

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



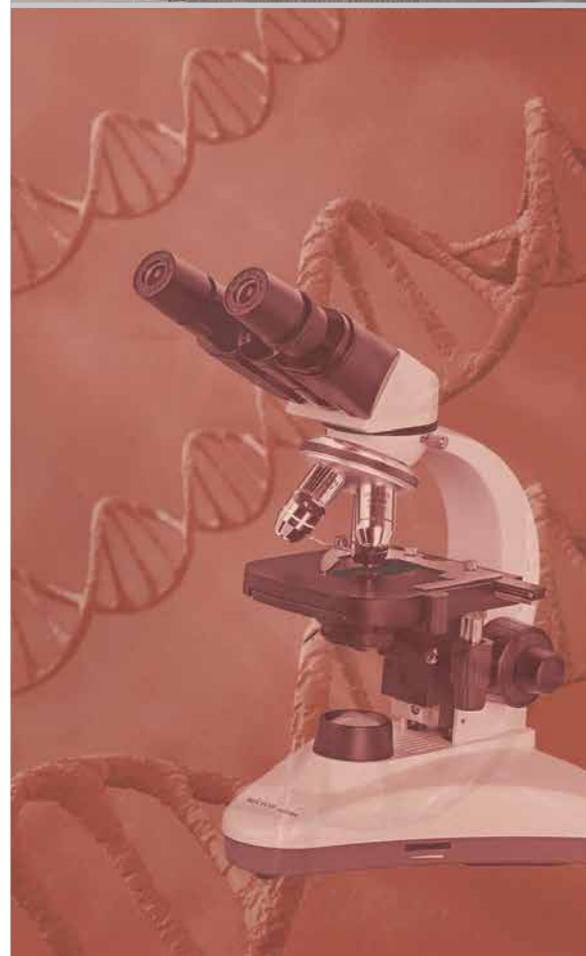
*Ингибиторы обратной транскриптазы
вирусов в онкологической практике*

*Молекулярные классификаторы
рака желудка*

*Экспрессия NOTCH1 и формирование
фенотипа опухолевых стволовых клеток*

*Молекулярно-генетические особенности
нейробластомы*

*Модуляция активности генов
гомологичной рекомбинации
в опухолевых клетках*

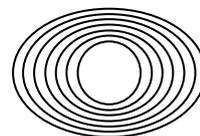


Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук. Журнал включен в Научную электронную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

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



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

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

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

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

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

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

2 ТОМ 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

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
www.abvpress.ru

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

Выпускающий редактор
И.В. Пучкова

Корректор Т.Н. Помилуйко

Дизайн Е.В. Степанова

Верстка Е.В. Степанова

Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, 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. № 2. 1–148.

© 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» Минздрав 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)

Зарилде 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)

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

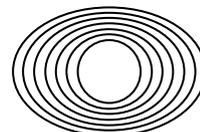
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

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

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

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

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



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

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

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

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

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

FOUNDED IN 2014

2^{VOL. 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
Kashirskoye 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 T. N. Pomiluiiko

Designer E.V. Stepanova
Maker-up 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
(PII 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. 2. 1–148.

© 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 Roentgenradiology 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)

Kzhyskovska, 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

При первичном направлении рукописи в редакцию в копии электронного письма должны быть указаны все авторы данной статьи. Обратную связь с редакцией будет поддерживать ответственный автор, обозначенный в статье (см. пункт 2).

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,
- адрес электронной почты.

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

Шрифт – Times New Roman, келья 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 отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле.

Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице.

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, онкогематология (ОГ)).

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.

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.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

<i>О.А. Власова, И.А. Антонова, Х.М. Магомедова, М.А. Усолкина, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, Т.Т. Валиев, М.Г. Якубовская</i>	
Потенциальные возможности использования в онкологии ингибиторов обратной транскриптазы вирусов	8
<i>Г.М. Волгарева</i>	
Наиболее распространенные формы рака и онкогенные папилломавирусы	29
<i>М.В. Немцова, А.Д. Молчанов, Е.Б. Кузнецова, И.В. Буре</i>	
Молекулярные классификации рака желудка и их клинический потенциал	40
<i>Н.В. Павлова, С.С. Дёмин, М.И. Чурносков, И.В. Пономаренко</i>	
Современный взгляд на роль генетических факторов в этиопатогенезе рака молочной железы	50
<i>Е.В. Дудкина, В.В. Ульянова, О.Н. Ильинская</i>	
Современные подходы к суицидальной генотерапии злокачественных новообразований	63
<i>Р.Г. Киямова, Р.А. Власенкова, Л.Ф. Булатова</i>	
Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b как мишень для таргетной терапии: особенности структуры, функции и экспрессии	74

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>В.Н. Кондратова, И.В. Ботезату, А.М. Строганова, С.Л. Дранко, А.В. Лихтенштейн</i>	
Гипометилирование <i>LINE-1</i> и гиперметилирование <i>HIST1H4F</i> как онкомаркеры в жидкостной биопсии колоректального рака	85
<i>М.В. Васильева, Н.В. Хромова, С.В. Бойчук, П.Б. Копнин</i>	
Влияние подавления экспрессии <i>NOTCH1</i> на формирование фенотипа опухолевых стволовых клеток рака легкого и толстой кишки человека	97
<i>Н.А. Андреева, Т.В. Шаманская, Д.Ю. Качанов, Р.Х. Абасов, Н.В. Гегелия, А.Е. Друй</i>	
Молекулярно-генетические особенности нейробластомы у пациентов подросткового возраста.	106
<i>М.М. Цыганов, А.А. Фролова, Е.А. Кравцова, И.А. Цыденова, М.К. Ибрагимова</i>	
Модуляция активности генов гомологичной рекомбинации в опухолевых клетках молочной железы в модели <i>in vitro</i>	116
<i>А.Р. Галембикова, П.Д. Дунаев, Т.В. Ивойлова, А.И. Гилязова, А.Э. Галяутдинова, Е.Г. Михеева, С.С. Зыкова, Н.М. Игидов, П.Б. Копнин, С.В. Бойчук</i>	
Деполимеризация тубулина как основной молекулярный механизм цитотоксической и противоопухолевой активности пирролсодержащих гетероциклических соединений.	130

REVIEWS

<i>O.A. Vlasova, I.A. Antonova, Kh.M. Magomedova, M.A. Usolkina, K.I. Kirsanov, G.A. Belitsky, T.T. Valiev, M.G. Yakubovskaya</i>	
Potential to use of viral reverse transcriptase inhibitors in oncology	8
<i>G.M. Volgareva</i>	
The most common forms of cancer and oncogenic papillomaviruses	29
<i>M.V. Nemtsova, A.D. Molchanov, E.B. Kuznetsova, I.V. Bure</i>	
Molecular classifications of gastric cancer and their clinical potential	40
<i>N.V. Pavlova, S.S. Dyomin, M.I. Churnosov, I.V. Ponomarenko</i>	
A modern view of the role of genetic factors in the etiopathogenesis of breast cancer	50
<i>E.V. Dudkina, V.V. Ulyanova, O.N. Ilinskaya</i>	
Modern approaches in suicidal gene therapy of malignant neoplasms	63
<i>R.G. Kiyamova, R.A. Vlasenkova, L.F. Bulatova</i>	
Sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b as a candidate for targeted therapy: features of structure, function, and expression	74

EXPERIMENTAL REPORTS

<i>V.N. Kondratova, I.V. Botezatu, A.M. Stroganova, S.L. Dranko, A.V. Lichtenstein</i>	
LINE-1 hypomethylation and HIST1H4F hypermethylation as oncomarkers in liquid biopsy of colorectal cancer	85
<i>M.V. Vasileva, N.V. Khromova, S.V. Boichuk, P.B. Kopnin</i>	
The effect of NOTCH1 knockdown on the phenotype of human lung and colon cancer stem cells	97
<i>N.A. Andreeva, T.V. Shamanskaya, D. Yu. Kachanov, R.Kh. Abasov, N.V. Gegeliya, A.E. Druy</i>	
Molecular genetic features of neuroblastoma in adolescent	106
<i>M.M. Tsyganov, A.A. Frolova, E.A. Kravtsova, I.A. Tsydenova, M.K. Ibragimova</i>	
Modulation of homologous recombination gene activity in breast tumor cells in an <i>in vitro</i> model.	116
<i>A.R. Galembikova, P.D. Dunaev, T.V. Ivoilova, A.I. Gilyazova, A.E. Galyautdinova, E.G. Mikheeva, S.S. Zykova, N.M. Igidov, P.B. Kopnin, S.V. Boichuk</i>	
Depolymerization of tubulin as the main molecular mechanism of the cytotoxic and antitumor activity of pyrrole-containing heterocyclic compounds	130

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-8-28>

Потенциальные возможности использования в онкологии ингибиторов обратной транскриптазы вирусов

О.А. Власова¹, И.А. Антонова¹, Х.М. Магомедова^{1,2}, М.А. Усолкина², К.И. Кирсанов^{1,3}, Г.А. Белицкий¹, Т.Т. Валиев^{1,4}, М.Г. Якубовская¹

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

²Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»; Россия, 119671 Москва, пр-кт Вернадского, 86;

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

⁴ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России; Россия, 119048 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Ольга Александровна Власова olya_vlasov@mail.ru

В работе проанализированы статьи, посвященные изучению функционирования фермента обратной транскриптазы эндогенных повторяющихся последовательностей LINE1, механизмов действия и противоопухолевой активности ингибиторов обратной транскриптазы вирусов, имеющиеся в информационных базах биомедицинской литературы SciVerse Scopus, PubMed, Web of Science и РИНЦ (Российский индекс научного цитирования). В обзоре использована информация 140 работ, 95 и 39 из которых были опубликованы в течение 10 и 3 последних лет соответственно; 2 работы представляют собой результаты клинических исследований, а в 45 описаны противоопухолевые свойства исследуемых соединений на различных моделях *in vitro* и *in vivo*.

Цель работы – на основании данных о функциональных свойствах фермента обратной транскриптазы эндогенных повторяющихся последовательностей LINE1 (long interspersed nuclear elements 1) проанализировать потенциальную возможность использования в онкологии ингибиторов обратной транскриптазы вирусов, представив их классификацию и основные механизмы действия.

Около 98 % генома человека составляют повторяющиеся последовательности, в основном мобильные генетические элементы, активация которых приводит к повышению нестабильности генома. В их число входят длинные (LINE) и короткие (short interspersed nuclear element, SINE) повторяющиеся последовательности ДНК, занимающие около 45 % генома человека. Повышение уровня экспрессии этих последовательностей в геноме выявлены при многих формах злокачественных новообразований. Их транспозиция происходит благодаря экспрессии кодируемой LINE1 обратной транскриптазы, гомологичной обратной транскриптазе вирусов. К настоящему времени разработаны и успешно применяются в клинической практике ингибиторы обратной транскриптазы вирусов нуклеозидной и нунулеозидной структур. Эти препараты демонстрируют ингибирующее действие как на обратную транскриптазу LINE1, так и на теломеразу, которая обеспечивает способность опухолевой клетки преодолевать репликативное старение. Благодаря этим свойствам, данные соединения, как ожидается, должны проявлять собственную противоопухолевую активность и повышать чувствительность опухолевых клеток к проводимой терапии злокачественных новообразований, что экспериментально подтверждается на моделях злокачественных новообразований *in vitro* и *in vivo*. Таким образом, использование в комбинированной терапии ингибиторов обратной транскриптазы представляется целесообразным как для предотвращения дальнейших перестроек генома, вызываемых LINE1, так и для подавления выживаемости опухолевых клеток путем ингибирования теломеразной активности.

Ключевые слова: ингибиторы обратной транскриптазы, обратная транскриптаза, длинные диспергированные повторы LINE1, ингибиторы теломеразной активности

Для цитирования: Власова О.А., Антонова И.А., Магомедова Х.М. и др. Потенциальные возможности использования в онкологии ингибиторов обратной транскриптазы вирусов. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):8–28.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-8-28>

Potential to use of viral reverse transcriptase inhibitors in oncology

O.A. Vlasova¹, I.A. Antonova¹, Kh.M. Magomedova^{1,2}, M.A. Usolkina², K.I. Kirsanov^{1,3}, G.A. Belitsky¹, T.T. Valiev^{1,4}, M.G. Yakubovskaya¹

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

²M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University; 86 Vernadsky Prospekt, Moscow 119671, Russia;

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

⁴Sechenov University, Ministry of Health of Russia; Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119048, Russia

Contacts: Olga Aleksandrovna Vlasova olya_vlasov@mail.ru

In preparing the review, articles on the functioning of the reverse transcriptase enzyme of endogenous repeat sequences LINE1, the mechanisms of action and antitumor activity of viral reverse transcriptase inhibitors. Articles available in the biomedical literature information databases SciVerse Scopus, PubMed, Web of Science, Russian Science Citation Index (RSCI) were analyzed. The review used information from 140 publications, of which 95 and 39 were published, respectively, over the last ten and three years, 2 articles present the results of clinical studies, and 45 articles refer to results demonstrating the anticancer properties of the studied compounds in various models *in vitro* and *in vivo*.

Aim. Based on data on the functional properties of the reverse transcriptase enzyme of endogenous repeat sequences LINE1 (long interspersed nuclear elements 1), analyze the potential use of viral reverse transcriptase inhibitors in oncology, presenting their classification and main mechanisms of action.

About 98 % of the human genome consists of repetitive sequences, most of which are represented by mobil genetic elements, the activation of which leads to increased genome instability. These include long (LINE) and short (SINE) interspersed nuclear element repeated DNA sequences interspersed nuclear elements, respectively, which occupy about 45 % of the human genome. Increased expression levels of these sequences in the genome have been identified in many forms of malignant neoplasms. Their transposition occurs due to the expression of LINE1-encoded reverse transcriptase, which is homologous to viral reverse transcriptase. To date, reverse transcriptase inhibitors of viruses of nucleoside and non-nucleoside structure have been developed and are successfully used in the clinic. These drugs demonstrate an inhibitory effect on both LINE1 reverse transcriptase and telomerase, which provides the tumor cell with the ability to overcome replicative senescence. Due to these properties, these compounds are expected to exhibit both their own antitumor activity and increase the sensitivity of tumor cells to the therapy of malignant neoplasms, which is experimentally confirmed in models of malignant tumors *in vitro* and *in vivo*. Use of reverse transcriptase inhibitors in combination therapy seems advisable both to prevent further genome rearrangements caused by LINE1 and to suppress the survival of tumor cells by inhibiting telomerase activity.

Keywords: reverse transcriptase inhibitors, reverse transcriptase, LINE1 long dispersed repeats, telomerase activity inhibitors

For citation: Vlasova O.A., Antonova I.A., Magomedova Kh.M. et al. Potential to use of viral reverse transcriptase inhibitors in oncology. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(2):8–28. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-8-28>

ВВЕДЕНИЕ

Традиционные методы терапии злокачественных новообразований (ЗНО) основаны либо на общем цитотоксическом влиянии на опухолевые клетки, либо на целевом воздействии препаратов на таргетные онкогенные белки-мишени. Совершенствование механизма действия противоопухолевых цитостатиков позволило излечить большое число пациентов и продлить жизнь многим больным, а включение таргетных препаратов, мишенями которых являются опухолеспецифичные белки, такие как BCR-ABL (хронический миелолейкоз), рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) (рак молочной железы), рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) (колоректальный рак, немелкоклеточный рак легкого), BRAF (меланома, гистиоцитоз из клеток Лангерганса), ALK (немелкоклеточный рак легкого),

в схемы противоопухолевого лекарственного лечения позволило успешно ввести в клиническую практику персонализированный подход к терапии ЗНО [1]. Однако, несмотря на расширение наших представлений о молекулярных основах онкогенеза, поиск общих невыявленных механизмов в развитии онкогенных событий при ЗНО все еще продолжается.

В рамках проекта «Атлас опухолевого генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA), направленного на системное секвенирование геномов при первичных онкологических заболеваниях, предприняты попытки выявить в опухолевых клетках мутационные события для использования этой информации в качестве основы для разработки эффективных универсальных методов лечения. Однако анализ данных глубокого секвенирования геномов этих клеток не обнаружил универсальных драйверных мутаций. Вместо этого были охарактеризованы весьма гетерогенные ландшафты

молекулярных изменений, что бросило вызов универсальности мутационной теории канцерогенеза [2]. Оказалось, что мутации, традиционно связываемые с канцерогенезом, обнаруживаются в различных тканях здоровых людей, включая кожу [3], пищевод [4], толстую кишку [5], головной мозг [6] и др. [7].

Проекты по глобальному анализу функционирования клетки в норме и при патологии позволили получить огромное количество новых данных и радикально изменили традиционный взгляд на функционирование генома. В рамках проекта «Энциклопедия элементов ДНК» (ENCODE) впервые было показано, что в клетке лишь чуть более 1 % генома транскрибируется с образованием матричных РНК (мРНК), кодирующих белки, тогда как большая часть транскрипта представлена некодирующими РНК, среди которых удалось выявить ключевые регуляторы экспрессии определенных генов, вовлеченных в онкогенез, а также РНК, транскрибируемых из областей повторяющихся последовательностей ДНК [8]. В рамках этого проекта посредством углубленного исследования характеристик доменов генома, ассоциаций транскрипционных факторов, структуры хроматина и модификации гистонов идентифицированы эпигенетические регуляторы транскрипции при ЗНО [9]. На основе полученных данных, в свою очередь, возникло представление о том, что ключевые признаки опухолевой клетки [10] могут быть сформированы и в результате изменений эпигенетической регуляции транскрипции [11] при отсутствии генетических нарушений. Помимо этого, тот факт, что изменения фенотипов метастазирующих опухолевых клеток зачастую обратимы, подразумевает вовлеченность эпигенетических механизмов, которые не влияют на первичные последовательности ДНК, но запускают обратимые изменения, такие как посттрансляционные модификации белков сигнальных каскадов, модификации ДНК и хроматина, определяющие транскриптом клетки [12]. В соответствии с этим измененная экспрессия или дисфункция модификаторов и ремоделеров хроматина встречается при самых разных видах ЗНО, что позволяет предположить большую роль эпигенетических изменений в их патогенезе [9].

Таким образом, результаты полногеномного секвенирования опухолевых и нормальных клеток пациентов с различными ЗНО позволяют предположить, что дисрегуляция эпигенома может лежать в основе как генеза опухоли, так и опухолевой прогрессии, даже при отсутствии на начальных стадиях вклада генетических нарушений. Понимание закономерностей эпигенетической регуляции экспрессии генов и ее роли в канцерогенезе открыло путь к формированию концепции эпигенетической терапии и разработке новых эпигенетических препаратов для препятствия опухолевой прогрессии с помощью цитостатических/дифференцирующих подходов, дополняющих традиционные методы химиотерапии [13]. В настоящее время эпигенетическая терапия применяется в лечении

острых миелоидных лейкозов [14]; также разрабатываются эпигенетические препараты для лечения солидных опухолей [15].

Одним из ключевых участников эпигенетической регуляции функционирования всего генома являются некодирующие РНК (нкРНК), которые составляют большую часть транскрипта клеток и вовлечены в регуляцию многих процессов клеточной жизнедеятельности и функционирования [16]. В то же время активация экспрессии нкРНК, включая микроРНК (миРНК) и длинные некодирующие РНК (днРНК), а также РНК-интермедиаты мобильных генетических элементов, может вызывать нестабильность генома, что способствует прогрессии опухоли. При этом факторы генетической нестабильности, обуславливающие грубые геномные перестройки, могут иметь даже более высокую прогностическую значимость по сравнению с точечными генетическими мутациями [2]. Влияние ретротранспозонов на стабильность генома реализуется благодаря экспрессии кодируемой ими обратной транскриптазы (ОТ) — фермента, обеспечивающего синтез ДНК на матрице РНК. Аналогичный фермент закодирован в геноме РНК-содержащих вирусов, что открывает возможность использования в онкологии антивирусных препаратов, действие которых основано на ингибировании ОТ.

