miRNAs in parental OC cells and secreted EVs revealed the controlled and context-dependent nature of miRNA distribution between ve-

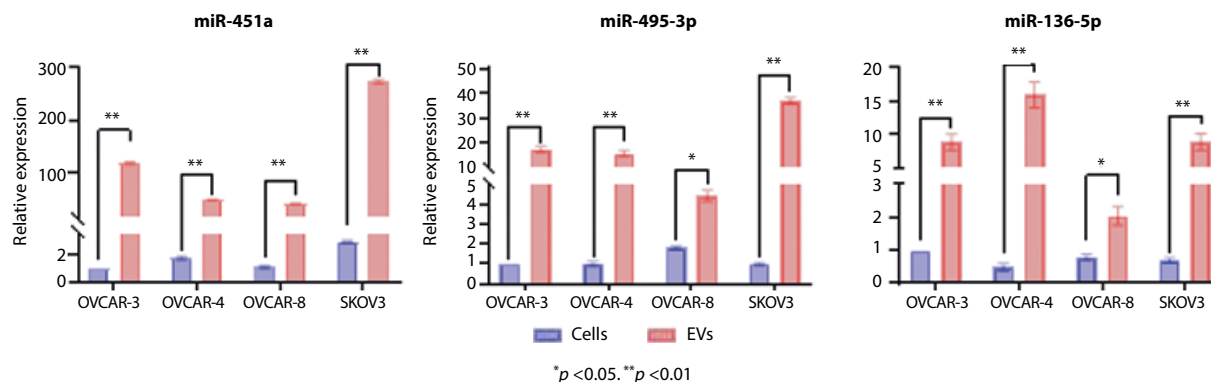


Fig. 5. Comparison of the level of miRNA of the UA-DOWN group in cells and secreted extracellular vesicles (EVs). Expression values are presented as relative to the level of the corresponding miRNA in cells of OVCAR-3 line

sicular and cellular compartments. MiRNAs with potential tumor-promoting activity accumulate to a greater extent in cells, while molecules with potential tumor-suppressing activity are eradicated as part of EVs.

DISCUSSION

In recent decades, secreted EVs, and exosomes in particular, have gained significant scientific attention in experimental oncology due to their potential in both the diagnosis and therapy of malignant neoplasms. Initially described as cellular waste disposal units in the 1980s, these nanoscale vesicles have since been recognized as playing a crucial role in intercellular communication under both normal and pathological conditions [3]. Numerous studies have demonstrated their fundamental role in carcinogenesis. EVs play a crucial role in various processes, including tumor cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition, migration, invasion, angiogenesis, and metastasis [16]. They provide intercellular transport of bioactive molecules, which can affect antitumor immunity, alter the microenvironment, and promote tumor development and resistance to therapy. Exosomes selectively and controllably load miRNAs, which are crucial regulators of expression, through various mechanisms [17]. Exosomal miRNAs can be transported locally or to distant organs and tissues, where they participate in epigenetic regulation and alter intracellular signaling in recipient cells.

Therefore, exosomal miRNAs have gained increasing attention as potential diagnostic and prognostic markers of malignant neoplasms [18]. Previously, we showed for the first time that vesicles corresponding to EVs according to ISEV criteria can be isolated by ultracentrifugation from individual uterine aspirate samples in sufficient concentration for subsequent transcriptome analysis [11]. Additionally, we optimized techniques for small RNA isolation from EVs and their subsequent analysis [19]. According to the results of next-generation deep sequencing (NGS-small RNA-seq) performed on a pilot sample of EVs from uterine aspirates, significant differences were observed in the miRNA

profiles of patients diagnosed with OC and healthy donors [11]. A follow-up study performed on an expanded sampling, using stringent selection criteria (false discovery rate <0.001, FC >2), revealed 35 differentially expressed miRNAs (data in press). Notably, the miRNAs identified as up- or downregulated in UA-OC EVs include molecules with known tumor-promoting or tumor-suppressing activities. For instance, miR-205-5p and the members of the miR-200 family, which have been repeatedly shown to be upregulated in EVs from OC patients [20], as well as several other known cancer promoters. The second group included known miRNAs with tumor suppressor activity such as miR-152-3p [21], -424-5p [22, 23], -199a and -199b [24, 25], among others. Meanwhile, we detected molecules whose role in carcinogenesis in general and in OC progression remains unclear in the literature, as well as miRNAs that are little known in this context.