В данном обзоре представлен анализ основных типов повторяющихся последовательностей ДНК в геноме человека, особое внимание уделено ретротранспозонам, которые содержат как некодирующую часть, так и открытые рамки считывания для белков, выполняющих роль шаперонов, эндонуклеазы и ОТ. Также описаны изменения в ретротранспозиции и экспрессии ОТ ретротранспозонов при ЗНО, рассмотрена возможность их использования в качестве прогностических маркеров и мишени химиотерапии, приведены современная классификация ингибиторов ОТ и результаты их воздействия на опухолевые клетки.

Цель работы — на основании данных о функциональных свойствах фермента ОТ эндогенных повторяющихся последовательностей LINE1 (long interspersed nuclear elements 1) проанализировать потенциальную возможность использования в онкологии ингибиторов ОТ вирусов, представив их классификацию и основные механизмы действия.

ПОВТОРЯЮЩИЕСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК

Значительная часть генома включает различные семейства ретротранспозонов, которые являются основным источником структурных и функциональных геномных вариаций и все чаще признаются регуляторами геномных функций. Более того, подавляющее большинство всех геномных изменений, с которыми связывают происхождение человека, возникли в регионах, где не происходит транскрипция мРНК [17]. На сегодняшний день идентифицированы около 3000 таких участков [18], представляющих собой пул кандидатов,

среди которых проводится поиск регуляторных регионов со специфичной для человека активностью.

Геном человека содержит 4 основных семейства ретротранспозонов: 1) LTR-ретротранспозоны – длинные концевые повторы (long terminal repeats); 2) LINE1 – длинные диспергированные повторы 1 (long interspersed nuclear elements 1); 3) Alu – короткие диспергированные повторы (short interspersed nuclear element, SINE), содержащие последовательность распознавания рестриктазы AluI; 4) SVA (SINE-VNTR-Alu) – короткие диспергированные повторы, включающие варьируемое число тандемных повторов (VNTR) и последовательность Alu. В совокупности эти семейства составляют около 45 % генома человека [19]. С точки зрения эволюции и структурной гетерогенности ретротранспозоны могут быть разделены на LTR-содержащие (в том числе эндогенные ретровирусы) и не содержащие LTR (non-LTR ретротранспозоны) [20]. Non-LTR ретротранспозоны отличаются тем, что они обратно транскрибируют свои РНК в ядре, используя никированную геномную ДНК в качестве праймеров для запуска ОТ. К ним относятся LINEs, обычно встречающиеся у позвоночных [21], специфичные для приматов Alu-элементы, семейство повторяющихся последовательностей, занимающих не менее 3 % их генома и присутствующих в нескольких сотнях тысяч копий [22], и специфичные для гоминидов составные ретротранспозоны SVA [23].

Alu и LINE1 являются крупнейшими подсемействами ретротранспозонов, составляющими около 10 и 17 % генома человека соответственно [24]. Элементы LINE1 кодируют собственную ОТ – фермент, выполняющий ретротранскрипцию и, следовательно, РНК-зависимую мобилизацию как LINE1, так и неавтономных Alu и SVA. Несмотря на это, распределение LINE1, Alu и SVA рибонуклеопротеида в клетке, динамика ретротранспозиции в геноме и характер транспозиций данных ретротранспозонов различаются [25]. Семейство LINE1 насчитывает около 500 тыс. последовательностей, подавляющее большинство которых усечены и не способны к ретротранспозиции; только субпопуляция из 80–100 копий LINE1 является полноразмерной и ретротранспозиционно компетентной [26].

Семейства Alu и LINE1 влияют на изменения в транскрипции генома. Во многих исследованиях подчеркивается роль обоих семейств в канцерогенезе [27, 28]. Ретротранспозиции LINE1 являются основной причиной перестройки генома с потенциальными мутагенными эффектами [29]. Так, LINE1 могут являться потенциальными драйверами онкогенеза, вызывать трансформацию клетки [30] или оказывать существенное воздействие на процесс канцерогенеза [31], влияя на экспрессию близлежащих генов [32]. У 53 % пациентов с ЗНО имеется хотя бы одно соматическое событие ретротранспозиции LINE1; чаще всего транспозиции происходят при раке толстой кишки (93 %) и легкого (75 %).

Массивное гипометилирование LINE1 считается признаком большинства трансформированных клеток и часто наблюдается при канцерогенезе, поскольку оно приводит к реактивации ретроэлементов и последующей геномной нестабильности [33]. Геномная нестабильность и метаболическое перепрограммирование являются характерными признаками опухолевых клеток и способствуют резистентности клеток к применяемым препаратам [34]. Геномная нестабильность определяется как повышенная частота точечных генных и геномных мутаций, накопление которых связано с увеличением повреждений ДНК за счет различных механизмов: снижения точности репликации и нарушения системы репарации, увеличения уровня активных форм кислорода и нарушения работы генов-супрессоров, позволяющих избежать активации апоптоза при выраженном повреждении генома клеток и активации эндогенных ретротранспозонов [34, 35]. При анализе паттернов и механизмов соматической ретротранспозиции 2658 геномов опухолей 38 нозологических форм ЗНО в рамках проекта Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes (PCAWG) было установлено, что нарушения ретробиома представляют собой частое явление при различных вариантах ЗНО, которое, вероятно, служит следствием глобального эпигенетического перепрограммирования в опухолевых клетках [36]. При aberrантных интеграциях LINE1 может происходить удаление целых областей хромосом, что приводит к сложным транслокациям и крупномасштабным перестройкам, а иногда – к потере генов-супрессоров опухолевого роста. Соматические ретротранспозиции также способны инициировать циклы разрывов и негомологичного воссоединения концов (non-homologous end joining, NHEJ), что зачастую вызывает активную амплификацию онкогенов [36].

Количество исследований, указывающих на инсерции LINE1 при широком спектре клеточных аномалий и патологий, в том числе ЗНО, постоянно увеличивается [37]. Были идентифицированы и картированы характерные инсерции LINE1 в геномах клеток рака легкого [38], колоректального рака [39], рака пищевода [40], поджелудочной железы [41], желудка [42], яичников [43], в глиобластомах, множественной миеломе [44] и гепатобластомах [45].

АКТИВАЦИЯ ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

Процесс регуляции активности LINE1 в процессе канцерогенеза сложен. В нормальных клетках существуют механизмы контроля активности экспрессии LINE1 на всех стадиях процесса ретротранспозиции: 1) с помощью метилирования ДНК, влияющей на их доступность для ферментов биосинтеза нуклеиновых кислот; 2) путем внесения посттрансляционных модификаций гистонов и формирования зон гетеро-

хроматина; 3) с помощью посттранскрипционной деградации новых копий РНК LINE1; 4) путем ингибирования трансляции ORF1 и ORF2; 5) за счет связывания LINE1 рибонуклеопротеида и блокирования их транспортировки в ядро; 6) с помощью репарации ДНК на этапе интеграции новой копии элемента LINE1 в геном [46].

Кроме того, многокомпонентная система контроля экспрессии последовательностей РНК-транскриптов LINE1 может включать механизмы компартиментализации ядра, в том числе структурные изменения состояния хроматина на различных уровнях. Так, было показано, что нокдаун линкерных гистонов, приводящий к комбинированному истощению вариантов H1.2 и H1.4, сопровождается повышением экспрессии LINE1 и приводит к активации интерферона (IFN) 1-го типа, о чем свидетельствует активация многих IFN-стимулируемых генов (ISG). Нокдаун H1.2 и H1.4 также способствует появлению сайтов доступности по всему геному, особенно в сателлитах и других повторяющихся последовательностях, из-за чего ответ IFN связывают с экспрессией РНК-интермедиатами ретротранспозонов, находящихся в гетерохроматине [47]. Примечательно, что в целом районы, обогащенные линкерными гистонами H1, характерные для областей гетерохроматина, также значительно перекрываются с повторяющимися последовательностями, включая LINE, SINE и повторы, содержащие эндогенные ретровирусы ERV [48]. Данные события приводят к крупномасштабным перестройкам в геноме, когда в ядре клетки появляется 2000 новых РНК-транскриптов, которые служат матрицей для их же ОТ. В результате резко увеличивается геномная нестабильность, возникают делеции, транслокации, инсерции и амплификации.

Еще одним важнейшим фактором контроля экспрессии РНК-транскриптов из областей повторяющихся последовательностей является эпигенетическая регуляция. Посттрансляционные модификации гистонов H4K20me3 и H3K9me3, по-видимому, играют очень большую роль в подавлении экспрессии ретротранспозонов, о чем свидетельствуют высокий уровень активации ретротранспозиции при нокдауне специфических гистоновых метилтрансфераз и индукция экспрессии мутантных гистонов H3.1K9R и H4K20R, являющихся неметилируемыми [49]. Была показана корреляция посттрансляционных модификаций H3K9me3 как с областями конститутивного гетерохроматина, содержащими основные сателлитные повторяющиеся последовательности и эндогенные ретровирусы, так и с эухроматином, включающим способные к ретротранспозиции полноразмерные LINE1 [50]. Происходящие события способствуют повышению частоты генетических перестроек.

Таким образом, эпигенетические активаторы транскрипции, такие как ингибиторы гистоновых деацетилаз и ДНК-метилтрансфераз, одобренные для использования в лечении ЗНО человека [51, 52], требуют

дополнительных исследований с целью выяснения всех последствий их активирующего воздействия на экспрессию LINE1. Интересно, что ингибиторы PARP, применяемые в терапии рака молочной железы, яичников, меланомы, немелкоклеточного рака легкого и глиобластомы [53], могут, напротив, помимо непосредственного воздействия на процессы репарации ДНК в опухолевых клетках опосредованно снижать активность ретротранспозиции LINE1 [46].

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПТАЗА – ПЕРСПЕКТИВНАЯ МИШЕНЬ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Ретротранспозоны LINE1 содержат гены двух белков: ORF1p, выполняющего функции шаперона РНК-интермедиатов LINE1 во время цикла ретротранспозиции [54], и ORF2p, который обладает эндонуклеазной и обратнотранскриптазной активностями, необходимыми для инсерции LINE1 в геном. ORF2p транслируется посредством нетрадиционного механизма терминирования/повторной инициации, что ограничивает его экспрессию относительно ORF1p [55]. Соотношение белков ORF2p и ORF1p составляет 1:27 [56].

В течение цикла ретротранспозиции ORF1p и ORF2p связывают РНК, транскрибируемую с LINE1 в цитоплазме, образуя рибонуклеопротеиновый комплекс (рибонуклеопротеид). Затем рибонуклеопротеид транспортируется из цитоплазмы в ядро посредством недостаточно изученного механизма. В ядре ORF2p вносит одноцепочечный разрыв в геномной ДНК с вырожденной консенсусной последовательностью (например, 5'-TTTT/A-3' или вариантами этой последовательности) с помощью эндонуклеазного домена [57]. Полученная 3'-гидроксильная группа используется доменом ОТ ORF2p для запуска синтеза комплементарной ДНК (кДНК) LINE1, который обычно начинается на 3'-поли(А)- последовательности РНК LINE1 [40], что и создает возможность инсерции LINE1 путем целевой праймированной обратной транскрипции [58].

Гиперэкспрессия ORF1p выявлена в опухолях толстой кишки, почек, печени, легких, молочной железы, поджелудочной железы, лимфомах и злокачественных герминогенных опухолях у детей [59]. Транскриптомный анализ клеток различных карцином, сарком и культивируемых *in vitro* линий лейкозов позволил обнаружить мРНК ORF2p [60, 61], при этом в транскриптомах нормальных клеток она отсутствовала. Активация экспрессии ORF2p продемонстрирована иммуногистохимически в опухолях желудка и их метастазах в лимфатические узлы [62], а также в опухолях молочной железы [63]. При этом ядерная локализация ORF1p и ORF2p коррелировала со снижением показателей общей выживаемости больных [63]. Ранняя экспрессия ORF2p и увеличение его количества с прогрессией опухоли, а также ядерная локализация белка были продемонстрированы на модели рака молочной железы на Р_у-MMTV трансгенных мышях [64]. Однако

выявление белка ORF2p является сложной задачей в силу ряда обстоятельств, что привело к некоторой противоречивости результатов исследований, посвященных анализу экспрессии этого белка. Интересно, что экспрессия ORF2p обнаружена и при гиперплазии толстой кишки и простаты, что хорошо коррелировало с ранним появлением массивного геномного гипометилирования и активацией экспрессии ретротранспозонов [65].

Активация ОТ LINE1, т. е. ORF2p, сопровождается не только повышением нестабильности генома за счет транспозиции ретроэлементов и нарушением регуляции функционирования генома некодирующими РНК в связи с образованием гетеродуплексов РНК/ДНК [66], но и синтезом теломерных последовательностей, обеспечивающим иммортализацию клеток [67]. Так, нокдаун LINE-1 в опухолевых клетках коррелировал с уменьшением длины теломер и снижением теломеразной активности. Вышеописанные эффекты активации ORF2p являются проканцерогенными, приводящими к более быстрому развитию рецидивов. Применение ингибиторов ОТ LINE1 на мышиной модели рака молочной железы продемонстрировало их противоопухолевое действие, причем прекращение воздействия ингибиторов приводило к возобновлению роста опухоли [68].

Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют, что активация ОТ LINE1 является характерным признаком многих вариантов ЗНО, независимо от их гистологического происхождения; при подавлении экспрессии LINE1 или ингибировании их ОТ наблюдался противоопухолевый эффект. В целом эти данные позволяют рассматривать ОТ LINE1 в качестве универсальной терапевтической мишени при различных неоплазиях человека.

В настоящее время трехмерная структура ORF2p еще не описана, так как очистка этого белка человека является чрезвычайно сложной задачей [58], что препятствует получению данных о специфичности структур молекул, которые потенциально могут связывать каталитический домен фермента. Необходимы дополнительные исследования для получения надежной 3D-структуры ORF2p млекопитающих, что может стать основой для разработки сильнодействующих и высокоспецифичных ингибиторов этого белка. Активные LINE1 человека высококонсервативны (на 99,99 % идентичны на уровне нуклеотидов) [26]. Это позволяет предположить, что ингибиторы ORF2p будут эффективно подавлять ретротранспозицию любого человеческого LINE1, присутствующего в геноме всех клеток организма, в том числе опухолевых.

В последние годы разработан ряд противовирусных препаратов, действие которых направлено на ингибирование вирусной ОТ. Анализ эффектов этих лекарственных средств на опухолевые клетки свидетельствует о перспективности их использования в качестве ингибиторов ОТ LINE1 при лечении ЗНО.

ИНГИБИТОРЫ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ

Классификация и основные механизмы действия.

К 2016 г. для борьбы с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) в качестве терапевтических антивирусных препаратов Управление по санитарному контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) одобрило около 30 препаратов [69], среди которых большая часть была представлена ингибиторами ОТ (ИОТ) – ключевого фермента репликации ВИЧ. Обычно эти лекарственные средства применяют в комбинации с другими противовирусными препаратами. Высокоактивная антиретровирусная терапия включает не менее 3 препаратов, влияющих одновременно на несколько стадий жизненного цикла ВИЧ. Ингибиторы ОТ вирусов делятся на 2 основных класса: нуклеотидные/нуклеозидные и нуклеозидные ИОТ. В 2016 г. одобрены такие лекарственные средства, как азвудин, тенофовира алафенамид фумарат, доравирин, элсульфавирин и дапивириин (табл. 1) [70].

Нуклеозидные/нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы. Нуклеозидные/нуклеотидные ИОТ (НИОТ) в организме метаболизируются до активных производных – дифосфатов или трифосфатов. Они действуют как антиметаболиты, поскольку похожи на нуклеотиды, от которых отличаются лишь небольшим изменением в структуре рибозы, и могут быть включены в синтезируемые нити ДНК. Встраивание НИОТ в цепь ДНК приводит к прекращению ее синтеза из-за неспособности этого соединения образовывать фосфодиэфирную связь за счет структурных особенностей рибозы [71]. Таким образом, они действуют как терминаторы цепи, конкурентно блокируя фермент вируса обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы α , β и γ вирусов ВИЧ, вируса гепатита В и гепатита С, цитомегаловируса, вируса ветряной оспы (ГВЧ-3, герпесвирус человека 3-го типа) и простого герпеса.

Среди НИОТ выделяют группы аналогов нуклеотидов и нуклеозидов (см. табл. 1). В клинической практике принято использовать комбинации препаратов, являющихся аналогами различных нуклеотидов и нуклеозидов, поскольку препараты, представляющие собой аналоги одного и того же компонента биосинтеза нуклеиновой кислоты, конкурируют за включение в структуру биополимера.

Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы вирусов. Ненуклеозидные ИОТ (ННИОТ) вирусов представляют собой структурно разнообразное семейство соединений, которые характеризуются связыванием с ОТ в непосредственной близости от участка присоединения нуклеозидов, что опосредует изменение конформации и подвижности ОТ. Данные препараты напрямую и неконкурентно ингибируют ОТ, не нуждаясь во внутриклеточной активации, в отличие от НИОТ [72]. К 1-му поколению ННИОТ

Таблица 1. Ингибиторы обратной транскриптазы (ОТ), одобренные Управлением по санитарному контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для применения в антиретровирусной терапии

Table 1. Reverse transcriptase (RT) inhibitors approved by the Food and Drug Administration for use in antiretroviral therapy

Особенности структуры Structure peculiarities	Препарат Drug	Год одобрения Year of approval
Нуклеозидные ингибиторы ОТ вирусов Nucleoside RT inhibitors of viruses		
Аналоги нуклеотида/нуклеозида: Nucleotide/nucleoside analogues: аденин adenine	Адефовир Adefovir	2002
	Тенофовира дизопроксил фумарат Tenofovir disoproxil fumarate	2001
	Тенофовира алафенамид фумарат Tenofovir alafenamide fumarate	2016
урацил uracil	Софосбувир Sofosbuvir	2013
тимин thymine	Фосфазид Phosphazide	1999
аденозин adenosine	Диданозин Didanosine	2000
	Ислатравир* Islatravir*	—
уридин uridine	Фиалуридин** Fialuridine**	—
тимидин thymidine	Зидовудин Zidovudine	1987
	Ставудин*** Stavudine***	1994
	Телбивудин*** Telbivudine***	2006
	Клевудин* Clevudine*	2006
цитидин cytidine	Зальцитабин** Zalcitabine**	1992
	Ламивудин Lamivudine	1995
	Эмтрицитабин Emtricitabine	2003
	Рацивир* Racivir*	—
	Азвудин Azvudine	2021
гуанозин guanosine	Абакавир Abacavir	1998
	Энтекавир Entecavir	2008

Окончание табл. 1
End of table 1

Особенности структуры Structure peculiarities	Препарат Drug	Год одобрения Year of approval
Ненуклеозидные ингибиторы ОТ вирусов Non-nucleoside viral RT inhibitors		
Малые молекулы, взаимодействующие с активным центром ОТ вирусов и конкурентно ингибирующие синтез ДНК Small molecules interacting with the active center of reverse transcriptase of viruses, competitively inhibiting DNA synthesis	Невапирин Nevapirin	1996
	Невапирин пролонг Nevapirin prolonged	2011
	Делавирдин Delavirdine	1997
	Эфавиренз Efavirenz	1998
	Этравирин Etravirine	2008
	Рилпивирин Ralpivirine	2011
	Доравирин Doravirine	2018
	Элсульфавирин Elsulfavirine	2017
	Дапивирин Dapivirine	2020

*Препараты, находящиеся на стадии клинических испытаний. **Препараты, изъятые из производства и продажи или исследования которых были прекращены. ***Препараты, которые применяют с осторожностью и лишь в случаях, когда другие антиретровирусные лекарственные средства неэффективны.
 *Drugs currently in clinical trial. **Drugs withdrawn from production and sale or whose research has been discontinued. ***Drugs used with caution and only in cases where other antiretroviral drugs are not effective.

относятся невапирин, эфавиренз и делавирдин, ко 2-му – этравирин, рилпивирин, доравирин и одобренный в России элсульфавирин [72].

Побочные эффекты применения ингибиторов обратной транскриптазы. В целом НИОТ довольно безопасны и хорошо переносятся пациентами, поскольку эукариотические ядерные ДНК-полимеразы, которые реплицируют и восстанавливают ядерную ДНК, слабее взаимодействуют с трифосфатами НИОТ, чем ОТ ВИЧ. Так, аффинность зидовудина к ОТ ВИЧ в 100 раз выше, чем к ДНК-полимеразе α [73], для эмтрицитабина также показано предпочтительное связывание именно с вирусной ДНК [74].

Однако препараты описываемой группы влияют на синтез митохондриальной ДНК (мтДНК), что опосредует их побочные эффекты. Нуклеозидные/нуклеотидные ИОТ трифосфаты ингибируют эукариотическую репликасу мтДНК – полимеразу ρI γ , что

приводит к истощению мтДНК, окислительному стрессу и ингибированию TERT (telomerase reverse transcriptase) в митохондриях с последующим угнетением костного мозга, лактат-ацидозом, полинейропатией, панкреатитом, липоатрофией, особенно при применении на ранних стадиях синдрома приобретенного иммунодефицита человека (СПИД) [75]. Кроме того, влияние на синтез мтДНК происходит за счет ингибирования тимидинкиназы 2-го типа (ТК-2) с последующим нарушением синтеза пиримидиновых нуклеотидов, необходимых для мтДНК [76]. Нарушения нормальной работы митохондрий, такие как окислительный стресс и дефекты мтДНК, могут наблюдаться у пациентов, получавших лечение по поводу ВИЧ-инфекции в течение десятилетий [77]. Эти изменения в метаболических процессах способны снижать жизнеспособность иммунных клеток и иммунные реакции [78].

Нуклеозидные/нуклеотидные ИОТ существенно отличаются друг от друга по выраженности токсического действия на митохондрии. Митохондриальная токсичность НИОТ возрастает следующим образом: зальцитабин = диданозин = фиалуридин = ставудин > ламивудин > тенофовир > зидовудин > карбовир [79]. Так, ингибирование мтДНК-полимеразы ρI γ зальцитабином опосредует периферическую нейропатию как побочный эффект. По этой причине в 2006 г. его использование было прекращено [75]. Токсический эффект клефудина, связанный с митохондриальной миопатией, также привел к прекращению исследований данного препарата [80]. Самое сильное повреждение митохондрий печени отмечено при использовании фиалуридина, который был отменен после нескольких смертельных исходов из-за печеночной недостаточности, лактат-ацидоза и панкреатита, возникших через 2–3 мес после начала терапии во время исследований фазы II на людях. Из-за высокой долгосрочной токсичности ставудин и диданозин применяют лишь в случаях, когда другие антиретровирусные препараты были испробованы и не показали значимых эффектов [81].

В то же время ряд НИОТ, проявляющих менее выраженное митохондриальное воздействие, можно включить в арсенал широко применяемых антиретровирусных средств: клинические испытания ислатравира в комбинации с доравирином или ламивудином демонстрируют выраженную противовирусную активность с легкими побочными эффектами [82]. Энтекавир и тенофовир показали минимальный риск развития лекарственной устойчивости у пациентов, ранее не принимавших аналоги нуклеозидов. Тенофовир также имеет очень низкий уровень лекарственной устойчивости у больных, которым были назначены аналоги нуклеозидов [83]. Из-за высокого уровня мутаций, опосредующих устойчивость к препаратам, а также частых нежелательных явлений, возникающих при лечении, ламивудин, адефовир и телбивудин в настоящее время не используют в качестве противовирусной терапии 1-й линии в соответствии с последними международными рекомендациями по лечению ВИЧ-инфекции [84].

Применение ННИОТ приводит к меньшим побочным эффектам, чем использование НИОТ в связи с высокой специфичностью к ОТ ВИЧ [72]. Однако взаимодействие ННИОТ и НИОТ с одним и тем же «карманом» активного центра фермента опосредует перекрестную резистентность к этим ингибиторам при наличии точечных мутаций фермента [85]. Наряду с этим гепатотоксичность препаратов 1-го поколения имеет более выраженный эффект по сравнению с препаратами 2-го поколения и обусловлена возникновением реакций гиперчувствительности и меньшим потенциалом индукции печеночных ферментов. Поэтому неврирапин и эфавиренз не рекомендуются на начальных этапах лечения ВИЧ. При применении эфавиренза у 48 % пациентов зафиксировано значительное

повышение уровня печеночных ферментов, тем не менее их продолжают использовать у некоторых больных со СПИДом в связи с высокой эффективностью, хорошим метаболическим профилем, удобством и низкой стоимостью [72]. Результаты использования ННИОТ 1-го поколения привели к разработке препаратов 2-го поколения, сохранение действия которых против ОТ с большинством точечных мутаций обусловлено подковообразной конформацией, являющейся более гибкой и позволяющей эффективнее связывать белок ОТ. При этом ННИОТ 2-го поколения обладают низкой гепатотоксичностью (1–4 % случаев).

Разработанные для комбинированной антивирусной терапии ИОТ были исследованы в отношении ингибирующего действия на синтез ДНК митохондрий моноцитов, поскольку эти клетки являются высокочувствительными к митохондриальной токсичности препаратов. Эфавиренз и абакавир вызывали значительную дисфункцию митохондрий моноцитов, в то время как эмтрицитабин, тенофовир и ламивудин не обладали таким побочным действием [86].

Действие ингибиторов на обратную транскриптазу LINE1. Клеточные фосфорилированные аналоги нуклеозидов ингибируют различные типы ретровирусных ОТ за счет конкурентного субстратного ингибирования и обрыва цепи удлиняющихся при обратной транскрипции кДНК. Таким образом, ингибирующая эффективность этих лекарственных средств зависит от активности их клеточного поглощения, фосфорилирования клеточными киназами, связывания с ОТ, определяющих интенсивность включения препарата в синтезируемую ДНК [87].

В многочисленных исследованиях показано, что некоторые ИОТ, используемые для лечения СПИДа, могут ингибировать мобилизацию ретротранспозонов дозозависимым образом. В частности, НИОТ, такие как зидовудин, ставудин, ламивудин, 2',3'-дидезоксицитидин-5'-трифосфат, а также ННИОТ эфавиренз и делавирдин способны ингибировать ОТ LINE1 человека в экспериментальных системах *in vitro* [88]. R. V. Jones и соавт. продемонстрировали, что ставудин, зидовудин, тенофовир и ламивудин ингибируют ретротранспозицию LINE1 на клетках HeLa, в то время как неврирапин — нуклеозидный аналог ОТ ВИЧ — не оказывает влияния на ретротранспозицию LINE1 [89]. В исследовании G. Banuelos-Sanchez и соавт. [90] проанализированы 33 аналога нуклеозидов на специфичность и ингибирующую способность в отношении активных LINE1 человека и мыши, а также активных эндогенных ретровирусов мыши. Значительное ингибирование ретротранспозиции LINE1 человека показали зидовудин, эмтрицитабин, ламивудин, ставудин, неврирапин, тенофовир и абакавир. Интересно, что в другой работе продемонстрировано увеличение экспрессии мРНК LINE1 ORF1 и ORF2 клетках линий рака предстательной железы PC3 и LNCaP при использовании абакавира [91].

Активация ретротранспозонов не только способствует росту генетической нестабильности, но и приводит к хроническому воспалению, связанному со старением, а применение НИОТ способно подавлять LINE1-опосредованное воспаление. У мышей с дефицитом белка SIRT6, являющихся моделью преждевременного старения, наблюдалось повышение уровня содержания цитоплазматической кДНК LINE1, вызывавшей активацию интерферона 1-го типа. Применение НИОТ, а именно ламивудина и ставудина, которые ингибируют ретротранспозицию LINE1, значительно повышало продолжительность жизни мышей с инактивацией гена *SIRT6* нокаутом и полностью восстанавливало LINE1-индуцируемую активацию интерферона 1-го типа в дополнение к значительному снижению маркеров повреждения ДНК – двунивых разрывов, фокусов γ H2AX и 53BP1 [92].

Принципиальная возможность использования НИОТ для профилактики нестабильности генома, вызванной LINE1, продемонстрирована ранее в модели ОТ-опосредованных ретротранспозиций перичентромерных повторов ДНК [93].

Противоопухолевая активность ингибиторов обратной транскриптазы вирусов. Использование большей части рассмотренных ИОТ приводит к подавлению

роста опухолевых клеток за счет ингибирования пролиферации, повышения клеточной адгезии и снижения миграционной активности, а также остановки клеточного цикла, индукции апоптоза и дифференцировки опухолевых клеток (табл. 2). Кроме того, некоторые ИОТ повышают чувствительность опухолевых клеток к химиотерапии/лучевой терапии (см. табл. 2). Согласно данным последних работ с применением метаанализа, НИОТ, такие как энтекавир и тенофовир, могут быть использованы для профилактики гепатоцеллюлярной карциномы у пациентов с гепатитом В и С [94]. Эфавиренз успешно прошел II фазу клинических испытаний по оценке эффективности и безопасности при метастатическом кастрационно-резистентном раке предстательной железы [95]. В ходе доклинических исследований установлена эффективность ламивудина на моделях колоректального рака с мутацией в гене *P53* [96]. На основании этих результатов начаты клинические исследования противоопухолевого действия данного препарата, и в настоящее время проходит II фаза клинических испытаний противоопухолевого эффекта этого препарата у пациентов с метастатическим колоректальным раком с мутацией в гене *P53* [96].

Таблица 2. Противоопухолевая активность ингибиторов обратной транскриптазы

Table 2. Antitumor activity of reverse transcriptase inhibitors

Препарат Drug	Эффект Effect	Продemonстрированное влияние Description of demonstrated impact	Использованная модель Model used	Источник Source
Нуклеозидные/нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы Nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors				
Адефовир Adefovir	Противо- опухолевый эффект Anticancer effect	Ингибирование пролиферации клеток и остановка клеточного цикла в фазе G2 Inhibition of cell proliferation and cell cycle arrest in G2 phase	Линии клеток рака толстой кишки HCT116 и HT29 Colon cancer cell lines HCT116 and HT29	[97]
	Сенсибилизация к химиотерапии Sensitization to chemotherapy	Сенсибилизация резистентных клеток рака толстой кишки и опухолевых ксенотрансплантатов к ингибитору BRAF-киназы вемурафенибу Sensitization of resistant colon cancer cells and tumor xenografts to the BRAF kinase inhibitor vemurafenib	Линии рака толстой кишки HCT116 и HT29. Мышиная модель ксенографта клеток рака толстой кишки HCT116 и HT29 Colon cancer lines HCT116 and HT29. Mouse xenograft model of HCT116 and HT29 colon cancer cells	[97]
Тенофовир Tenofovir	Противо- опухолевый эффект Anticancer effect	Сильное цитотоксическое действие Strong cytotoxic effect	Линия клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 Breast adenocarcinoma cell line MCF-7	[98]
		Ингибирование пролиферации клеток, индукция окислительного стресса и воспаления Inhibition of cell proliferation, induction of oxidative stress and inflammation	Крысиная модель индуцированного колоректального рака, вызванного 1,2-диметилгидразином или диетой с высоким содержанием жиров Rat model of 1,2-dimethylhydrazine- or high-fat diet-induced colorectal cancer	[99]

Продолжение табл. 2

Continuation of table 2

Препарат Drug	Эффект Effect	Продемонстрированное влияние Description of demonstrated impact	Использованная модель Model used	Источник Source
		Противоопухолевый эффект, снижение уровня маркеров окислительного стресса и сигнальных белков Notch (Notch1, JAG1 и HES1), ингибирование пролиферации (оцениваемой по уровню циклин-D1 и Ki-67), индукция апоптоза и аутофагии Anticancer effect, reduction in the level of oxidative stress markers and Notch signaling proteins (Notch1, JAG1 and HES1), inhibition of proliferation (assessed by the level of cyclin D1 and Ki-67), induction of apoptosis and autophagy	Мышиная модель индуцированной 7,12-диметилбенз(а)антраценом карциномы молочной железы Mouse model of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinoma	[100]
Софосбувир Sofosbuvir	Проканцерогенное действие Procarcinogenic effect	Активация пролиферации и миграции клеток Activation of cell proliferation and migration	Линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы OR-6 и Huh 7.5.1 Hepatocellular carcinoma cell lines OR-6 and Huh 7.5.1	[101]
Диданозин Didanosine	Противоопухолевый эффект Anticancer effect	Индукция значительного укорочения теломер, накопления γ H2AX, фосфорилирования p53 и апоптоза клеток при длительном совместном применении с низкими дозами зидовудина Induction of significant telomere shortening, γ H2AX accumulation, p53 phosphorylation and cell apoptosis during long-term co-incubation with low doses of zidovudine	Линии опухолевых клеток HCT-116, SkMel-28, MelJuso и Jurkat Tumor cell lines HCT-116, SkMel-28, MelJuso and Jurkat	[102]
		Трансплацентарная онкогенность: повышение риска развития рака головного мозга у детей Transplacental oncogenicity: increased risk of brain cancer in children	Эпидемиологические наблюдения за пациентами с синдромом приобретенного иммунного дефицита Epidemiological surveillance in patients with acquired immune deficiency syndrome	[103, 104]
Зидовудин Zidovudine	Сенсибилизация к радиационному облучению и γ -излучению Sensitization to radiation exposure and γ radiation	Увеличение радиационно-индуцированных повреждений ДНК, индукция апоптоза, ингибирование теломеразной активности Increased radiation-induced DNA damage, induction of apoptosis, inhibition of telomerase activity	Линии клеток плоскоклеточного рака пищевода Eca109 и Eca9706 Esophageal squamous cell carcinoma cell lines Eca109 and Eca9706	[105]
		Ингибирование активности теломеразы Inhibition of telomerase activity	Линия клеток злокачественной глиомы человека U251 Human malignant glioma cell line U251	[106]
	Увеличение цитотоксического эффекта при действии цисплатина Increased cytotoxic effect with cisplatin	Линии клеток меланомы человека Mel Juso, 518A2 и A375 Human melanoma cell lines Mel Juso, 518A2 and A375	[107]	
	Увеличение цитотоксического эффекта при действии 5-фторурацила Increased cytotoxic effect under the influence of 5-fluorouracil	Линия клеток колоректального рака человека HT-29 Human colorectal cancer cell line HT-29	[108]	
	Усиление антипролиферативного эффекта эфавиренза Enhanced antiproliferative effect of efavirenz	Линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 и колоректального рака HT29 Hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 and colorectal cancer HT29	[109]	
Противоопухолевый эффект Anticancer effect	Ингибирование клоногенности, пролиферативной активности и индукция апоптоза Inhibition of clonogenicity, proliferative activity and induction of apoptosis	Линии клеток аденокарциномы легкого A549 и гепатокарциномы HepG2 A549 lung adenocarcinoma and HepG2 hepatocarcinoma cell lines	[110]	

Продолжение табл. 2
Continuation of table 2

Препарат Drug	Эффект Effect	Продемонстрированное влияние Description of demonstrated impact	Использованная модель Model used	Источник Source
Ставудин Stavudine	Сенсибилизация к химиотерапии Sensitization to chemotherapy	Усиление индукции апоптоза и ингибирования миграции клеток при применении с паклитакселом Enhances induction of apoptosis and inhibition of cell migration when used with paclitaxel	Линия клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 Breast adenocarcinoma cell line MCF-7	[98]
	Противоопухолевый эффект Anticancer effect	Не влияет на возникновение опухолей, но демонстрирует задержку в появлении рецидивов опухоли, что значительно увеличивает показатели выживаемости без прогрессирования заболевания Does not affect the occurrence of tumors, but demonstrates a delay in the appearance of tumor relapses, which significantly prolongs progression-free survival	Мышиная модель рака молочной железы и нейробластомы MMTV-HER2/Neu и Th-MYCН Mouse model of breast cancer and neuroblastoma MMTV-HER2/Neu and Th-MYCН	[111]
Ламивудин Lamivudine	Сенсибилизация к химиотерапии и радиационному облучению Sensitization to chemotherapy and radiation exposure	В комбинации с сорафенибом торможение роста опухоли, резистентной к этому препарату In combination with sorafenib, inhibition of tumor growth resistant to sorafenib	Мышиная модель ксенографта гепатобластомы HepG2.215 Mouse xenograft model of hepatoblastoma HepG2.215	[112]
		Увеличение радиационно-индуцированных повреждений ДНК, индукция апоптоза, ингибирование теломеразной активности Increased radiation-induced DNA damage, induction of apoptosis, inhibition of telomerase activity	Линии клеток плоскоклеточного рака пищевода Eca109 и Eca9706 Esophageal squamous cell carcinoma cell lines Eca109 and Eca9706	[105]
Азвудин Aztidine	Противоопухолевый эффект Anticancer effect	Антипролиферативная активность, индукция апоптоза, остановка клеточного цикла в фазах G1/S или G2/M <i>in vitro</i> . Торможение роста ксенографтов Antiproliferative activity, induction of apoptosis, cell cycle arrest in G1/S or G2/M phases <i>in vitro</i> . Inhibition of xenograft growth	Линия клеток мантийно-клеточной лимфомы JeKo-1, мышиная модель ксенографта клеток JeKo-1T JeKo-1 mantle cell lymphoma cell line, JeKo-1T cell xenograft mouse model	[113]
		Снижение способности опухолевых клеток к адгезии, миграции и инвазии <i>in vitro</i> Reduced ability of tumor cells to adhere, migrate and invade <i>in vitro</i>	Линии клеток лимфомы Беркитта Raji и мантийно-клеточной лимфомы JeKo-1 Raji Burkitt lymphoma and JeKo-1 mantle cell lymphoma cell lines	[114]
		Антипролиферативная активность, индукция апоптоза, снижение способности опухолевых клеток к инвазии и метастазированию <i>in vitro</i> . Торможение роста ксенографтов Antiproliferative activity, induction of apoptosis, reduction in the ability of tumor cells to invade and metastasize <i>in vitro</i> . Inhibition of xenograft growth	Линия клеток немелкоклеточного рака легкого H460, модель рака легкого у мышей Льюиса, мышиная модель ксенографта клеток H460 H460 non-small cell lung cancer cell line, lewis mouse lung cancer model, H460 cell xenograft mouse model	[115]
		Антипролиферативное действие, остановка клеточного цикла в фазах G1 и S. Торможение роста ксенографтов Antiproliferative effect, cell cycle arrest in G1 and S phases. Inhibition of xenograft growth	Линии клеток (В-клеточной неходжкинской лимфомы, аденокарциномы легкого A549 и острого миелоидного лейкоза HL-60), мышиные модели ксенографта клеток гепатокарциномы (H22), саркомы (S180) и рака желудка (SGC7901) Cell lines (B-cell non-Hodgkin's lymphoma, lung adenocarcinoma A549 and acute myeloid leukemia HL-60), mouse xenograft models of hepa-tocarcinoma (H22), sarcoma (S180) and gastric cancer (SGC7901) cells	[116]