To assess the extent to which the identified changes are related to the pathogenesis of OC, in this study we evaluated the expression of certain miRNAs from both groups (upregulated and downregulated in UA-OC EVs) in OC cells cultured in vivo and in EVs from conditioned medium.

The selection of miRNAs for the study was made in such a way that each of the miRNA groups (up- and downregulated in UA-OC EVs) included both known tumor promoter/suppressor molecules and miRNAs with contradictory or poorly represented activity data. Accordingly, from UA-UP group we selected miR-135b, which has been shown to promote OC tumor cell growth and resistance to chemotherapy [26–28]; miR-125a, which is considered to be more of a suppressor miRNA, inhibiting proliferation, epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of OC cells [29–31], and miR-193a-5p, which also display distinct and predominantly tumor suppressor activity [32–34], although the latter two miRNAs have been shown to be overexpressed in stage III OC compared to stage I OC [35]. Also, miR-27a-5p shows conflicting data in the context of OC progression (increased sensitivity of OC cells to cisplatin [36], stimulation of migration and

invasion [37], decreased representation of the CX₃CR1 receptor in natural killer cells [38]).

Among the miRNAs downregulated in UA-OC EVs, we selected the known suppressor molecules, miR-495-3p [39–41] and miR-136-5p [42, 43], as well as miR-451a. The data on miR-451a in the context of OC are contradictory: while in one study miR-451 expression was reduced in OC compared to normal tissues and its low level was associated with late the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage, high serum CA-125 levels, metastasis to lymph nodes and poor prognosis for patients [44], in another study, miR-451a was overexpressed in stage III OC compared to stage I [35]. In support of this claim, a third study showed that the expression of miR-27a-3p and miR-451a was upregulated in multidrug-resistant OC and cervical cancer cell lines. This upregulation led to the activation of P-glycoprotein, a product of the *MDR1* gene, which confers resistance of tumor cells to a wide range of chemotherapeutic drugs [45].

We found that cells from all four OC lines examined were enriched in miRNAs that were upregulated in UA-OC EVs. Conversely, the cellular expression of all miRNAs that were downregulated in UA-OC EVs was significantly lower, with a difference of several orders of magnitude. These results were quite expected and supported our assumption of a tumor-promoting or tumor-suppressive role of these miRNAs in OC. It should be noted that although, as mentioned above, miR-125a-5p and miR-193a-5p are more likely to be classified as suppressor molecules according to the literature data, both miRNAs have been shown to be associated with OC progression, particularly with overexpression in stage III compared to stage I [35]. Furthermore, according to the results of a large cohort study published in *Lancet Oncol* in 2016, increased miR-193a-5p expression was associated with negative prognosis and recurrence [46]. These findings were later confirmed by the authors in a different cohort [47] and may explain the high levels of these miRNAs in OC cells, as well as their increase in UA-OC EVs, especially considering that the majority of EV preparations from uterine aspirates were obtained from patients with high-grade adenocarcinoma, the most aggressive form of OC, and predominantly represented late stages of the disease (mainly stage III).

In contrast, the analysis of the ratio of miRNAs in parental OC cells and secreted EVs yielded unexpected results. Given the putative role of these miRNAs as promoters/suppressors of tumor progression, we expected to see either a similar miRNA levels in EVs and parental cells, or even enrichment of EVs with potential tumor-promoting miRNAs, and vice versa. However, the study revealed the contrary result – the “cells > EVs” ratio characterized potential tumor-promoting molecules, while the “EVs > cells” ratio characterized suppressor molecules. These ratios were observed for all studied miRNAs and all cell lines.