Продолжение табл. 2

Continuation of table 2

Препарат Drug	Эффект Effect	Продемонстрированное влияние Description of demonstrated impact	Использованная модель Model used	Источник Source
Абакавир Abacavir	Сенсибилизация к химиотерапии и радиационному облучению Sensitization to chemotherapy and radiation exposure	Увеличение радиационно-индуцированных повреждений ДНК, индукция апоптоза, ингибирование активности теломеразы Increased radiation-induced DNA damage, induction of apoptosis, inhibition of telomerase activity	Линии клеток плоскоклеточного рака пищевода Eca109 и Eca9706 Esophageal squamous cell carcinoma cell lines Eca109 and Eca9706	[105]
		В комбинации с паклитакселом усиление индукции апоптоза и ингибирование миграционной активности In combination with paclitaxel, increased induction of apoptosis and inhibition of migratory activity	Линия клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 Breast adenocarcinoma cell line MCF-7	[98]
	Противоопухолевый эффект Anticancer effect	Антипролиферативное и цитотоксическое действие, снижение способности клеток к миграции и инвазии, остановка клеточного цикла в фазе S, индукция репликативного старения Antiproliferative and cytotoxic effect, reduction in the ability of cells to migrate and invade, arrest of the cell cycle in the S-phase, induction of replicative senescence	Линии клеток рака предстательной железы PC3 и LNCaP PC3 and LNCaP prostate cancer cell lines	[91]
		Антипролиферативное действие и индукция дифференцировки клеток Antiproliferative effect and induction of cell differentiation	Линии клеток медуллобластомы Daoy и D283-MED Daoy and D283-MED medulloblastoma cell lines	[117]
Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors				
Невирапин Nevirapine	Противоопухолевый эффект Anticancer effect	Цитотоксическое действие Cytotoxic effect	Линия клеток рака поджелудочной железы BxPC-3 Pancreatic cancer cell line BxPC-3	[118]
		Антипролиферативное действие, индукция дифференцировки клеток, остановка клеточного цикла в фазе G0/G1. Торможение роста ксенографтов Antiproliferative effect, induction of cell differentiation, arrest of the cell cycle in the G0/G1 phase. Inhibition of xenograft growth	Первичные бласты пациентов с острым миелолейкозом, а также на линиях острого миелолейкоза (NB4, HL60 и Kasumi-1), клетки меланомы A-375 и карциномы простаты PC3, клетки недифференцированной карциномы щитовидной железы ARO и FRO. Мышиная модель ксенографта клеток карциномы простаты PC3 и колоректального рака HT29 Primary blasts from patients with acute myeloid leukemia, as well as acute myeloid leukemia lineages (NB4, HL60 and Kasumi-1), A-375 melanoma and PC3 prostate carcinoma cells, ARO and FRO undifferentiated thyroid carcinoma cells. Mouse xenograft model of PC3 prostate carcinoma and HT29 colorectal cancer cells	[60, 61, 119, 120]
		Снижение способности к миграции, инвазии и метастазированию <i>in vitro</i> . Торможение роста ксенографтов Reduced ability to migrate, invade and metastasize <i>in vitro</i> . Inhibition of xenograft growth	Линия клеток рака щитовидной железы WRO 82-1. Мышиная модель ксенографта с использованием клеточной культуры WRO 82-1 Thyroid cancer cell line WRO 82-1. Mouse xenograft model using cell culture WRO 82-1	[121]

Продолжение табл. 2

Continuation of table 2

Препарат Drug	Эффект Effect	Продemonстрированное влияние Description of demonstrated impact	Использованная модель Model used	Источник Source
Эфавиренз Efavirenz		Индукция репликативного старения Induction of replicative senescence	Линия клеток рака шейки матки HeLa HeLa cervical cancer cell line	[122]
		Антипролиферативное действие. Торможение роста ксенографтов, снижение активности метаболизма и активация местного иммунного ответа Antiproliferative effect. Inhibition of xenograft growth, reduction of metabolic activity and activation of local immune response	Линии клеток плоскоклеточного рака легкого NCI-H520, A549, H1299, NCI-H460 и NCI-H446. Мышиная модель NOD/SCID ксенографта плоскоклеточного рака легкого Squamous cell lung cancer cell lines NCI-H520, A549, H1299, NCI-H460 and NCI-H446. Mouse model of NOD/SCID xenograft of squamous cell lung cancer	[123]
	Противоопухолевый эффект Anticancer effect	Антипролиферативное действие, индукция дифференцировки клеток, остановка клеточного цикла в фазе G0/G1 Antiproliferative effect, induction of cell differentiation, arrest of the cell cycle in the G0/G1 phase	Линии клеток недифференцированной карциномы щитовидной железы ARO и FRO, меланомы A-375, аденокарциномы молочной железы MCF7 и карциномы предстательной железы PC3 ARO and FRO undifferentiated thyroid carcinoma, A-375 melanoma, MCF7 breast adenocarcinoma and PC3 prostate carcinoma cell lines	[61, 120, 124]
		Цитотоксическое и антипролиферативное действие на опухолевые клетки при отсутствии влияния на первичные фибробласты Cytotoxic and antiproliferative effect on tumor cells without affecting primary fibroblasts	Линии клеток глиобластомы T98G, U87, карциномы толстого кишечника HCT-15, карциномы поджелудочной железы BxPC-3, Panc-1, острого миелоидного лейкоза Jurkat, меланомы A-375, рака предстательной железы PC3 и остеосаркомы Saos-2, первичные фибробласты Glioblastoma cell lines T98G, U87, colon carcinoma HCT-15, pancreatic carcinoma BxPC-3, Panc-1, acute myeloid leukemia Jurkat, melanoma A-375, prostate cancer PC3 and osteosarcoma Saos-2, primary fibroblasts	[118, 125, 126]
		Антипролиферативное действие, индукция апоптоза, нормализация морфологии клеток на эпителиоподобный фенотип Antiproliferative effect, induction of apoptosis, normalization of cell morphology to an epithelial-like phenotype	Линии клеток трижды негативного рака молочной железы MCF10AT и MCF10CA1a Triple negative breast cancer cell lines MCF10AT and MCF10CA1a	[127]
		Антипролиферативное действие <i>in vitro</i> . Торможение роста ксенографта, снижение активности метаболизма в клетках опухоли и активация местного иммунного ответа Antiproliferative effect <i>in vitro</i> . Inhibition of xenograft growth, reduction of metabolic activity in tumor cells and activation of the local immune response	Линии клеток плоскоклеточного рака легкого NCI-H520, A549, H1299, NCI-H460 и NCI-H446. Мышиная модель NOD/SCID ксенографта плоскоклеточного рака легкого Squamous cell lung cancer cell lines NCI-H520, A549, H1299, NCI-H460 and NCI-H446. Mouse model of NOD/SCID xenograft of squamous cell lung cancer	[123, 128]
		Индукция апоптоза Induction of apoptosis	Линии клеток лейкозов IM9, HL60 и Jurkat Leukemia cell lines IM9, HL60 and Jurkat	[129]

Окончание табл. 2

End of table 2

Препарат Drug	Эффект Effect	Продemonстрированное влияние Description of demonstrated impact	Использованная модель Model used	Источник Source
		Антипролиферативное действие Antiproliferative effect	Линия клеток метастатической карциномы предстательной железы PC3 Metastatic prostate carcinoma cell line PC3	[130]
		Снижение клоногенной активности, антипролиферативное действие и индукция апоптоза Reduced clonogenic activity, antiproliferative effect and induction of apoptosis	Линии клеток аденокарциномы легкого A549 и гепатокарциномы HepG2 A549 lung adenocarcinoma and HepG2 hepatocarcinoma cell lines	[110]
Этравирин Etravirine	Сенсибилизация к химиотерапии Sensitization to chemotherapy	При применении с паклитакселом торможение формирования сферидов и снижение активности метастазирования When used with paclitaxel, inhibition of spheroid formation and reduction of metastasis activity	Мышиная модель ортотопического ксенотрансплантата рака яичников Mouse model of orthotopic xenograft ovarian cancer	[131]
	Противоопухолевый эффект Anticancer effect	Цитотоксическое действие Cytotoxic effect	Линия клеток рака поджелудочной железы BxPC-3 Pancreatic cancer cell line BxPC-3	[118]
Рилпивирин Rilpivirine	Противоопухолевый эффект Anticancer effect	Антипролиферативное действие, снижение способности клеток к миграции и инвазии Antiproliferative effect, reducing the ability of cells to migrate and invade	Линии клеток рака яичников A2780, A2780-ADR, SKOV3, OVCAR8 Ovarian cancer cell lines A2780, A2780-ADR, SKOV3, OVCAR8	[131]
		Увеличение антипролиферативного действия цитарабина Increased antiproliferative effect of cytarabine	Линии клеток острого миелоидного лейкоза HL60, NB4, K-562, U-937 и KG1a Acute myeloid leukemia cell lines HL60, NB4, K-562, U-937, and KG1a	[132]
		Цитотоксическое действие Cytotoxic effect	Линия клеток рака поджелудочной железы BxPC-3 Pancreatic cancer cell line BxPC-3	[118]
		Антипролиферативное действие, снижение активности киназы Авроры А Antiproliferative effect, decrease in Aurora A kinase activity	Линия клеток рака молочной железы T47D T47D breast cancer cell line	[132]
		Антипролиферативное действие, остановка клеточного цикла в фазе G2/M, индукция апоптоза <i>in vitro</i> . Торможение роста опухоли на мышинной модели без изменений массы тела или других клинических признаков токсичности Antiproliferative effect, cell cycle arrest in the G2/M phase, induction of apoptosis <i>in vitro</i> . Inhibition of tumor growth in a mouse model without changes in body weight or other clinical signs of toxicity	Линии клеток острого миелоидного лейкоза (HL60, NB4, K-562, U-937, KG1a). Мышиные модели ксенографта HL-60 Acute myeloid leukemia cell lines (HL60, NB4, K-562, U-937, KG1a). Mouse models of HL-60 xenograft	[132]

Взаимодействие ингибиторов обратной транскриптазы вирусов с теломеразой. Теломераза представляет собой РНК-зависимую ДНК-полимеразу, которая катализирует добавление нуклеотидов TTAGGG к теломерам [133]. В норме в соматических клетках активность теломеразы подавляется, и длина теломер укорачивается с каждым делением клетки, однако в гемопоэтических стволовых и опухолевых клетках данный фермент гиперэкспрессирован, что позволяет избежать укорочения концевых участков и, следовательно, репликативного старения клеток [134]. Каталитическая субъединица фермента теломеразы – теломеразная обратная транскриптаза (hTERT (у человека)) вместе с теломеразным РНК-компонентом (TERC) составляет наиболее важный компонент теломеразного комплекса. Ингибиторы ОТ обладают высоким сродством к hTERT и при взаимодействии с ней подавляют ее активность, что приводит к ингибированию удлинения теломер [135]. Поскольку теломераза играет непосредственную роль в организации структуры и репарации ДНК, ее ингибирование не только приводит к сокращению размеров теломерных последовательностей, но и вызывает апоптоз и увеличение экспрессии γ H2AX и pChk2 – важных маркеров повреждения ДНК для контрольной точки фазы G2 клеточного цикла [102]. Представленные данные свидетельствуют о весьма сложных и многообразных процессах, происходящих в геноме клетки при воздействии на какие-либо ДНК-контролирующие ферменты. Промотор гена *hTERT* содержит множество сайтов для нескольких факторов транскрипции, что указывает на высокий уровень его участия в регуляции многих клеточных процессов. Онкобелки c-MYC, KLF4, Sp1, HIF-1, AP2 и другие являются факторами транскрипции, активирующими *hTERT*, в то время как многие белки-супрессоры опухолевого роста, такие как P53, WT1 и Menin, продуцируют факторы, подавляющие активность экспрессии *hTERT* [136]. Интересно, что непосредственно сами последовательности LINE1 являются транскрипционными факторами *hTERT*, связываясь с теми же сайтами на промоторе, что и c-MYC и KLF4, а активация экспрессии LINE1 влияет на мРНК этих белков [67].

Таким образом, роль ОТ LINE1 в регуляции hTERT указывает на целесообразность использования ИОТ для ингибирования теломеразной активности в опухолевых клетках различных ЗНО как непосредственным ингибированием активности фермента, так и опосредованно – через ингибирование LINE1. Было показано, что подавление экспрессии LINE1 нокдауном в клетках линий HCT116 и MG-63 приводит к снижению стабильности теломер, снижению уровня мРНК и белка hTERT [67].

Опухолевые клеточные линии с высокой активностью hTERT проявляют большую резистентность в отношении лучевой терапии и чаще локально рецидивируют, чем опухоли с низкой активностью фермента. Зидовудин ингибирует активность hTERT, тем самым

снижая скорость восстановления длины теломер и разрывов цепей ДНК, и таким образом повышает радиочувствительность опухолевых клеток [105]. В опухолевых клетках линий HCT-116, SkMel-28, MelJuso и Jurkat длительное совместное применение низких доз зидовудина и диданозина также вызывало значительное укорочение теломер. Обработка клеток обоими ИОТ приводила к значительному накоплению γ H2AX, фосфорилированию P53 и активации апоптоза во всех клеточных линиях. Было установлено, что при высоких концентрациях (>100 мкМ) и кратковременном применении (2–3 дня) зидовудин вызывал укорочение теломер и остановку клеточного цикла [102]. Продемонстрированы эффекты ингибирования роста клеток линии рака пищевода TE-11 и острого миелоидного лейкоза KG1, связанные со снижением активности теломеразы, остановкой клеточного цикла в фазах S и G2/M и усиленным повреждением ДНК [135, 137].

Интересно также, что hTERT, помимо своей канонической функции в качестве каталитической субъединицы теломеразы, выступает как модулятор сигнального пути Wnt/ β -catenin, что в конечном счете приводит к активации c-MYC и Cyclin D1.

Таким образом, ИОТ, связываясь с TERT, могут оказывать влияние не только на саму теломеразу, но и на клеточный цикл, миграцию опухолевых клеток и структуру цитоскелета, модулируя активность сигнального пути Wnt/ β -catenin [138]. Были опубликованы данные о том, что на модели аденокарциномы молочной железы обработка клеток зидовудином действительно приводит к подавлению экспрессии генов *C-MYC* и *Cyc-D1* посредством влияния на TERT, что служит причиной увеличения времени деления клеток или ее остановки в фазах G2/M или S, а также снижению миграционной активности клеток [139]. Степень проявления эффектов ИОТ зависит в основном от концентрации препарата и времени обработки клеток. Так, при длительной терапии зидовудином требуется снижение используемой дозы из-за гематологической токсичности, а при низких концентрациях он практически не оказывает эффекта на теломеразу [135].

Существуют альтернативные механизмы удлинения теломер, в том числе с помощью ретротранспозонов, которые часто встречаются у растений и насекомых. Активация этих механизмов также наблюдается в 30 % опухолей человека. В опухолевых клетках с низкой активностью теломеразы или ее отсутствием отмечена повышенная экспрессия LINE1 и ОТ LINE1, которая и выполняет функцию теломеразы [140]. В остеосаркомах U-2 OS и Saos-2 теломеры, как известно, поддерживаются благодаря активности ОТ LINE1, осуществляющей синтез теломерной ДНК по механизму скольжения. Обработка клеток зидовудином приводит к прогрессирующему укорочению теломер (до 50 %) и снижению активности синтеза ДНК (до 40 %). При этом происходят остановка клеточного цикла в фазе G2 и активация апоптоза [140].

Таким образом, все представленные данные свидетельствуют о том, что ингибирование теломеразы с помощью ИОТ должно оказывать противоопухолевое действие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ингибиторы ОТ вирусов активно используются в высокоактивной антиретровирусной терапии и терапии многих других вирусных заболеваний и показали высокую эффективность и безопасность. Исследования последних 10 лет продемонстрировали, что мишенями ИОТ, помимо вирусной ОТ, являются теломераза человека и ОТ длинных диспергированных повторов LINE1, составляющих значительную часть части генома человека. Благодаря этим активностям, данные соединения, как ожидается, должны как проявлять собственную противоопухолевую активность, так и повышать чувствительность опухолевых клеток к проводимой терапии.

На моделях различных опухолей *in vitro* и *in vivo* получено экспериментальное подтверждение ожидаемого

противоопухолевого эффекта для многих используемых в клинической практике антивирусных ИОТ. В большинстве случаев ЗНО на момент постановки диагноза опухолевые клетки могут уже содержать не только целый ряд драйверных мутаций, но и активированные ретротранспозоны. Выбор методов лечения зависит от клинических, морфологических и иммунологических особенностей опухоли и выявленных геномных нарушений в опухолевых клетках. Тем не менее использование в комбинированной терапии ИОТ представляется целесообразным как для предотвращения дальнейших перестроек генома, вызываемых LINE1, так и для подавления выживаемости опухолевых клеток путем ингибирования теломеразной активности. Несмотря на высокие показатели выживаемости, достигнутые в ходе лечения ряда опухолей, существуют ЗНО с низким куративным потенциалом. Использование ингибиторов ОТ вирусов в комбинированной терапии таких ЗНО представляется перспективным.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Haber D.A., Gray N.S., Baselga J. The evolving war on cancer. *Cell* 2011;145(1):19–24. DOI: 10.1016/j.cell.2011.03.026
- Heng J., Heng H.H. Genome chaos, information creation, and cancer emergence: searching for new frameworks on the 50th anniversary of the “War on Cancer.” *Genes (Basel)* 2021;13(1):101. DOI: 10.3390/genes13010101
- Martincorena I., Roshan A., Gerstung M. et al. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* 2015;348(6237):880–6. DOI: 10.1126/science.aaa6806
- Yokoyama A., Kakiuchi N., Yoshizato T. et al. Age-related remodelling of oesophageal epithelia by mutated cancer drivers. *Nature* 2019;565(7739):312–7. DOI: 10.1038/s41586-018-0811-x
- Lee-Six H., Olafsson S., Ellis P. et al. The landscape of somatic mutation in normal colorectal epithelial cells. *Nature* 2019;574(7779):532–7. DOI: 10.1038/s41586-019-1672-7
- Keogh M.J., Wei W., Aryaman J. et al. High prevalence of focal and multifocal somatic genetic variants in the human brain. *Nat Commun* 2018;9(1):4257. DOI: 10.1038/s41467-018-06331-w
- Yizhak K., Aguet F., Kim J. et al. RNA sequence analysis reveals macroscopic somatic clonal expansion across normal tissues. *Science* 2019;364(6444):eaaw0726. DOI: 10.1126/science.aaw0726
- Maher B. ENCODE: the human encyclopaedia. *Nature* 2012;489(7414):46–8. DOI: 10.1038/489046a
- Nebbioso A., Tambaro F.P., Dell’Aversana C., Altucci L. Cancer epigenetics: moving forward. *PLoS Genet* 2018;14(6):e1007362. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007362
- Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov* 2022;12(1):31–46. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059
- Flavahan W.A., Gaskell E., Bernstein B.E. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science* 2017;357(6348):eaal2380. DOI: 10.1126/science.aal2380
- Hendrix M.J.C., Seftor E.A., Seftor R.E.B. et al. Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer* 2007;7(4):246–55. DOI: 10.1038/nrc2108
- Lu Y., Chan Y.T., Tan H.Y. et al. Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *Mol Cancer* 2020;19(1):79. DOI: 10.1186/s12943-020-01197-3
- de Thé H. Differentiation therapy revisited. *Nat Rev Cancer* 2018;18(2):117–27. DOI: 10.1038/nrc.2017.103
- Fulgieri P., Stivala L.A., Sottile V. Modulating cell differentiation in cancer models. *Biochem Soc Trans* 2021;49(4):1803–16. DOI: 10.1042/BST20210230
- Holoch D., Moazed D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet* 2015;16(2):71–84. DOI: 10.1038/nrg3863
- Spadafora C. The epigenetic basis of evolution. *Prog Biophys Mol Biol* 2023;178:57–69. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2023.01.005
- Hubisz M.J., Pollard K.S. Exploring the genesis and functions of Human Accelerated Regions sheds light on their role in human evolution. *Curr Opin Genet Dev* 2014;29:15–21. DOI: 10.1016/j.gde.2014.07.005
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409(6822):860–921. DOI: 10.1038/35057062
- Bourque G., Burns K.H., Gehring M. et al. Ten things you should know about transposable elements. *Genome Biol* 2018;19(1):199. DOI: 10.1186/s13059-018-1577-z
- Richardson S.R., Doucet A.J., Kopera H.C. et al. The influence of LINE-1 and SINE retrotransposons on mammalian genomes. *Microbiol Spectr* 2015;3(2):MDNA3-0061-2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0061-2014
- Houck C.M., Rinehart F.P., Schmid C.W. A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. *J Mol Biol* 1979;132(3):289–306. DOI: 10.1016/0022-2836(79)90261-4
- Gianfrancesco O., Geary B., Savage A.L. et al. The role of SINE-VNTR-Alu (SVA) retrotransposons in shaping the human genome. *Int J Mol Sci* 2019;20(23):5977. DOI: 10.3390/ijms20235977
- Ivics Z. Genomic parasites and genome evolution. *Genome Biol* 2009;10(4):306. DOI: 10.1186/gb-2009-10-4-306
- Hancks D.C., Goodier J.L., Mandal P.K. et al. Retrotransposition of marked SVA elements by human L1s in cultured cells. *Hum Mol Genet* 2011;20(17):3386–400. DOI: 10.1093/hmg/ddr245
- Brouha B., Schustak J., Badge R.M. et al. Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(9):5280–5. DOI: 10.1073/pnas.0831042100

27. Belancio V.P., Roy-Engel A.M., Deininger P.L. All y'all need to know 'bout retroelements in cancer. *Semin Cancer Biol* 2010;20(4):200–10. DOI: 10.1016/j.semcancer.2010.06.001
28. Chénais B. Transposable elements and human diseases: mechanisms and implication in the response to environmental pollutants. *Int J Mol Sci* 2022;23(5):2551. DOI: 10.3390/ijms23052551
29. Moran J.V., DeBerardinis R.J., Kazazian H.H. Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science* 1999;283(5407):1530–4. DOI: 10.1126/science.283.5407.1530
30. Tubio J.M.C., Li Y., Ju Y.S. et al. Extensive transduction of non-repetitive DNA mediated by L1 retrotransposition in cancer genomes. *Science* 2014;345(6196):1251343. DOI: 10.1126/science.1251343
31. Ardeljan D., Steranka J.P., Liu C. et al. Cell fitness screens reveal a conflict between LINE-1 retrotransposition and DNA replication. *Nat Struct Mol Biol* 2020;27(2):168–78. DOI: 10.1038/s41594-020-0372-1
32. Faulkner G.J., Kimura Y., Daub C.O. et al. The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells. *Nat Genet* 2009;41(5):563–71. DOI: 10.1038/ng.368
33. Hata K., Sakaki Y. Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. *Gene* 1997;189(2):227–34. DOI: 10.1016/S0378-1119(96)00856-6
34. Li H., Zimmerman S.E., Weyemi U. Genomic instability and metabolism in cancer. In: *International review of cell and molecular biology*. Ed. by U. Weyemi, L. Galluzzi. Vol. 364. Chromatin and Genomic Instability in Cancer. Academic Press, 2021. Pp. 241–265. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2021.05.004
35. Chen M., Linstra R., van Vugt M.A.T.M. Genomic instability, inflammatory signaling and response to cancer immunotherapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2022;1877(1):188661. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188661
36. Rodriguez-Martin B., Alvarez E.G., Baez-Ortega A. et al. Pan-cancer analysis of whole genomes identifies driver rearrangements promoted by LINE-1 retrotransposition. *Nat Genet* 2020;52(3):306–19. DOI: 10.1038/s41588-019-0562-0
37. Hancks D.C., Kazazian H.H. Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mob DNA* 2016;7:9. DOI: 10.1186/s13100-016-0065-9
38. Iskow R.C., McCabe M.T., Mills R.E. et al. Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. *Cell* 2010;141(7):1253–61. DOI: 10.1016/j.cell.2010.05.020
39. Solyom S., Ewing A.D., Rahrmann E.P. et al. Extensive somatic L1 retrotransposition in colorectal tumors. *Genome Res* 2012;22(12):2328–38. DOI: 10.1101/gr.145235.112
40. Doucet-O'Hare T.T., Rodić N., Sharma R. et al. LINE-1 expression and retrotransposition in Barrett's esophagus and esophageal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(35):E4894–900. DOI: 10.1073/pnas.1502474112
41. Rodić N., Steranka J.P., Makohon-Moore A. et al. Retrotransposon insertions in the clonal evolution of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Med* 2015;21(9):1060–4. DOI: 10.1038/nm.3919
42. Ewing A.D., Gacita A., Wood L.D. et al. Widespread somatic L1 retrotransposition occurs early during gastrointestinal cancer evolution. *Genome Res* 2015;25(10):1536–45. DOI: 10.1101/gr.196238.115
43. Tang Z., Steranka J.P., Ma S. et al. Human transposon insertion profiling: analysis, visualization and identification of somatic LINE-1 insertions in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114(5):E733–40. DOI: 10.1073/pnas.1619797114
44. Lee E., Iskow R., Yang L. et al. Landscape of somatic retrotransposition in human cancers. *Science* 2012;337(6097):967–71. DOI: 10.1126/science.1222077
45. Shukla R., Upton K.R., Muñoz-Lopez M. et al. Endogenous retro-transposition activates oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma. *Cell* 2013;153(1):101–11. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.032
46. Protasova M.S., Andreeva T.V., Rogaev E.I. Factors regulating the activity of LINE1 retrotransposons. *Genes (Basel)* 2021;12(10):1562. DOI: 10.3390/genes12101562
47. Izquierdo-Bouldstridge A., Bustillos A., Bonet-Costa C. et al. Histone H1 depletion triggers an interferon response in cancer cells via activation of heterochromatic repeats. *Nucleic Acids Res* 2017;45(20):11622–42. DOI: 10.1093/nar/gkx746
48. Izzo A., Kamieniarz-Gdula K., Ramirez F. et al. The genomic landscape of the somatic linker histone subtypes H1.1 to H1.5 in human cells. *Cell Rep* 2013;3(6):2142–54. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.05.003
49. Hatanaka Y., Inoue K., Oikawa M. et al. Histone chaperone CAF-1 mediates repressive histone modifications to protect preimplantation mouse embryos from endogenous retrotransposons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(47):14641–6. DOI: 10.1073/pnas.1512775112
50. Heaton S.E., Pinto H.D., Mishra L.N. et al. H1 linker histones silence repetitive elements by promoting both histone H3K9 methylation and chromatin compaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020;117(25):14251–8. DOI: 10.1073/pnas.1920725117
51. Liu Y.M., Liou J.P. An updated patent review of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in cancer. *Expert Opin Ther Pat* 2023;33(5):349–69. DOI: 10.1080/13543776.2023.2219393
52. Lopez M., Gilbert J., Contreras J. et al. Inhibitors of DNA methylation. *Adv Exp Med Biol* 2022;1389:471–513. DOI: 10.1007/978-3-031-11454-0_17
53. Benafif S., Hall M. An update on PARP inhibitors for the treatment of cancer. *Onco Targets Ther* 2015;8:519–28. DOI: 10.2147/OTT.S30793
54. Khazina E., Truffault V., Büttner R. et al. Trimeric structure and flexibility of the L1ORF1 protein in human L1 retrotransposition. *Nat Struct Mol Biol* 2011;18(9):1006–14. DOI: 10.1038/nsmb.2097
55. Alish R.S., Garcia-Perez J.L., Muotri A.R. et al. Unconventional translation of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Genes Dev* 2006;20(2):210–24. DOI: 10.1101/gad.1380406
56. Taylor M.S., LaCava J., Mita P. et al. Affinity proteomics reveals human host factors implicated in discrete stages of LINE-1 retrotransposition. *Cell* 2013;155(5):1034–48. DOI: 10.1016/j.cell.2013.10.021
57. Flasch D.A., Macia Á., Sánchez L. et al. Genome-wide *de novo* L1 retrotransposition connects endonuclease activity with replication. *Cell* 2019;177(4):837–51.e28. DOI: 10.1016/j.cell.2019.02.050
58. Cost G.J., Feng Q., Jacquier A. et al. Human L1 element target-primed reverse transcription *in vitro*. *EMBO J* 2002;21(21):5899–910. DOI: 10.1093/emboj/cdf592
59. Su Y., Davies S., Davis M. et al. Expression of LINE-1 p40 protein in pediatric malignant germ cell tumors and its association with clinicopathological parameters: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer Lett* 2007;247(2):204–12. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.04.010
60. Mangiacasale R., Pittoggi C., Sciamanna I. et al. Exposure of normal and transformed cells to nevirapine, a reverse transcriptase inhibitor, reduces cell growth and promotes differentiation. *Oncogene* 2003;22(18):2750–61. DOI: 10.1038/sj.onc.1206354
61. Landriscina M., Fabiano A., Altamura S. et al. Reverse transcriptase inhibitors down-regulate cell proliferation *in vitro* and *in vivo* and restore thyrotropin signaling and iodine uptake in human thyroid anaplastic carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(10):5663–5671. DOI: 10.1210/jc.2005-0367
62. Wang G., Gao J., Huang H. et al. Expression of a LINE-1 endonuclease variant in gastric cancer: its association with clinicopathological parameters. *BMC Cancer* 2013;13:265. DOI: 10.1186/1471-2407-13-265
63. Chen L., Dahlstrom J.E., Chandra A. et al. Prognostic value of LINE-1 retrotransposon expression and its subcellular localization in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;136(1):129–42. DOI: 10.1007/s10549-012-2246-7

64. Gualtieri A., Andreola F., Sciamanna I. et al. Increased expression and copy number amplification of LINE-1 and SINE B1 retrotransposable elements in murine mammary carcinoma progression. *Oncotarget* 2013;4(11):1882–93.
65. De Luca C., Guadagni F., Sinibaldi-Vallebona P. et al. Enhanced expression of LINE-1-encoded ORF2 protein in early stages of colon and prostate transformation. *Oncotarget* 2015;7(4):4048–61. DOI: 10.18632/oncotarget.6767
66. Sciamanna I., De Luca C., Spadafora C. The reverse transcriptase encoded by LINE-1 retrotransposons in the genesis, progression, and therapy of cancer. *Front Chem* 2016;4:6. DOI: 10.3389/fchem.2016.00006
67. Aschacher T., Wolf B., Enzmann F. et al. LINE-1 induces hTERT and ensures telomere maintenance in tumour cell lines. *Oncogene* 2016;35(1):94–104. DOI: 10.1038/ncr.2015.65
68. Sciamanna I., Sinibaldi-Vallebona P., Serafino A. et al. LINE-1-encoded reverse Transcriptase as a target in cancer therapy. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2018;23(7):1360–9. DOI: 10.2741/4648
69. Prokofjeva M.M., Kochetkov S.N., Prassolov V.S. Therapy of HIV infection: current approaches and prospects. *Acta Naturae* 2016;8(4):23–32. DOI: 10.32607/20758251-2016-8-4-23-32
70. Li G., Wang Y., De Clercq E. Approved HIV reverse transcriptase inhibitors in the past decade. *Acta Pharm Sin B* 2022;12(4):1567–90. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.11.009
71. Young M.J. Off-target effects of drugs that disrupt human mitochondrial DNA maintenance. *Front Mol Biosci* 2017;4:74. DOI: 10.3389/fmolb.2017.00074
72. Benedicto A.M., Fuster-Martínez I., Tosca J. et al. NNRTI and liver damage: evidence of their association and the mechanisms involved. *Cells* 2021;10(7):1687. DOI: 10.3390/cells10071687
73. Furman P.A., Fyfe J.A., St Clair M.H. et al. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(21):8333–7. DOI: 10.1073/pnas.83.21.8333
74. Rousseau F.S., Wakeford C., Mommeja-Marin H. et al. Prospective randomized trial of emtricitabine *versus* lamivudine short-term monotherapy in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 2003;188(11):1652–8. DOI: 10.1086/379667
75. Kuretu A., Arineitwe C., Mothibe M. et al. Drug-induced mitochondrial toxicity: risks of developing glucose handling impairments. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023;14:1123928. DOI: 10.3389/fendo.2023.1123928
76. McKee E.E., Bentley A.T., Hatch M. et al. Phosphorylation of thymidine and AZT in heart mitochondria. *Cardiovasc Toxicol* 2004;4(2):155–67. DOI: 10.1385/ct.4:2:155
77. Smith R.L., Tan J.M.E., Jonker M.J. et al. Beyond the polymerase- γ theory: production of ROS as a mode of NRTI-induced mitochondrial toxicity. *PLoS One* 2017;12(11):e0187424. DOI: 10.1371/journal.pone.0187424
78. Mataramvura H., Bunders M.J., Duri K. Human immunodeficiency virus and antiretroviral therapy-mediated immune cell metabolic dysregulation in children born to HIV-infected women: potential clinical implications. *Front Immunol* 2023;14:1182217. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1182217
79. Lewis W., Day B.J., Copeland W.C. Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2(10):812–22. DOI: 10.1038/nrd1201
80. Torres R.A., Lewis W. Aging and HIV/AIDS: pathogenetic role of therapeutic side effects. *Lab Invest* 2014;94(2):120–8. DOI: 10.1038/labinvest.2013.142
81. HIV 2014/15: www.hivbuch.de. Ed. by C. Hoffmann, J. Rockstroh. Medizin Fokus Verlag, 2014.
82. Rock A.E., Lerner J., Badowski M.E. Doravirine and its potential in the treatment of HIV: an evidence-based review of the emerging data. *HIV AIDS (Auckl)* 2020;12:201–10. DOI: 10.2147/HIV.S184018
83. Terrault N.A., Lok A.S., McMahon B.J. et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment and of chronic hepatitis B: AASLD 2018 Hepatitis B Guidance. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2018;67(4):1560. DOI: 10.1002/hep.29800
84. de Fraga R.S., Van Vaisberg V., Mendes L.C.A. et al. Adverse events of nucleos(t)ide analogues for chronic hepatitis B: a systematic review. *J Gastroenterol* 2020;55(5):496–514. DOI: 10.1007/s00535-020-01680-0
85. Battini L., Bollini M. Challenges and approaches in the discovery of human immunodeficiency virus type-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Med Res Rev* 2019;39(4):1235–1273. DOI: 10.1002/med.21544
86. Wallace J., Gonzalez H., Rajan R. et al. Anti-HIV drugs cause mitochondrial dysfunction in monocyte-derived macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2022;66(4):e01941–21. DOI: 10.1128/aac.01941-21
87. Arts E.J., Wainberg M.A. Mechanisms of nucleoside analog antiviral activity and resistance during human immunodeficiency virus reverse transcription. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(3):527–40. DOI: 10.1128/AAC.40.3.527
88. Dai L., Huang Q., Boeke J.D. Effect of reverse transcriptase inhibitors on LINE-1 and Tyl1 reverse transcriptase activities and on LINE-1 retrotransposition. *BMC Biochem* 2011;12:18. DOI: 10.1186/1471-2091-12-18
89. Jones R.B., Garrison K.E., Wong J.C. et al. Nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors differentially inhibit human LINE-1 retrotransposition. *PLoS One* 2008;3(2):e1547. DOI: 10.1371/journal.pone.0001547
90. Banuelos-Sanchez G., Sanchez L., Benitez-Guijarro M. et al. Synthesis and Characterization of Specific Reverse Transcriptase Inhibitors for Mammalian LINE-1 Retrotransposons. *Cell Chem Biol* 2019;26(8):1095–1109.e14. DOI: 10.1016/j.chembiol.2019.04.010
91. Carlini F., Ridolfi B., Molinari A. et al. The reverse transcription inhibitor abacavir shows anticancer activity in prostate cancer cell lines. *PLoS One* 2010;5(12):e14221. DOI: 10.1371/journal.pone.0014221
92. Simon M., Meter M.V., Ablava J. et al. LINE1 derepression in aged wild type and SIRT6 deficient mice drives inflammation. *Cell Metab* 2019;29(4):871–85.e5. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.02.014
93. Bersani F., Lee E., Kharchenko P.V. et al. Pericentromeric satellite repeat expansions through RNA-derived DNA intermediates in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(49):15148–53. DOI: 10.1073/pnas.1518008112
94. Shao J., Wang Y., Hu L. et al. Lower risk of hepatocellular carcinoma with tenofovir than entecavir in antiviral treatment-naïve chronic hepatitis B patients: a systematic review and meta-analysis involving 90,897 participants. *Clin Exp Med* 2023;23(6):2131–40. DOI: 10.1007/s10238-023-00990-w
95. Houédé N., Pulido M., Mourey L. et al. A phase ii trial evaluating the efficacy and safety of efavirenz in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Oncologist* 2014;19(12):1227–8. DOI: 10.1634/theoncologist.2014-0345
96. Rajurkar M., Parikh A.R., Solovyov A. et al. Reverse transcriptase inhibition disrupts repeat element life cycle in colorectal cancer. *Cancer Discov* 2022;12(6):1462–81. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1117
97. Yang J., Xu W.W., Hong P. et al. Adefovir dipivoxil sensitizes colon cancer cells to vemurafenib by disrupting the KCTD12-CDK1 interaction. *Cancer Lett* 2019;451:79–98. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.02.050
98. Şekeroğlu Z.A., Şekeroğlu V. and Küçük N. Effects of reverse transcriptase inhibitors on proliferation, apoptosis, and migration in breast carcinoma cells. *Int J Toxicol* 2021;40(1):52–61. DOI: 10.1177/1091581820961498
99. Sherif D.A., Makled M.N., Suddek G.M. The HIV reverse transcriptase Inhibitor Tenofovir suppressed DMH/HFD-induced