It should be noted that despite significant progress in understanding the mechanisms of loading molecules, including miRNAs, into EVs [17, 48], the question of what determines the selection of such molecules for inclusion in the EV cargo is still discussed in the literature and remains unanswered. In this context, the results of several studies demonstrating selective loading of certain miRNAs into EVs are of particular interest. It has been suggested that miRNAs can be divided into those that are secreted to a greater extent and those that are preferentially retained in the cell and incorporated into EVs to a lesser extent [49, 50]. However, there is currently little data on which miRNAs belong to each group, and it is clear that their composition depends on cell growth conditions. Notably, miR-451a is reported to be an example of miRNAs preferentially loaded into EVs, which is consistent with our findings [49].

Another possible explanation for the results obtained is the peculiarities of EVs secretion by cells growing in two-dimensional culture. It is assumed that during the growth of clonal culture on the substrate, tumor cells are primarily guided by “their own needs”. They overexpress and accumulate tumor-promoting miRNAs for their own growth, while limiting the expression and releasing from suppressor molecules, including through their secretion as part of EVs.

In contrast to growth in two-dimensional culture, tumor development *in vivo* involves competitive growth of cells in a heterogeneous population and remodeling of the microenvironment. This includes reprogramming of stromal fibroblasts, endothelial cells, immune cells, and stimulation of neoangiogenesis, as well as activation of other survival mechanisms. Under these conditions, tumor cells produce more vesicles for delivery to cells in the microenvironment and distant tissues. This is likely to be accompanied by changes in the spectrum of molecules, including miRNAs, that are preferentially secreted as part of EVs, which may lead to a shift in the “cell/EV” ratio. Results comparing EVs secreted by cells in 3D and 2D models suggest that such changes occur [51, 52]. Furthermore, the molecular composition of EVs secreted by cells in 3D models appears to be closer to the composition of EVs from the corresponding biological fluids [53, 54], which confirms our hypothesis and is consistent with the data obtained on the enrichment/reduction of tumor-promoting/suppressor miRNAs in EVs from uterine aspirates.

CONCLUSION

Here, we showed for the first time that the levels of miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p and -135b-5p in OC cells are significantly higher than those of miR-451a, -495-3p and -136-5p, indicating the tumor-promoting and tumor-suppressive activities of these molecules, respectively, and confirming their potential diagnostic value in OC. The cell-to-EV ratio for studied miRNAs is characterized by a decrease in EV levels for highly expressed miRNAs and an increase for low-expressed miRNAs.

Sequences of primers and TaqMan probes used. Annealing temperatures (Tm) of primers

Primer s and TaqMan probes	miRNA	Sequence 5'-3'	Tm, °C
RT-primers	miR-125a-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCACAG	—
	miR-27a-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTGCTCA	—
	miR-193a-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCATCT	—
	miR-135b-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCACAT	—
	miR-451a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAC TC AG	—
	miR-495-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAGAAG	—
	miR-136-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCACAT	—
	miR-151a-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCCTCAA	—
	miR-191-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCAGCTG	—
	U6	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT	—
F-primers	miR-125a-5p	ACGCATCCCTGAGACCC	56
	miR-27a-5p	CACGCAAGGGCTTAGCTG	56
	miR-193a-5p	AACAAGTGGGTCTTTGCG	56
	miR-135b-5p	CACGCATATGGCTTTTCA	54
	miR-451a	CACGCATAAACCGTTACCA	56
	miR-495-3p	CGGCGGAAACAAACATGG	53
	miR-136-5p	CGGCGGACTCCATTTGTT	54
	miR-151a-3p	CGGCGGCTAGACTGAAGC	54
	miR-191-5p	CACGCACAACGGAATCCC	56
	U6	CTCGCTTCGGCAGCACATA	60
Universal R-primer		GTGCAGGGTCCGAGGT	—
R-primer	U6	CGCTTCACGAATTTGCGTG	—
TaqMan-probes	miR-125a-5p	FAM-GCACTGGATACGACTCACAGGTT-BHQ1	—
	miR-27a-5p	FAM-TGGATACGACTGCTCACAAG-BHQ1	—
	miR-193a-5p	FAM-CTGGATACGACTCATCTCGCC-BHQ1	—
	miR-135b-5p	FAM - CTGGATACGACTCACATAGGA - BHQ-1	—
	miR-451a	FAM-TTACTGAGTTGTCGTATCC-BHQ1	—
	miR-495-3p	FAM-TGGATACGACAAGAAGTGCA-BHQ1	—
	miR-136-5p	FAM-TGGATACGACTCCATCATCA-BHQ1	—
	miR-151a-3p	FAM-CTGGATACGACCCTCAAGGA-BHQ1	—
	miR-191-5p	FAM-CTGGATACGACCAGCTGCTT-BHQ1	—
	U6	FAM-CCTTGCGCAGGGGCCATGC-BHQ-1	—