- colorectal cancer in Wistar rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2021;35(6):940–54. DOI: 10.1111/fcp.12679
100. Abouelezz H.M., El-Kashef D.H., Abdelaziz R.R. et al. Tenofovir alone or combined with doxorubicin abrogates DMBA-induced mammary cell carcinoma: An insight into its modulatory impact on oxidative/Notch/apoptotic signaling. *Life Sci* 2023;326:121798. DOI: 10.1016/j.lfs.2023.121798
 101. Tsai W.L., Cheng J.S., Liu P.F. et al. Sofosbuvir induces gene expression for promoting cell proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Aging (Albany NY)* 2022;14(14):5710–26. DOI: 10.18632/aging.204170
 102. Aschacher T., Sampl S., Käser L. et al. The combined use of known antiviral reverse transcriptase inhibitors AZT and DDI induce anticancer effects at low concentrations. *Neoplasia* 2012;14(1):44–53. DOI: 10.1593/neo.11426
 103. Horner M.J., Hazra R., Barnholtz-Sloan J.S. et al. Cancer risk among HIV-exposed uninfected children in the United States. *AIDS* 2023;37(3):549–51. DOI: 10.1097/QAD.0000000000003458
 104. Hleyhel M., Goujon S., Delteil C. et al. Risk of cancer in children exposed to didanosine in utero. *AIDS* 2016;30(8):1245–56. DOI: 10.1097/QAD.0000000000001051
 105. Chen X., Wang C., Guan S. et al. Zidovudine, abacavir and lamivudine increase the radiosensitivity of human esophageal squamous cancer cell lines. *Oncol Rep* 2016;36(1):239–46. DOI: 10.3892/or.2016.4819
 106. Zhou F.X., Liao Z.K., Dai J. et al. Radiosensitization effect of zidovudine on human malignant glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354(2):351–6. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.12.180
 107. Humer J., Ferko B., Waltenberger A. et al. Azidothymidine inhibits melanoma cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Melanoma Res* 2008;18(5):314–21. DOI: 10.1097/CMR.0b013e32830aaaa6
 108. Brown T., Sigurdson E., Rogatko A. et al. Telomerase inhibition using azidothymidine in the HT-29 colon cancer cell line. *Ann Surg Oncol* 2003;10(8):910–5. DOI: 10.1245/aso.2003.03.032
 109. Schneider M.A., Buzdin A.A., Weber A. et al. Combination of antiretroviral drugs zidovudine and efavirenz impairs tumor growths in a mouse model of cancer. *Viruses* 2021;13(12):2396. DOI: 10.3390/v13122396
 110. Giovino A., Balestrieri E., Petrone V. et al. The concomitant expression of human endogenous retroviruses and embryonic genes in cancer cells under microenvironmental changes is a potential target for antiretroviral drugs. *Cancer Microenviron* 2019;12(2–3):105–18. DOI: 10.1007/s12307-019-00231-3
 111. Novototskaya-Vlasova K.A., Neznanov N.S., Molodtsov I. et al. Inflammatory response to retrotransposons drives tumor drug resistance that can be prevented by reverse transcriptase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2022;119(49):e2213146119. DOI: 10.1073/pnas.2213146119
 112. Zhang S., Li N., Sheng Y. et al. Hepatitis B virus induces sorafenib resistance in liver cancer via upregulation of cIAP2 expression. *Infect Agent Cancer* 2021;16(1):20. DOI: 10.1186/s13027-021-00359-2
 113. Zhang Y., Zhang R., Ding X. et al. FNC efficiently inhibits mantle cell lymphoma growth. *PLoS One* 2017;12(3):e0174112. DOI: 10.1371/journal.pone.0174112
 114. Zhang Y., Wang C.P., Ding X.X. et al. FNC, a novel nucleoside analogue, blocks invasion of aggressive non-Hodgkin lymphoma cell lines via inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(16):6829–35. DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.16.6829
 115. Jing X., Niu S., Liang Y. et al. FNC inhibits non-small cell lung cancer by activating the mitochondrial apoptosis pathway. *Genes Genomics* 2022;44(1):123–31. DOI: 10.1007/s13258-021-01179-9
 116. Wang Q., Liu X., Wang Q. et al. FNC, a novel nucleoside analogue inhibits cell proliferation and tumor growth in a variety of human cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2011;81(7):848–55. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.01.001
 117. Rossi A., Russo G., Puca A. et al. The antiretroviral nucleoside analogue abacavir reduces cell growth and promotes differentiation of human medulloblastoma cells. *Int J Cancer* 2009;125(1):235–43. DOI: 10.1002/ijc.24331
 118. Hecht M., Erber S., Harrer T. et al. Efavirenz has the highest anti-proliferative effect of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors against pancreatic cancer cells. *PLoS One* 2015;10(6):e0130277. DOI: 10.1371/journal.pone.0130277
 119. Sciamanna I., Landriscina M., Pittoggi C. et al. Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth. *Oncogene* 2005;24(24):3923–31. DOI: 10.1038/sj.onc.1208562
 120. Dong J.J., Zhou Y., Liu Y.T. et al. *In vitro* evaluation of the therapeutic potential of nevirapine in treatment of human thyroid anaplastic carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 2013;370(1–2):113–8. DOI: 10.1016/j.mce.2013.02.001
 121. Shang H., Zhao J., Yao J. et al. Nevirapine inhibits migration and invasion in dedifferentiated thyroid cancer cells. *Thorac Cancer* 2019;10(12):2243–52. DOI: 10.1111/1759-7714.13211
 122. Stefanidis K., Loutradis D., Vassiliou L.V. et al. Nevirapine induces growth arrest and premature senescence in human cervical carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 2008;111(2):344–9. DOI: 10.1016/j.ygyno.2008.08.006
 123. Zhang R., Zhang F., Sun Z. et al. LINE-1 retrotransposition promotes the development and progression of lung squamous cell carcinoma by disrupting the tumor-suppressor gene FGGY. *Cancer Res* 2019;79(17):4453–65. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0076
 124. Patnala R., Lee S.H., Dahlstrom J.E. et al. Inhibition of LINE-1 retrotransposon-encoded reverse transcriptase modulates the expression of cell differentiation genes in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2014;143(2):239–53. DOI: 10.1007/s10549-013-2812-7
 125. Hecht M., Harrer T., Büttner M. et al. Cytotoxic effect of efavirenz is selective against cancer cells and associated with the cannabinoid system. *AIDS* 2013;27(13):2031–40. DOI: 10.1097/QAD.0b013e3283625444
 126. Sciamanna I., Gualtieri A., Cossetti C. et al. A tumor-promoting mechanism mediated by retrotransposon-encoded reverse transcriptase is active in human transformed cell lines. *Oncotarget* 2013;4(12):2271–87. DOI: 10.18632/oncotarget.1403
 127. Chiou P.T., Ohms S., Board P.G. et al. Efavirenz as a potential drug for the treatment of triple-negative breast cancers. *Clin Transl Oncol* 2021;23(2):353–63. DOI: 10.1007/s12094-020-02424-5
 128. Marima R., Hull R., Dlamini Z. et al. Efavirenz induces DNA damage response pathway in lung cancer. *Oncotarget* 2020;11(41):3737–48. DOI: 10.18632/oncotarget.27725
 129. Brüning A., Jückstock J., Kost B. et al. Induction of DNA damage and apoptosis in human leukemia cells by efavirenz. *Oncol Rep* 2017;37(1):617–21. DOI: 10.3892/or.2016.5243
 130. Bellisai C., Sciamanna I., Rovella P. et al. Reverse transcriptase inhibitors promote the remodelling of nuclear architecture and induce autophagy in prostate cancer cells. *Cancer Lett* 2020;478:133–45. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.02.029
 131. Ly T.T.G., Yun J., Ha J.S. et al. Inhibitory effect of etravirine, a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, via anterior gradient protein 2 homolog degradation against ovarian cancer metastasis. *Int J Mol Sci* 2022;23(2):944. DOI: 10.3390/ijms23020944
 132. Islam S., Rahaman M.H., Yu M. et al. Anti-leukaemic activity of rilpivirine is mediated by Aurora A kinase inhibition. *Cancers (Basel)* 2023;15(4):1044. DOI: 10.3390/cancers15041044
 133. Weinrich S.L., Pruzan R., Ma L. et al. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat Genet* 1997;17(4):498–502. DOI: 10.1038/ng1297-498

134. Calado R., Young N. Telomeres in disease. *F1000 Med Rep* 2012;4:8. DOI: 10.3410/M4-8
135. Wang H., Zhou J., He Q. et al. Azidothymidine inhibits cell growth and telomerase activity and induces DNA damage in human esophageal cancer. *Mol Med Rep* 2017;15(6):4055–60. DOI: 10.3892/mmr.2017.6549
136. Kyo S., Takakura M., Fujiwara T. et al. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci* 2008;99(8):1528–38. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.00878.x
137. Jin R.R., Chao R., Xi Y.M. et al. Effects of AZT on leukemia cell line KG-1a proliferation and telomerase activity. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2012;20(2):277–81.
138. Palamarchuk A.I., Kovalenko E.I., Streltsova M.A. Multiple actions of telomerase reverse transcriptase in cell death regulation. *Biomedicines* 2023;11(4):1091. DOI: 10.3390/biomedicines11041091
139. Hsieh Y., Tseng J.J. Azidothymidine (AZT) inhibits proliferation of human ovarian cancer cells by regulating cell cycle progression. *Anticancer Res* 2020;40(10):5517–27. DOI: 10.21873/anticancerres.14564
140. Bondarev I.E., Khavinson V.K. Suppression of alternative telomere lengthening in cancer cells with reverse transcriptase inhibitors. *Adv Gerontol* 2016;29(2):218–21. DOI: 10.1134/s2079057016040020

Вклад авторов

О.А. Власова: написание текста статьи, проведение системного анализа, обобщение данных;
И.А. Антонова, Х.М. Магомедова: обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи, редактирование;
М.А. Усолкина: обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи;
К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, Т.Т. Валиев: проведение системного анализа, редактирование;
М.Г. Якубовская: написание текста статьи, проведение системного анализа, редактирование.

Authors' contributions

O.A. Vlasova: article writing, conducting system analysis, summarizing data;
I.A. Antonova, Kh.M. Magomedova: literature review on the topic of the article, article writing, editing;
M.A. Usolkina: literature review on the topic of the article, article writing;
K.I. Kirsanov, G.A. Belitsky, T.T. Valiev: conducting system analysis, editing;
M.G. Yakubovskaya: article writing, conducting system analysis, editing.

ORCID авторов / ORCID authors

О.А. Власова / O.A. Vlasova: <https://orcid.org/0000-0002-1498-849X>
И.А. Антонова / I.A. Antonova: <https://orcid.org/0009-0004-3482-8954>
Х.М. Магомедова / Kh.M. Magomedova: <https://orcid.org/0009-0004-8514-3859>
К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>
Г.А. Белицкий / G.A. Belitsky: <https://orcid.org/0000-0002-3167-7204>
Т.Т. Валиев / T.T. Valiev: <https://orcid.org/0000-0002-1469-2365>
М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00276).

Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 23-25-00276).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-29-39>

Наиболее распространенные формы рака и онкогенные папилломавирусы

Г.М. Волгарева*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24***Контакты:** Галина Михайловна Волгарева galina.volgareva@ronc.ru

В мировых рейтингах онкологической заболеваемости и смертности карциномам молочной и предстательной желез, легкого, а также толстой и прямой кишок принадлежат лидирующие позиции. Они составляют около 40 % вновь выявляемых случаев рака. Связь этих карцином с онкогенными вирусами папилломы человека (ВПЧ) активно изучается, но остается предметом дискуссий. На материалах метаанализов, выполненных по схеме «случай–контроль», проанализированы результаты детекции онкогенных ВПЧ в клинических образцах рака молочной и предстательной желез, легкого, толстой и прямой кишок; суммированы данные, полученные при попытках проверки активности геномов папилломавирусов в ВПЧ-положительных опухолях. Имеющиеся результаты подтверждают, что онкогенные ВПЧ являются факторами риска четырех перечисленных форм рака.

Ключевые слова: онкогенные папилломавирусы, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак легкого, рак толстой и прямой кишок

Для цитирования: Волгарева Г.М. Наиболее распространенные формы рака и онкогенные папилломавирусы. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):29–39.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-29-39>

The most common forms of cancer and oncogenic papillomaviruses

G.M. Volgareva*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia***Contacts:** Galina Mikhailovna Volgareva galina.volgareva@ronc.ru

Breast, prostate, lung as well as colorectal carcinomas belong to leading positions in the world cancer incidence and mortality rankings. They make up about 40 % of newly diagnosed cancers. Connection of these cancers with oncogenic human papilloma viruses (HPVs) is being examined intensively, however it remains subject for discussion. Basing on case-control meta-analyses data were examined on oncogenic HPV detection in clinical samples of breast, prostate, lung and colorectal carcinomas. Findings on HPV genome activities were summarized. The results available prove to oncogenic HPVs as risk factors of the four enumerated above carcinomas.

Keywords: oncogenic papillomaviruses, breast cancer, prostate cancer, lung cancer, colorectal cancer

For citation: Volgareva G.M. The most common forms of cancer and oncogenic papillomaviruses. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(2):29–39. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-29-39>

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) — распространенная инфекция, передаваемая половым путем. В тот или иной момент ими заражаются более 80 % всех жителей земли. Онкогенны 12 типов ВПЧ: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59-й. Они вызывают рак

в аногенитальной сфере и некоторые формы рака головы и шеи [1]. Вместе с тем онкогенные типы ВПЧ обнаруживаются и в карциномах других локализаций. В соответствии с данными экспертизы Международного агентства по изучению рака (МАИР) в зависимости от того, насколько обоснована роль ВПЧ как

этиологических агентов для этих карцином, все органы, в которых выявлены раковые опухоли с онкогенными ВПЧ, разделены на 3 группы:

- шейка матки, вульва, влагалище, половой член, анус, ротовая полость и ротоглотка (достаточно данных);
- гортань и слизистая оболочка глаза (ограниченные данные);
- пищевод, легкое, молочная, предстательная железы, мочевого пузыря, яичник, носовая полость и носовые синусы (недостаточно данных) [2].

К последней группе отнесены органы, в которых возникают наиболее распространенные формы рака, возглавляющие рейтинги мировой онкологической заболеваемости и смертности, – рак молочной железы (РМЖ), легкого (РЛ) и предстательной железы (РПЖ) [3]. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями и смертности от них в России эти формы рака также являются ведущими [4]. С момента опубликования МАИР упомянутой монографии предложенного в ней деления органов на группы не произошло [1, 5].

Прояснение роли ВПЧ в перечисленных карциномах актуально, во-первых, потому, что они возникают часто: в 2021 г. в мировой структуре онкологической заболеваемости РМЖ, РЛ и РПЖ составили более 30 % [3]. Во-вторых, созданы и успешно применяются профилактические вакцины против рака шейки матки (РШМ) [6–9]. Они могут использоваться и для предупреждения возникновения РМЖ, РЛ и РПЖ, если эти карциномы ассоциированы с ВПЧ. В-третьих, в мире неуклонно растут показатели онкологической заболеваемости и смертности; прогнозируется, что к 2040 г. заболеваемость увеличится на 47 % относительно 2020 г., наибольший рост ожидается в развивающихся странах (64–95 %); в экономически развитых странах рост данного показателя, предположительно, составит 32–56 % [3].

Цель обзора – анализ современных данных о роли ВПЧ в генезе наиболее распространенных форм рака: РМЖ, РЛ и РПЖ. Мы рассмотрим также данные об ассоциации с ВПЧ рака толстой и прямой кишки (колоректального рака, КРР), не упомянутого в классификации МАИР, но входящего в число лидеров в структуре мировой онкологической заболеваемости (заболеваемость КРР составляет 10 %) [3].

Первые работы, сообщавшие об обнаружении ВПЧ в РМЖ, РПЖ и КРР, опубликованы более 30 лет назад [10–12]. На возможную связь РЛ с ВПЧ впервые указал в 1979 г. К. Syrjanen, обнаруживший папилломы в бронхах [13]. Вопрос об ассоциации этих карцином с ВПЧ активно изучается, однако остается предметом дискуссий. Не единичны сообщения, опровергающие факт связи с ВПЧ карцином молочной железы [14–17], легкого [18, 19], предстательной железы [20, 21], толстой и прямой кишки [22–24].

МЕТААНАЛИЗЫ, ПОСВЯЩЕННЫЕ РОЛИ ОНКОГЕННЫХ ПАПИЛЛОМАВИРУСОВ В ВОЗНИКНОВЕНИИ НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ФОРМ РАКА

Множество публикаций о возможной связи упомянутых выше форм рака с онкогенными ВПЧ и противоречивые выводы из этих работ побудили нас обратиться к метаанализам, выполненным по схеме «случай–контроль».

Исследование «случай–контроль» в «Эпидемиологическом словаре» определяется как «аналитическое эпидемиологическое исследование лиц с определенной болезнью (в данном случае – с карциномой. – Г.В.) и лиц соответствующей контрольной группы, у которых заболевание отсутствует» [25]. Цель метаанализа – определить общую тенденцию. Существенное предварительное условие – исследования должны выдержать критическую оценку, в частности, по методическим параметрам. Основным итогом такого анализа – определение отношения шансов (ОШ), представляющего собой отношение двух шансов: шанса в пользу воздействия (онкогенного ВПЧ) среди «случаев» (т.е. онкологических больных), деленного на шанс в пользу воздействия среди «контролей» – образцов, которые в таких работах получают от здоровых индивидуумов, пациентов с незлокачественными новообразованиями или от онкологических больных, взятых в качестве «случаев», у которых во время операции помимо опухоли берут образец условно-нормальной ткани из оперируемого органа. Каждый из этих шансов вычисляется как отношение ВПЧ-положительных образцов к ВПЧ-отрицательным. Значение ОШ, равное или близкое к единице, свидетельствует о том, что изучаемое воздействие, в данном случае ВПЧ, не способствует возникновению заболевания. Доверительный интервал (ДИ) – вычисленный интервал с известной вероятностью (как правило, 95 %) того, что истинное значение ОШ попадает в данный интервал.

Степень неоднородности данных, включенных в метаанализ, оценивается с помощью статистики гетерогенности I^2 ; принято выделять низкую (до 25 %), умеренную (25–75 %) и высокую (75 % и выше) гетерогенность [26].

Далее приведены результаты трех метаанализов для РМЖ [27–29], трех – для РПЖ [30–32], двух – для РЛ [33, 34], а также трех – для КРР [35–37].

При поиске публикаций, на основании которых проводили анализ, авторы использовали электронные базы данных, в основном PubMed, Web of Science и Scopus. Нередко поиск продолжали, добавляя работы из ссылок в статьях, найденных в этих базах. В анализ в основном вошли англоязычные публикации. Исключение из первоначально отобранных работ проводили по следующим критериям: исследование не выполнено по схеме «случай–контроль»; тип публикации не соот-

ветствует задаче авторов (исключали тезисы конференций, обзоры, описания клинических случаев); отсутствуют четкие патологоанатомические описания материалов; отсутствуют данные о методах выявления ВПЧ; в обеих группах — и среди «случаев», и среди «контролей» — все образцы оказались ВПЧ-отрицательными; в несколько работ одного коллектива вошли повторяющиеся клинические образцы (при этом включали только одну из работ, в которых фигурировали эти данные). Также из анализа исключали исследования, в которых использовались материалы от ВИЧ-инфицированных пациентов или пациентов, получавших иммуносупрессоры. Методом обнаружения ВПЧ была, как правило, полимеразная цепная реакция (ПЦР) с разными праймерами. При этом некоторые авторы исключали работы, в которых применялись иные подходы [32, 34, 37]. Иногда в анализ входили исследования, в которых ВПЧ выявляли не только в ПЦР, но также с помощью метода гибридного захвата, гибридизации *in situ* или иммуноферментного анализа [30, 31, 33]. В качестве контроля в ряде работ использовали сыворотку крови, а в исследовании, в котором участвовали пациенты с РЛ, — бронхиальные смывы и конденсат выдыхаемого воздуха [31–33].

В РМЖ частота ВПЧ-положительных образцов в отдельных исследованиях, отобранных авторами метаанализов, колебалась от 0 до 86,2 % [27] (в работе С. Ren и соавт. — до 75 % [28], в работе U.A. Awan и соавт. — до 74 % [29]). Во всех трех метаанализах значение ОШ превысило единицу, свидетельствуя о том,

что ВПЧ способствовали онкогенезу в молочной железе (табл. 1).

Уместно упомянуть, что значения ОШ для РШМ, клинические образцы которого ВПЧ-положительны в 99 % случаев, составляют не менее 50 [5].

По данным С. Ren и соавт., умеренная гетерогенность данных этих исследований (38–52 %) снижалась, если анализ проводили в подгруппах с однородным по гистологическому типу контролем: с нормальной тканью молочной железы здоровых женщин (ОШ 8,78; 95 % ДИ 5,54–13,92; $P = 10$ %) или с доброкачественными новообразованиями данного органа (ОШ 4,91; 95 % ДИ 3,08–7,82; $P = 50$ %) [28].

Во всех трех исследованиях наиболее частым типом ВПЧ в РМЖ оказался ВПЧ 16-го типа (ВПЧ16), далее по частоте обнаружения следовали ВПЧ 18-го (ВПЧ18) и 33-го типов. В образцах РМЖ из Австралии, однако, преобладал ВПЧ18: он был обнаружен в 95,4 % всех ВПЧ-положительных случаев [29].

Частота ВПЧ-положительности РМЖ убывала в следующем ряду: Европа, 39,1 %; Африка, 31,8 %; Америка, 30,3 %; Австралия, 29,2 %; Азия, 22,7 % [29].

Результаты метаанализов, в которых изучалась ассоциация РПЖ с ВПЧ, представлены в табл. 2. Частота ВПЧ-положительности карцином в работах, включенных в эти анализы, колебалась от 0 до 75 % [30] (в исследовании M. Moghoofti и соавт. — до 67,7 % [31], в исследовании I.A. Tsydenova и др. — до 75 % [32]). Во всех трех цитируемых работах получены достоверные свидетельства в пользу того, что ВПЧ являются

Таблица 1. Вирусы папилломы человека (ВПЧ) в карциномах молочной железы

Table 1. Human papilloma viruses (HPVs) in breast carcinomas

Источник Source	Публикации Publications		Число «случаев», n^* Number of “cases”, n^*	Число «контролей», n^* Number of “controls”, n^*	Отношение шансов Odds ratio	95 % довери- тельный интервал 95 % confidence interval	Гетероген- ность, P , % Heterogeneity, P , %
	Всего найдено Total identified	Включено в анализ Included in the analysis					
J.M. Bae и соавт., 2016 [27] J.M. Bae et al., 2016 [27]	2446	22	1897 (394)	948 (75)	4,02	2,42–6,68	44,7
С. Ren и соавт., 2019 [28] C. Ren et al., 2019 [28]	8207	37	3607 (1097)	1728 (132)	6,22	4,25–9,12	52
U.A. Awan и соавт., 2023 [29] U.A. Awan et al., 2023 [29]	3156	45	4355 (1145)	2361 (163)	5,55	3,67–8,41	38

*Общее число ВПЧ-положительных образцов.

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: в скобках указано количество ВПЧ-положительных образцов.

*Total number of HPV-positive samples.

Note. Here and in tables 2–4: the number of HPV-positive samples is shown in brackets.

факторами риска развития РПЖ. В частности, это касается и исследования М. Moghoofei и соавт., где ОШ оказалось наименьшим среди упомянутых метаанализов (ОШ 1,281; $p = 0,026$) [31]. I.A. Tsydenova и соавт. представили результаты для двух подгрупп в зависимости от гистологического типа контрольных образцов – нормальной ткани предстательной железы или ткани доброкачественной дисплазии. Средние значения частоты ВПЧ-положительных образцов составили для РПЖ 25,8 %, для нормальной ткани предстательной железы – 9,2 %, для дисплазий – 17,4 %. Первый из двух подходов показал, что в присутствии ВПЧ растет риск возникновения карциномы ($p = 0,0000012$); при использовании в качестве контролей доброкачественных дисплазий различия между опытными и контрольными образцами были статистически незначимы ($p = 0,220$) [32].

Вирус папилломы человека 16-го типа обнаруживался в образцах РПЖ чаще, чем ВПЧ других типов, и значимо увеличивал риск развития карциномы (ОШ 1,60; 95 % ДИ 1,231–2,081; $p < 0,001$) [31].

Анализ, проведенный М. Moghoofei и соавт. в подгруппах, сформированных по географическому признаку, показал, что ассоциация с ВПЧ для РПЖ была наиболее выраженной в Океании и Азии: ОШ 21; 95 % ДИ 1,777–248,1; $p = 0,016$ и ОШ 14,697; 95 % ДИ 2,787–77,50; $p = 0,002$, соответственно. Что касается европейских случаев РПЖ, то для них ассоциация с ВПЧ оказалась статистически незначимой (ОШ 1,095; 95 % ДИ 0,912–1,313; $p = 0,331$) [31]. В метаанализе В. Yin и соавт. Европа, однако, охарактеризована как регион с достоверной ассоциацией РПЖ с ВПЧ (ОШ 2,29; 95 % ДИ 1,17–4,47), тогда как для случаев РПЖ из Океании значимая связь с ВПЧ не была выявлена [32]. Для прояснения причин этих несоответствий желательны дальнейшие исследования.

В табл. 3 приведены данные метаанализов, посвященных изучению ассоциации РЛ с ВПЧ. ВПЧ-положительные опухолевые образцы, включенные в эти исследования, составили от 0 до 72,4 % и до 55,6 % в работах, проанализированных W.M. Xiong и соавт. (2017) [33] и J. Karnosky и соавт. (2021) [34], соответственно. Значения ОШ в обоих исследованиях свиде-

Таблица 2. Вирусы папилломы человека (ВПЧ) в карциномах предстательной железы

Table 2. Human papilloma viruses (HPVs) in prostate carcinomas

Источник Source	Публикации Publications		Число «случаев», n^* Number of “cases”, n^*	Число «контролей», n^* Number of “controls”, n^*	Отношение шансов Odds ratio	95 % доверитель- ный интервал 95 % confidence interval	Гетероген- ность, P , % Heterogeneity, P , %
	Всего найденно Total identified	Включено в анализ Included in the analysis					
В. Yin и соавт., 2017 [30] B. Yin et al., 2017 [30]	348	24	971 (208)	1085 (115)	2,27	1,40–3,69	43
М. Maghoofei и соавт., 2019 [31] M. Maghoofei et al., 2019 [31]	14120	24	5546 (933)	7946 (1469)	1,281	1,030–1,594	61,23
I.A. Tsydenova и соавт., 2023 [32]** I.A. I.A. Tsydenova et al., 2023 [32]**	271	27	1607 (342)	1515 (160), в том числе 317 н. (30) и 1198 д. (130) 1515 (160), including 317 n. (30) and 1198 d. (130)	3,07 1,94	1,80–5,21 1,43–2,63	0 42,77

*Общее число ВПЧ-положительных образцов. **В анализе I.A. Tsydenova и соавт. среди 27 использованных работ 6 содержали контрольные образцы нормальной ткани предстательной железы, 17 – образцы доброкачественных дисплазий предстательной железы, 4 – образцы и нормальной ткани, и дисплазий. Авторы провели 2 анализа, в одном из которых сравнивали между собой образцы рака предстательной железы и нормальной ткани предстательной железы (отношение шансов – 3,07), а в другом – образцы рака предстательной железы и дисплазий (отношение шансов – 1,94).

Примечание. Н. – нормальная ткань предстательной железы; д. – дисплазия предстательной железы.

*Total number of HPV-positive samples. **In the analysis by I.A. Tsydenova et al., 6 of the 27 articles included control samples of normal prostate tissue, 17 – samples of benign prostatic dysplasias, 4 – samples of both normal tissues and dysplasias. The authors performed 2 analyses, in one they compared samples of prostate cancer and normal prostatic tissues (odds ratio 3.07), in the other they compared prostate cancer samples and dysplasias (odds ratio 1.94).

Note. N. – normal prostate tissue; d. – prostatic dysplasia.

Таблица 3. Вирусы папилломы человека (ВПЧ) в карциномах легкого**Table 3.** Human papilloma viruses (HPVs) in lung carcinomas

Источник Source	Число публикаций Number of publications	Число «случаев», n* Number of "cases", n*	Число «контролей», n* Number of "controls", n*	Отношение шансов Odds ratio	95 % доверительный интервал 95 % confidence interval	Гетерогенность, I ² , % Heterogeneity, I ² , %
W.M. Xiong и соавт., 2017 [33] W.M. Xiong et al., 2017 [33]	36	6980 (2415)	7474 (2059)	3,64	2,60–5,08	83,5
J. Karnosky и соавт., 2021 [34] J. Karnosky et al., 2021 [34]	15	1750 (548)	754 (42)	4,7	2,7–8,4	57,6

*Общее количество ВПЧ-положительных образцов.

*Total number of HPV-positive samples.

тельствовали о значимой роли ВПЧ как факторов риска РЛ. W.M. Xiong и соавт. провели анализ данных в подгруппах, сформированных в зависимости от типа вируса, и показали, что и ВПЧ16, и ВПЧ18 значительно повышают риск развития РЛ: ОШ 3,14 (95 % ДИ 2,07–4,76) и ОШ 2,25 (95 % ДИ 1,49–3,40), соответственно. Исследователи установили, что ВПЧ являются факторами риска возникновения РЛ разных гистологических типов – плоскоклеточных карцином (ОШ 5,66; 95 % ДИ 4,38–7,33; $p < 0,001$), аденокарцином (ОШ 5,39; 95 % ДИ 2,89–10,06; $p < 0,001$) и

мелкоклеточного рака (ОШ 6,74; 95 % ДИ 3,41–13,35; $p < 0,001$). Для аденоплоскоклеточного и крупноклеточного РЛ ассоциация с ВПЧ не подтвердилась [33].

О значительных региональных различиях средних частот обнаружения ВПЧ в РЛ сообщили J. Karnosky и соавт. Наивысший показатель, 16,6 %, они зафиксировали в Азии, а самый низкий – в Европе, – 7,0 % [34].

Результаты исследований ассоциации КРР с ВПЧ приведены в табл. 4.

Х.-Н. Zhang и соавт. обобщили данные о случаях КРР в Китае; в 10 отобранных ими работах ВПЧ-положительные

Таблица 4. Вирусы папилломы человека (ВПЧ) в карциномах толстой и прямой кишки**Table 4.** Human papilloma viruses (HPVs) in colorectal carcinomas

Источник Source	Публикации Publications		Число «случаев», n* Number of "cases", n*	Число «контролей», n* Number of "controls", n*	Отношение шансов Odds ratio	95 % доверительный интервал 95 % confidence interval	Гетерогенность, I ² , % Heterogeneity, I ² , %
	Всего найдено Total identified	Включено в анализ Included in the analysis					
Х.-Н. Zhang и соавт., 2018 [35] X.-H. Zhang et al., 2018 [37]	370	10	766 (346)	470 (40)	10,78	4,22–27,53	76
D.C. Damin и соавт., 2013 [36]** D.C. Damin et al., 2013 [35]**	Н/д N/a	5	Н/д N/a	Н/д N/a	10,04	3,7–27,5	Н/д N/a
L. Baandrup и соавт., 2014 [37]** L. Baandrup et al., 2014 [36]**	Н/д N/a	8	Н/д N/a	Н/д N/a	6	2,0–17,9	Н/д N/a

*Общее количество ВПЧ-положительных образцов. **Доступны только абстракты работ.

Примечание. Н/д – нет данных.

*Total number of HPV-positive samples. **Only abstracts available.

Note. N/a – data not available.

опухолевые образцы составили от 21,8 до 70,7 % [35]. Отношение шансов в этом исследовании оказалось равным 10,78 (95 % ДИ 4,22–27,53), что указывало на ВПЧ как фактор риска развития КРР. Анализ по подгруппам, сформированным по географическому принципу, позволил определить источник высокой гетерогенности результатов отдельных работ в этом метаанализе ($I^2 = 76\%$): особенно высокой оказалась неоднородность данных западных регионов страны ($I^2 = 92\%$). В ВПЧ-положительных случаях КРР преобладали ВПЧ16 и ВПЧ18: первый присутствовал в 57,9–100 % образцов, второй – в 0–39,7 %. Среди аденом толстого кишечника достоверного превышения частоты ВПЧ-положительных случаев по сравнению с контрольными образцами в этом исследовании зафиксировано не было ($p > 0,05$).

Два других коллектива авторов, обобщивших результаты пяти и восьми оригинальных исследований, также пришли к выводу, что ВПЧ являются факторами риска развития КРР [36, 37]. В этих работах представлены образцы КРР из разных регионов мира. По данным D.C. Damin и соавт., средняя частота ВПЧ-положительных образцов КРР составила 31,9 % (95 % ДИ 19,3–47,9). Наименьшим этот показатель был в Европе (14,1 % случаев, 95 % ДИ 4,9–34,1), наивысшим – в Южной Америке (58,3 % случаев, 95 % ДИ 45,5–69,9). В образцах КРР пациентов из Южной Америки чаще всего обнаруживался ВПЧ 16-го типа, а у больных из Азии и Европы – ВПЧ18 [36]. Согласно результатам L. Vaandrup и соавт., Южная Америка тоже оказалась регионом с наивысшей частотой ВПЧ в КРР (45,1 %; 95 % ДИ 21,9–69,4 %), далее в порядке убывания – Азия (39,2 %; 95 % ДИ 20,3–60,0 %) и Ближний и Средний Восток (32,2 %; 95 % ДИ 1,1–79,3 %) [37].

МЕТОДИЧЕСКИЕ МОМЕНТЫ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ПАПИЛЛОМАВИРУСОВ В КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ КАК ИСТОЧНИК ВАРИАБЕЛЬНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большая вариабельность результатов разных исследователей, пытавшихся обнаружить ДНК ВПЧ в той или иной форме рака, заслуживает отдельного рассмотрения. Ее причинами могут быть прежде всего этногеографическая неоднородность конкретной формы рака в разных регионах и преобладание в этих регионах разных факторов риска. Источниками большой вариабельности результатов разных исследовательских коллективов, занимавшихся выявлением ВПЧ в карциномах одной и той же локализации, могут служить также технические моменты постановки ПЦР – основного метода детекции ВПЧ в клинических материалах. Они были проанализированы в работе N. Kisseljova и соавт., проведенной на раке яичников [38]. Используя 10 пар праймеров к различным генам ВПЧ, в зависимости от того, с какой именно парой праймеров ставили реакцию, исследователи получили от 0 до 29 % ВПЧ-положительных образцов; преобладал ВПЧ16. Макси-

мальный результат получен при постановке гнездовой ПЦР с праймерами MY/GP – 53 % ВПЧ-положительных образцов. Все варианты постановки реакции, кроме гнездовой ПЦР с праймерами MY/GP, по мнению авторов, давали значительное количество ложноотрицательных результатов.

Работа N. Kisseljova и соавт. важна для понимания причин вариабельности результатов, полученных разными группами исследователей для карцином одной локализации. В ней на одной и той же выборке опухолей в зависимости от метода детекции ВПЧ в условиях одной лаборатории (при едином опыте постановки ПЦР) положительный результат колебался от 0 до 53 %. Отметим, что универсального подхода к детекции ВПЧ в клинических материалах нет, хотя работы в этом направлении ведутся [39].

АКТИВНОСТЬ ГЕНОМОВ ПАПИЛЛОМАВИРУСОВ В КАРЦИНОМАХ МОЛОЧНОЙ И ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗ, ЛЕГКОГО, ТОЛСТОЙ И ПРЯМОЙ КИШОК

Обнаружение в ДНК ВПЧ-положительных раковых опухолях транскриптов вирусных онкогенов *E6* и *E7* и/или соответствующих им онкобелков – веский аргумент в пользу участия этих вирусов в онкогенезе. Таким аргументом может служить и инактивация некоторых белков клетки-хозяина, в частности, супрессоров опухолевого роста *p53* и *pRB*, вызываемая онкобелками *E6* и *E7* ВПЧ, соответственно [40]. Суррогатным маркером онкогена *E7* ВПЧ в цервикальном эпителии признан белок клетки-хозяина *p16^{INK4a}* [41]. На активность генома ВПЧ в ДНК ВПЧ-положительных раковых опухолях могут указывать также гистопатологические и клинические различия между ДНК ВПЧ-положительными и отрицательными новообразованиями. Далее представлены имеющиеся в литературе данные, полученные при попытках оценить активность геномов папилломавирусов в ДНК ВПЧ-положительных случаях РМЖ, РЛ, РПЖ и КРР.

Рак молочной железы. Попытки выявить транскрипцию вирусных онкогенов *E6* и *E7* в ДНК ВПЧ-положительных образцах РМЖ предпринимали несколько исследовательских групп [15, 42–46]. В единственной из них результаты оказались отрицательными: об отсутствии соответствующих транскриптов сообщили О.М. Gannon и соавт. (2015): ВПЧ-положительными оказались 5 из 80 образцов РМЖ ДНК; транскриптов, соответствующих вирусным онкогенам *E6* и *E7*, ни в одном из них выявлено не было [15]. Неоднократно в ДНК ВПЧ-положительных тканях РМЖ обнаруживались онкобелки *E6* и *E7* ВПЧ с помощью антител к этим белкам [42, 43, 45, 46]. Так, J.S. Lawson и соавт. проанализировали данные о 855 образцах РМЖ пациентов из Австралии, содержащиеся в «Атласе ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA) и обнаружили 30 (3,5 %) транскриптов ВПЧ низкого риска и 20 (2,3 %) транскриптов ВПЧ

высокого риска; среди последних преобладал ВПЧ18 [42]. В собственных экспериментах экспрессию белка E7 они исследовали на неслучайной группе женщин, у которых были последовательно выявлены сначала доброкачественные, а позднее — злокачественные новообразования молочной железы. При иммуногистохимическом окрашивании всех образцов, как ДНК-положительных (60 % случаев), так и ДНК-отрицательных, вирусный онкобелок E7 обнаружен в 72 % образцов доброкачественных новообразований и 59 % образцов РМЖ. Нередкими были случаи, когда онкобелок E7 выявлялся в доброкачественном новообразовании, но отсутствовал или был представлен крайне слабо в РМЖ, развившемся в дальнейшем у этой пациентки.

О совпадении результатов, подтверждающих экспрессию онкогенов E6 и E7 ВПЧ16, полученных с помощью ПЦР с обратной транскрипцией, с результатами иммуногистохимического анализа сообщили S. Islam и соавт. [43].

J.S. Lawson и соавт. предприняли попытку подтвердить полученные ими данные, свидетельствующие об экспрессии онкобелка E7 ВПЧ18 в доброкачественных и злокачественных новообразованиях РМЖ, путем иммуногистохимической детекции p16^{INK4a} в этих новообразованиях [42]. Вопреки ожиданиям, авторы не зафиксировали достоверных различий в экспрессии p16^{INK4a} между нормальными тканями молочной железы, доброкачественными новообразованиями в данном органе и РМЖ; не было обнаружено и различия между ВПЧ-положительными и ВПЧ-отрицательными образцами РМЖ. В дальнейшем В. Viesaga и соавт. выявили гиперэкспрессию p16^{INK4a} в двух ВПЧ16-положительных образцах протокового РМЖ [47]. В целом целесообразно продолжить изучение экспрессии p16^{INK4a} в ВПЧ-положительном РМЖ.

N. Khodabandehlou и соавт. оценили статус белков-супрессоров опухолевого роста pRb и p53 в ДНК ВПЧ-положительном РМЖ [44]. Среди 72 опухолевых образцов, из которых ВПЧ-положительными были около 50 % образцов и преобладал ВПЧ18, с помощью иммуноферментного анализа авторы выявили снижение содержания этих белков-супрессоров опухолевого роста в ВПЧ-положительных тканях РМЖ ($p < 0,001$ для обоих белков). О достоверном подавлении экспрессии p53 в содержащих ДНК канцерогенных ВПЧ образцах РМЖ сообщили Y.-W. Wang и соавт., использовавшие иммуногистохимический метод; что касается pRb, то различий в содержании этого супрессора опухолевого роста между ВПЧ-положительными и ВПЧ-отрицательными образцами РМЖ они не наблюдали [48]. Случаи нарушения функционирования многих других генов клетки-хозяина в ВПЧ-положительном РМЖ мы рассмотрели ранее [49].