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

- Raposo G., Stahl P.D. Extracellular vesicles — on the cusp of a new language in the biological sciences. *Extracell Vesicles Circ Nucleic Acids* 2023;4(2):240–54. DOI: 10.20517/evcna.2023.18
- Kalluri R., LeBleu V.S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* 2020;367(6478):eaau6977. DOI: 10.1126/science.aau6977
- Liu Y.-J., Wang C. A review of the regulatory mechanisms of extracellular vesicles-mediated intercellular communication. *Cell Commun Signal* 2023;21(1):77. DOI: 10.1186/s12964-023-01103-6
- Xu R., Rai A., Chen M. et al. Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15(10):617–38. DOI: 10.1038/s41571-018-0036-9
- Logozzi M., Mizzoni D., Di Raimo R., Fais S. Exosomes: a source for new and old biomarkers in cancer. *Cancers* 2020;12(9):2566. DOI: 10.3390/cancers12092566
- Staicu C.E., Predescu D.V., Rusu C.M. et al. Role of microRNAs as clinical cancer biomarkers for ovarian cancer: a short overview. *Cells* 2020;9(1):169. DOI: 10.3390/cells9010169
- Meng X., Müller V., Milde-Langosch K. et al. Diagnostic and prognostic relevance of circulating exosomal miR-373, miR-200a, miR-200b and miR-200c in patients with epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* 2016;7(13):16923–35. DOI: 10.18632/oncotarget.7850
- Pan C., Stevic I., Müller V. et al. Exosomal microRNAs as tumor markers in epithelial ovarian cancer. *Mol Oncol* 2018;12(11):1935–48. DOI: 10.1002/1878-0261.12371
- 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
- Salmond N., Williams K.C. Isolation and characterization of extracellular vesicles for clinical applications in cancer — time for standardization? *Nanoscale Adv* 2021;3(7):1830–52. DOI: 10.1039/d0na00676a
- Skryabin G.O., Komelkov A.V., Zhordania K.I. et al. Extracellular vesicles from uterine aspirates represent a promising source for screening markers of gynecologic cancers. *Cells* 2022;11(7):1064. DOI: 10.3390/cells11071064
- Kramer F. Stem-Loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr Protoc Mol Biol* 2011;Chapter 15:Unit 15.10. DOI: 10.1002/0471142727.mb1510s95
- Skryabin G.O., Komelkov A.V., Galetsky S.A. et al. Stomatin is highly expressed in exosomes of different origin and is a promising candidate as an exosomal marker. *J Cell Biochem* 2021;122(1):100–15. DOI: 10.1002/jcb.29834
- Burdiet M., Jiménez J., Rodríguez-Antolín C. et al. MiR-151a: a robust endogenous control for normalizing small extracellular vesicle cargo in human cancer. *Biomark Res* 2023;11(1): 94. DOI: 10.1186/s40364-023-00526-0
- Xie F., Wang J., Zhang B. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. *Funct Integr Genomics* 2023;23(2):125. DOI: 10.1007/s10142-023-01055-7
- Wang X., Huang J., Chen W. et al. The updated role of exosomal proteins in the diagnosis, prognosis, and treatment of cancer. *Exp Mol Med* 2022;54(9):1390–400. DOI: 10.1038/s12276-022-00855-4
- Zhang J., Li S., Li L. et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2015;13(1):17–24. DOI: 10.1016/j.gpb.2015.02.001
- Liu Q.-W., He Y., Xu W.W. Molecular functions and therapeutic applications of exosomal noncoding RNAs in cancer. *Exp Mol Med* 2022;54(3):216–25. DOI: 10.1038/s12276-022-00744-w
- Skryabin G.O., Vinokurova S.V., Elkina N.V. et al. Comparison of methods for microRNA isolation from extracellular vesicles obtained from ascitic fluids. *Biochemistry* 2022;87(11):1354–66. DOI: 10.1134/S0006297922110141
- Koutsaki M., Libra M., Spandidos D.A., Zaravinos A. The miR-200 family in ovarian cancer. *Oncotarget* 2017;8(39):66629–40. DOI: 10.18632/oncotarget.18343
- Liu X., Li J., Qin F., Dai S. miR-152 as a tumor suppressor microRNA: target recognition and regulation in cancer. *Oncol Lett* 2016;11(6):3911–6. DOI: 10.3892/ol.2016.4509
- Xuan J., Liu Y., Zeng X., Wang H. Sequence requirements for miR-424-5p regulating and function in cancers *Int J Mol Sci* 2022;23(7):4037. DOI: 10.3390/ijms23074037
- Timofeeva A.V., Fedorov I.S., Asaturova A.V. et al. Blood plasma small non-coding RNAs as diagnostic molecules for the progesterone-receptor-negative phenotype of serous ovarian tumors. *Int J Mol Sci* 2023;24(15):12214. DOI: 10.3390/ijms241512214
- Gadducci A., Sergiampietri C., Lanfredini N., Guiggi I. MicroRNAs and ovarian cancer: the state of art and perspectives of clinical research. *Gynecol Endocrinol* 2014;30(4):266–71. DOI: 10.3109/09513590.2013.871525
- Jiang Y., Shi Y., Lyu T. et al. Identification and functional validation of differentially expressed microRNAs in ascites-derived ovarian cancer cells compared with primary tumour tissue. *Cancer Manag Res* 2021;13:6585–97. DOI: 10.2147/CMAR.S320834
- Wang J., Zhang R., Zhang B. et al. MiR-135b improves proliferation and regulates chemotherapy resistance in ovarian cancer. *J Mol Histol* 2022;53(4):699–712. DOI: 10.1007/s10735-022-10080-y
- Chen H., Mao M., Jiang J.D. et al. Circular RNA CDR1as acts as a sponge of miR-135b-5p to suppress ovarian cancer progression. *Oncotargets Ther* 2019;12:3869–79. DOI: 10.2147/OTT.S207938
- Yu S., Yu M., Chen J. et al. Circ_0000471 suppresses the progression of ovarian cancer through mediating mir-135b-5p/dusp5 axis. *Am J Reprod Immunol* 2023;89(4):e13651. DOI: 10.1111/aji.13651
- Cao Y., Shen T., Zhang C. et al. MiR-125a-5p inhibits EMT of ovarian cancer cells by regulating TAZ/EGFR signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019;23(19):8249–56. DOI: 10.26355/eurev_201910_19134
- Lee M., Kim E.J., Jeon M.J. MicroRNAs 125a and 125b inhibit ovarian cancer cells through post-transcriptional inactivation of EIF4EBP1. *Oncotarget* 2015;7(8):8726–42. DOI: 10.18632/oncotarget.6474
- Yang J., Li G., Zhang K. MiR-125a regulates ovarian cancer proliferation and invasion by repressing GALNT14 expression. *Biomed Pharmacother* 2016;80:381–7. DOI: 10.1016/j.biopha.2015.12.027
- Wang Y., Li N., Zhao J., Dai C. MiR-193a-5p serves as an inhibitor in ovarian cancer cells through RAB11A. *Reprod Toxicol* 2022;110:105–12. DOI: 10.1016/j.reprotox.2022.04.003
- Zhang S., Liu J., He J., Yi N. MicroRNA-193a-5p exerts a tumor suppressive role in epithelial ovarian cancer by modulating RBBP6. *Mol Med Rep* 2021;24(2):582. DOI: 10.3892/mmr.2021.12221
- Khordadmehr M., Shahbazi R., Sadreddini S., Baradaran B. miR-193: a new weapon against cancer. *J Cell Physiol* 2019;234(10): 6861–72. DOI: 10.1002/jcp.28368
- Eitan R., Kushnir M., Lithwick-Yanai G. et al. Tumor microRNA expression patterns associated with resistance to platinum based chemotherapy and survival in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 2009;114(2):253–9. DOI: 10.1016/j.ygyno.2009.04.024
- Wambecke A., Ahmad M., Morice P.M. et al. The lncRNA 'UCA1' modulates the response to chemotherapy of ovarian cancer through direct binding to miR-27a-5p and control of UBE2N levels. *Mol Oncol* 2021;15(12):3659–78. DOI: 10.1002/1878-0261.13045
- Che X., Jian F., Chen C. et al. PCOS serum-derived exosomal miR-27a-5p stimulates endometrial cancer cells migration and invasion. *J Mol Endocrinol* 2020;64(1):1–12. DOI: 10.1530/JME-19-0159
- Regis S., Caliendo F., Dondero A. et al. TGF- β 1 downregulates the expression of CX3CR1 by inducing miR-27a-5p in primary human NK cells. *Front Immunol* 2017;8. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00868>
- Huldani H., Malviya J., Rodrigues P. et al. miR-495–3p as a promising tumor suppressor in human cancers. *Pathol Res Pract* 2023;248:154610. DOI: 10.1016/j.prp.2023.154610
- Chen H., Wang X., Bai J., He A. Expression, regulation and function of miR-495 in healthy and tumor tissues. *Oncol Lett* 2017;13(4):2021–6. DOI: 10.3892/ol.2017.5727

41. Liu S., Xi X. LINC01133 contribute to epithelial ovarian cancer metastasis by regulating miR-495-3p/TPD52 axis. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;533(4):1088–94. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.09.074
42. Zhu J., Luo J.E., Chen Y., Wu Q. Circ_0061140 knockdown inhibits tumorigenesis and improves PTX sensitivity by regulating miR-136/CBX2 axis in ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2021;14(10):136. DOI: 10.1186/s13048-021-00888-9
43. Zhao H., Liu S., Wang G. et al. Expression of miR-136 is associated with the primary cisplatin resistance of human epithelial ovarian cancer. *Oncol Rep* 2015;33(2):591–8. DOI: 10.3892/or.2014.3640
44. Ling S., Ruiqin M., Guohong Z., Ying W. Expression and prognostic significance of microRNA-451 in human epithelial ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2015;36(4):463–8.
45. Zhu H., Wu H., Liu X. et al. Role of microRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2008;76(5):582–8. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.06.007
46. Bagnoli M., Canevari S., Califano D. et al. Development and validation of a microRNA-based signature (MiROVaR) to predict early relapse or progression of epithelial ovarian cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 2016;17(8):1137–46. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30108-5
47. De Cecco L., Bagnoli M., Chiodini P. et al. Prognostic evidence of the miRNA-based ovarian cancer signature MiROVaR in independent datasets. *Cancers* 2021;13(7):1544. DOI: 10.3390/cancers13071544
48. Pucci M., Reclusa Asiain P., Duréndez Sáez E. et al. Extracellular vesicles as miRNA nano-shuttles: dual role in tumor progression. *Target Oncol* 2018;13(2):175–87. DOI: 10.1007/s11523-018-0551-8
49. Guduric-Fuchs J., O'Connor A., Camp B. et al. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics* 2012;13:357. DOI: 10.1186/1471-2164-13-357
50. Ohshima K., Inoue K., Fujiwara A. et al. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* 2010;5(10): DOI: 10.1371/journal.pone.0013247
51. Bordanaba-Florit G., Madarieta I., Olalde B. et al. 3D cell cultures as prospective models to study extracellular vesicles in cancer. *Cancers* 2021;13(2):307. DOI: 10.3390/cancers13020307
52. Kusuma G.D., Li A., Zhu D. et al. Effect of 2D and 3D culture microenvironments on mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles potencies. *Front Cell Dev Biol* 2022;10:819726. DOI: 10.3389/fcell.2022.819726
53. Rocha S., Carvalho J., Oliveira P. et al. 3D cellular architecture affects microRNA and protein cargo of extracellular vesicles. *Adv Sci Weinh Baden-Wurt Ger* 2019;6(4):1800948. DOI: 10.1002/advs.201800948
54. Thippabhotla S., Zhong C., He M. 3D cell culture stimulates the secretion of in vivo like extracellular vesicles. *Sci Rep* 2019;9(1):13012. DOI: 10.1038/s41598-019-49671-3

Acknowledgement. The TEM measurements were carried out on the basis of the “Electron microscopy in life sciences” User Facilities Center.

Благодарность. Измерения методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) выполнены на базе Центра коллективного пользования «Электронная микроскопия в науках о жизни».

Authors' contribution

G.O. Skryabin: article writing, analysis of the obtained data, preparation of illustrative material;
 A.A. Beliaeva: fine-tuning of Stem-Loop RT-qPCR systems, NTA analysis, miRNA analysis, preparation of illustrative material;
 A.D. Enikeev: cell cultures cultivation, conditioned medium collection, analysis of the obtained data, exosomal marker expression analysis;
 D.V. Bagrov: transmission electron microscopy performance;
 A.M. Keremet: EVs isolation, obtaining exosomal small RNAs, miRNA analysis;
 A.V. Komelkov: statistical data processing, editing;
 D.S. Elkin: primers for miRNA analysis design;
 D.M. Sylantjeva: EVs isolation, miRNA analysis;
 E.M. Tchekina: idea and organization of the research, literature review, analysis of the obtained data, scientific editing.

Вклад авторов

Г.О. Скрябин: написание текста статьи, анализ полученных данных, подготовка иллюстративного материала;
 А.А. Беляева: отработка систем для Stem-Loop полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), NTA-анализ, постановка ОТ-ПЦР, подготовка иллюстративного материала;
 А.Д. Еникеев: культивирование клеточных культур, сбор кондиционированной среды, анализ полученных данных;
 Д.В. Багров: получение ТЭМ-изображений ЭКВ;
 А.М. Керемет: выделение ЭКВ, получение экзосомальных малых РНК, постановка ОТ-ПЦР;
 А.В. Комельков: статистическая обработка данных, редактирование;
 Д.С. Елкин: дизайн праймеров для анализа микроРНК;
 Д.М. Силантьева: выделение ЭКВ, постановка ОТ-ПЦР;
 Е.М. Чевкина: идея, разработка дизайна исследования, руководство проектом, анализ литературы и полученных результатов, научное редактирование.

ORCID of authors/ ORCID авторов

G.O. Skryabin: <https://orcid.org/0000-0002-4127-6973>
 A.A. Beliaeva: <https://orcid.org/0000-0002-9364-562X>
 A.D. Enikeev: <https://orcid.org/0000-0002-7628-8616>
 D.V. Bagrov: <https://orcid.org/0000-0002-6355-7282>
 A.M. Keremet: <https://orcid.org/0009-0005-5399-914X>
 A.V. Komelkov: <https://orcid.org/0000-0003-0766-163X>
 D.S. Elkin: <https://orcid.org/0000-0002-4793-6063>
 D.M. Sylantjeva: <https://orcid.org/0009-0009-1536-5778>
 E.M. Tchekina: <https://orcid.org/0000-0001-8837-7969>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Funding. This research was funded by the Russian Scientific Foundation (grant No. 22-15-00373).

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00373).

Article submitted: 08.11.2023. **Accepted for publication:** 04.03.2024.

Статья поступила: 08.11.2023. **Принята к публикации:** 04.03.2024.