Несколько групп исследователей сравнивали ДНК ВПЧ-положительные и отрицательные случаи РМЖ по клиническим параметрам. С. Kroupis и соавт. установили, что пациентки с ВПЧ-положительным РМЖ

(у них преобладал ВПЧ16) имели средний возраст 38 лет (35–51 год), тогда как женщины с ВПЧ-отрицательным — 53 года (44–63 года) ($p = 0,001$) [50]. J.S. Lawson и соавт. проанализировали группу больных РМЖ, у которых ранее была диагностирована дисплазия шейки матки [42]. У таких пациенток зафиксирован достоверно более молодой возраст заболевания РМЖ по сравнению со средним для австралийской популяции возрастом выявления этого заболевания (51 год по сравнению с 60 годами); РМЖ в этой неслучайной выборке развивался почти у каждой 2-й женщины, ВПЧ-положительными оказались 78,6 % образцов РМЖ; преобладающим и в цервикальном эпителии, и в РМЖ был ВПЧ18. О худшем прогнозе нелеченого РМЖ, положительного по ДНК ВПЧ высокого риска, по сравнению с ВПЧ-отрицательными случаями, сообщили S. Islam и соавт., применившие метод Каплана–Майера ($p = 0,04$) [43]. Аналогичную тенденцию авторы выявили и для леченых больных, однако здесь различия в выживаемости между ВПЧ-положительными и ВПЧ-отрицательными группами РМЖ оказались недостоверными ($p = 0,13$). М. Makvandi и соавт., сопоставив ВПЧ-положительные и отрицательные случаи РМЖ (в выборке из 100 образцов рака ВПЧ-положительными были 7 образцов), отметили, что в присутствии вирусного генома чаще наблюдалось проникновение опухолевых клеток в кровеносные и лимфатические сосуды, а также в перинеуральное пространство; ВПЧ-положительные образцы характеризовались более выраженной утратой черт дифференцировки опухолевых клеток; эти группы авторы сравнили также по экспрессии Ki67, рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) и рецепторов эстрогена и прогестерона. Для всех этих параметров различия оказались недостоверными ($p > 0,05$). Тем не менее авторы заключили, что ВПЧ причастен к этиологии РМЖ, и рекомендовали для прояснения несоответствий продолжать исследования [51].

Рак предстательной железы. Известны 2 работы, в которых изучалась активность геномов онкогенных ВПЧ в клетках дисплазий и карцином предстательной железы, и было подтверждено ее наличие [52, 53]. Оба авторских коллектива проверяли присутствие в этих клетках вирусного онкобелка E7, тканевые образцы окрашивали моноклональными антителами Cervitax, реагирующими с белком E7 широкого спектра онкогенных ВПЧ.

В ретроспективном исследовании австралийские исследователи W.K. Glenn и соавт. выясняли, как во времени меняется активность генома ВПЧ. Для этого они отобрали группу из 28 больных РМЖ, у которых до обнаружения карциномы наблюдалась доброкачественная дисплазия этого органа и сохранились удаленные хирургически материалы и дисплазии, и карциномы. Интервал между операциями составил от 1 до 10 лет. В ходе ПЦР онкоген E7 ВПЧ был обнаружен в 82 % образцов дисплазий и 68 % образцов РМЖ.

Преобладал ВПЧ18, реже встречался ВПЧ16. Онкобелок E7 ВПЧ типов высокого риска выявлен в 23 (82 %) образцах дисплазий и только в 8 (29 %) образцах РПЖ [52]. Эти результаты послужили основанием для заключения, что в РПЖ онкогенные ВПЧ могут быть активны только на самых ранних стадиях онкогенеза; это отличает данную ситуацию от событий в эпителии шейки матки.

С результатами исследования W.K. Glenn и соавт. согласуются данные M.Y. Ahmed и соавт., полученные при изучении тканей предстательной железы английских пациентов [53]. На выборке из 49 операционных материалов от разных мужчин, включавшей 35 дисплазий и 14 аденокарцином, с помощью ПЦР и последующего секвенирования по Сэнгеру в дисплазиях предстательной железы ДНК ВПЧ типов высокого риска обнаружены в 31,4 % (в 11 из 35) образцов, а в РПЖ — в 35,7 % (5 из 14). В дисплазиях преобладал ВПЧ 35-го типа, в РПЖ — ВПЧ16, ВПЧ 35-го и 56-го типов. Все 49 образцов были изучены иммуногистохимически; положительная реакция с антителами к E7 канцерогенных ВПЧ зафиксирована для всех ДНК ВПЧ-положительных дисплазий и карцином, ни один из ДНК ВПЧ-отрицательных образцов антителами к вирусному онкобелку E7 не окрашивался.

Рак легкого. Исследование J.L. Wang и соавт. проведено на клинических образцах 210 аденокарцином легкого, диагностированных у тайваньских женщин [54]. С помощью гнездовой ПЦР, детекции главного белка L1 капсида ВПЧ16 и ВПЧ18 в иммуногистохимическом тесте, а также путем иммуногистохимического выявления онкобелка E6 ВПЧ16 и ВПЧ18 (с помощью антител клона С1Р5, Abcam, Великобритания) выявлено, что ВПЧ-положительными были 35,2 % случаев. Совпадение результатов этих трех тестов оказалось неполным: так, результаты двух тестов с антителами совпали в 72,5 % случаев; вместе с тем ассоциация между белками L1 и E6 в исследованных материалах была значимой ($p = 0,0012$). В случае, когда РЛ был ВПЧ-положительным, опухоль достоверно чаще имела меньший размер и оказывалась локализованной, чем при ВПЧ-отрицательном РЛ ($p = 0,002$ и $p = 0,022$, соответственно). Для пациенток с ВПЧ-положительными опухолями были характерны лучшие показатели выживаемости ($p = 0,023$). По результатам проведенной работы авторы оценили ВПЧ-статус опухоли как независимый прогностический фактор общей выживаемости больных аденокарциномой легкого. Результаты этого исследования, свидетельствующие об ассоциации некоторых случаев РЛ у женщин с канцерогенными ВПЧ, представляют интерес в связи с высокой заболеваемостью данной формой рака среди некурящих — до 30 % всех случаев РЛ [55, 56].

Аденокарциномы легкого у латиноамериканских пациентов, изученные L. Rojas и соавт. методом ДНК-зондирования (INNO-LiPA platform), оказались ДНК ВПЧ-положительными в 26 % случаев (34 из 133 образцов);

матричная РНК (мРНК) онкогенов E6/E7 выявлена в ходе ПЦР с обратной транскрипцией в 82,3 % (в 28 из 34) образцов [57]. Показатели безрецидивной выживаемости больных с ВПЧ-положительными опухолями оказались значимо более высокими, чем у больных с ВПЧ-отрицательным РЛ: 14,3 мес по сравнению с 9,2 мес ($p = 0,001$). Пациентов лечили препаратами из группы ингибиторов иммунных контрольных точек (что усиливает активность цитотоксических Т-лимфоцитов). Оказалось, что показатели 2-летней общей выживаемости больных с ВПЧ-положительными опухолями более чем на 25 % выше, чем у больных, у которых ВПЧ в опухолевой ткани отсутствовал ($p = 0,008$). Клинические наблюдения L. Rojas и соавт. подтвердили их исходное предположение, что в РЛ онкогенные ВПЧ приносят новые эпитопы, и это влияет на течение онкогенеза.

Колоректальный рак. T.-H. Chen и соавт. обнаружили ДНК ВПЧ16 с помощью гнездовой ПЦР в 11 из 69 (16 %) образцов КРР; полученные результаты они подтвердили методом гибридизации *in situ*. Окрашивание моноклональными антителами к E6 ВПЧ16 (Santa Cruz Biotechnology, США) позволило авторам выявить онкобелок E6 в 8 из 11 (73 %) ДНК ВПЧ16-положительных образцов КРР. Присутствие онкобелка E6 они зафиксировали также в окружающих КРР нормальных тканях — фибробластах, лимфоцитах, клетках эндотелия [58].

M.R. Ambrosio и соавт. описали случай редкого плоскоклеточного рака толстого кишечника, оказавшегося ДНК ВПЧ16-положительным [59]. Активность генома вируса авторы продемонстрировали с помощью мРНК-гибридизации *in situ* (использовали RNAscope® assay, Bio-Techne Corporation, США) — коммерческий набор, позволяющий идентифицировать *in situ* мРНК E6/E7 ВПЧ 18 типов, включая все канцерогенные типы ВПЧ). На то, что в опухоли присутствовал онкобелок E7 ВПЧ16, указывали также положительные результаты иммуногистохимического окрашивания антителами к клеточному белку p16^{INK4a} как хирургически удаленной опухоли, так и регионарных лимфатических узлов.

Q. Qiu и соавт. сопоставили транскрипционную активность клеточных генов в ДНК ВПЧ-положительных и отрицательных образцах КРР в ПЦР с обратной транскрипцией [60]. Среди 47 образцов аденокарцином толстой и прямой кишок 15 (31,9 %) образцов в ходе иммуногистохимического анализа охарактеризованы ими как ВПЧ-положительные, при этом использованы моноклональные антитела к эпитопу белка L1 капсида ВПЧ, общему для 6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 51, 52, 56 и 58-го типов ВПЧ (клон K1N8, Abcam, Великобритания). Анализ экспрессии генов проведен с применением коммерческих наборов TaqMan®. Оказалось, что в ВПЧ-положительных случаях в раковых клетках 39 генов экспрессировались сильнее, чем в ВПЧ-отрицательных, а экспрессия 17 генов снижалась по сравнению с ВПЧ-отрицательными опухолями. В 1-ю группу

вошли, в частности, гены *MYC* (онкоген с широким спектром функций), *WNT-5A* (кодирует сигнальный гликопротеин, участвующий в генезе многих форм рака; его роль до конца не изучена) и *AXIN2* (кодирует белок, участвующий в регуляции сигнального пути Wnt/ β -катенин; причастен к контролю пролиферации и миграции клеток, апоптоза и других процессов).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возможность ассоциации с онкогенными ВПЧ РМЖ, РЛ, РПЖ и КРР интенсивно изучается. Актуальность прояснения этого вопроса в настоящее время возросла, так как созданы вакцины, успешно применяемые для профилактики рака шейки матки. В случае подтверждения ассоциация с ВПЧ четырех распространенных карцином, рассмотренных в настоящем обзоре, открывается перспектива снижения заболеваемости также и этими формами рака.

Большое число работ, посвященных данной проблеме, и неоднородные результаты, полученные разными исследовательскими коллективами, побудили нас обратиться к метаанализам работ, выполненных по схеме «случай–контроль». Результаты всех опубликованных метаанализов подтверждают, что онкоген-

ные ВПЧ являются факторами риска развития данных карцином. Неоднородность результатов о доле ДНК ВПЧ-положительных случаев в исследованиях разных авторов может быть обусловлена, среди прочего, и техническими моментами при лабораторной детекции ВПЧ.

В подавляющем большинстве работ, в которых с помощью того или иного метода оценивалась активность генома ВПЧ в ДНК ВПЧ-положительных образцах РМЖ, РПЖ, РЛ и КРР, получены данные, свидетельствующие о том, что ВПЧ присутствует в опухолевой ткани не в качестве «пассажира»; его геном транскрибируется, нарабатываются онкобелки Е6 и Е7, меняется транскрипционная активность ряда генов клетки-хозяина. Карциномы с положительным ВПЧ-статусом, по данным некоторых авторов, отличаются от ВПЧ-отрицательных опухолей определенными гистопатологическими и клиническими характеристиками.

Согласно имеющимся данным можно предположить, что профилактическая ВПЧ-вакцинация позволит снизить частоту заболеваемости не только РШМ, раком вульвы, вагины, пениса, ануса и головы и шеи, но также РЛ, РМЖ, РПЖ и КРР.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Scott-Wittenborn N., Fakhry C. Epidemiology of HPV related malignancies. *Semin Radiat Oncol* 2021;31(4):286–96. DOI: 10.1016/j.semradonc.2021.04.001
- Human papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2007;90:1–636.
- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660
- Злокачественные новообразования в России в 2022 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 neoplasms in Russia in 2022 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2022. 252 p. (In Russ.).
- A review of human carcinogens. Biological agents. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2011;100(Part B):261–320.
- Zur Hausen H. Papillomaviruses – to vaccination and beyond. *Biochemistry (Mosc.)* 2008;73(5):498–503. DOI: 10.1134/S0006297908050027
- Bergman H., Buckley B.S., Villanueva G. et al. Comparison of different human papillomavirus (HPV) vaccine types and dose schedules for prevention of HPV-related disease in females and males. *Cochrane Database Syst Rev* 2019;2019(11):CD013479. DOI: 10.1002/14651858.CD013479
- Brisson M., Kim J.J., Karen Canfell K. et al. Impact of HPV vaccination and cervical screening on cervical cancer elimination: a comparative modelling analysis in 78 low-income and lower-middle-income countries. *Lancet* 2020;395(10224):575–90. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30068-4
- Mo Y., Ma J., Zhang H. et al. Prophylactic and therapeutic HPV vaccines: current scenario and perspectives. *Front Cell Infect Microbiol* 2022;12:909223. DOI: 10.3389/fcimb.2022.909223
- Di Lonardo A., Venuti A., Marcante M.L. Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992;21(2):95–100. DOI: 10.1007/BF01836955
- McNicol P.J., Dodd J.G. Detection of human papillomavirus DNA in prostate gland tissue by using the polymerase chain reaction amplification assay. *J Clin Microbiol* 1990;28(3):409–12. DOI: 10.1128/jcm.28.3.409-412.1990.
- Kirgan D., Manalo P., McGregor B. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus antigen in human colon neoplasms. *J Surg Res* 1990;48(5):397–402. DOI: 10.1016/0022-4804(90)90002-j
- Syrjanen K.J. Condylomatous changes in neoplastic bronchial epithelium. Report of a case. *Respiration* 1979;38(5):299–304. DOI: 10.1159/000194095
- Hedau S., Kumar U., Hussain S. et al. Breast cancer and human papillomavirus infection: no evidence of HPV etiology of breast cancer in Indian women. *BMC Cancer* 2011;11:27. DOI: 10.1186/1471-2407-11-27
- Gannon O.M., Antonsson A., Milevskiy M. et al. No association between HPV positive breast cancer and expression of human papilloma viral transcripts. *Sci Rep* 2015;5:18081. DOI: 10.1038/srep18081
- Bakhtyirzadeh S., Hosseini S., Yaghoobi R. et al. Almost complete lack of human cytomegalovirus and human papillomaviruses genome in benign and malignant breast lesions in Shiraz, southwest of Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017;18(12):3319–24. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.12.3319

17. Bønlokke S., Blaakær J., Steiniche T. et al. Evidence of no association between human papillomavirus and breast cancer. *Front Oncol* 2018;8:209. DOI: 10.3389/fonc.2018.00209
18. Galvan A., Noci S., Taverna F. et al. Testing of human papillomavirus in lung cancer and non-tumor lung tissue. *BMC Cancer* 2012;12:512. DOI: 10.1186/1471-2407-12-512.
19. Colombara D., Manhart L., Carter J. et al. Absence of an association of human polyomavirus and papillomavirus infection with lung cancer in China: a nested case-control study. *BMC Cancer* 2016 Jun 1;16:342. DOI: 10.1186/s12885-016-2381-3
20. Yow M., Tabrizi S., Severi G. et al. Detection of infectious organisms in archival prostate cancer tissues. *BMC Cancer* 2014;14:579. DOI: 10.1186/1471-2407-14-579
21. Aydin M., Bozkurt A., Cikman A. et al. Lack of evidence of HPV etiology of prostate cancer following radical surgery and higher frequency of the Arg/Pro genotype in Turkish men with prostate cancer. *Int Braz J Urol* 2017;43(1):36–46. DOI: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2015.0429
22. Lorenzon L., Mazzetta F., Pilozi E. et al. Human papillomavirus does not have a causal role in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2015;21(1):342–50. DOI: 10.3748/wjg.v21.i1.342
23. Gazzaz F., Mosli M., Jawa H., Sibiany A. Detection of human papillomavirus infection by molecular tests and its relation to colonic polyps and colorectal cancer. *Saudi Med J* 2016;37(3):256–61. DOI: 10.15537/smj.2016.3.13514
24. Libera L., de Siqueira T., Santos I. et al. Detection of human papillomavirus and the role of p16^{INK4a} in colorectal carcinomas. *PLoS One* 2020;15(6):e0235065. DOI: 10.1371/journal.pone.0235065
25. Эпидемиологический словарь. Под ред. Дж.М. Ласта. М., 2009. *Epidemiological dictionary*. Ed. by J.M. Last. Moscow, 2009. (In Russ.).
26. Суворов А.Ю., Латушкина И.В., Гуляева К.А. и др. Базовые аспекты мета-анализа. Ч. 1. Семеновский вестник 2023;14(1):4–14. DOI: 10.47093/2218-7332.2023.14.1.4-14
Suvorov A.Yu., Latushkina I.V., Gulyaeva K.A. et al. Basic aspects of meta-analysis. Part 1. *Sechenovskij vestnik = Sechenov Medical Journal* 2023;14(1):4–14. (In Russ.). DOI: 10.47093/2218-7332.2023.14.1.4-14
27. Bae J.-M., Kim E.H. Human papillomavirus infection and risk of breast cancer: a meta-analysis of case-control studies. *Infect Agent Cancer* 2016;11:14. DOI: 10.1186/s13027-016-0058-9
28. Ren C., Zeng K., Wu C. et al. Human papillomavirus infection increases the risk of breast carcinoma: a large-scale systemic review and meta-analysis of case-control studies. *Gland Surg* 2019;8(5):486–500. DOI: 10.21037/gs.2019.09.04
29. Awan U.A., Khattak A.A., Ahmed N. et al. An updated systemic review and meta-analysis on human papillomavirus in breast carcinogenesis. *Front Oncol* 2023;13:1219161. DOI: 10.3389/fonc.2023.1219161
30. Yin B., Liu W., Yu P. et al. Association between human papillomavirus and prostate cancer: a meta-analysis. *Oncol Lett* 2017;14(2):1855–65. DOI: 10.3892/ol.2017.6367
31. Moghoofei M., Keshavarz M., Ghorbani S. et al. Association between human papillomavirus infection and prostate cancer: a global systematic review and meta-analysis. *Asia Pac J Clin Oncol* 2019;15(5):e59–67. DOI: 10.1111/ajco.13124
32. Tsydenova I.A., Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., Litviakov N.V. Human papillomavirus and prostate cancer: systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2023;13(1):16597. DOI: 10.1038/s41598-023-43767-7
33. Xiong W.M., Xu Q.P., Li X. et al. The association between human papillomavirus infection and lung cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8(56):96419–32. DOI: 10.18632/oncotarget.21682
34. Karnosky J., Dietmaier W., Knuettel H. et al. HPV and lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Rep (Hoboken)* 2021;4(4):e1350. DOI: 10.1002/cnr2.1350
35. Zhang X.-H., Wang W., Wang Y.-Q. et al. Human papillomavirus infection and colorectal cancer in the Chinese population: a meta-analysis. *Colorectal Dis* 2018;20(11):961–9. DOI: 10.1111/codi.14416
36. Damin D.C., Ziegelmann P.K., Damin A.P. Human papillomavirus infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Colorectal Dis* 2013;15(8):e420–8. DOI: 10.1111/codi.12257
37. Baandrup L., Thomsen L.T., Olesen T.B. et al. The prevalence of human papillomavirus in colorectal adenomas and adenocarcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2014;50:1446–61. DOI: 10.1016/j.ejca.2014.01.019
38. Kisseljova N., Zhordania K., Fedorova M., Vinokurova S. Detection of human papillomavirus prevalence in ovarian cancer by different test systems. *Intervirol* 2019;62(5–6):198–204. DOI: 10.1159/000506050
39. Eklund C., Mühr L.S.A., Lagheden C. et al. The 2019 HPV Labnet international proficiency study: need of global human papillomavirus proficiency testing. *J Clin Virol* 2021;141:104902. DOI: 10.1016/j.jcv.2021.104902
40. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):690–8. DOI: 10.1093/jnci/92.9.690
41. Sano T., Oyama T., Kashiwabara K. et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998;153(6):1741–8. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65689-1
42. Lawson J.S., Glenn W.K., Salyakina D. et al. Human papilloma viruses and breast cancer. *Front Oncol* 2015;5:277. DOI: 10.3389/fonc.2015.00277
43. Islam S., Dasgupta H., Roychowdhury A. et al. Study of association and molecular analysis of human papillomavirus in breast cancer of Indian patients: Clinical and prognostic implication. *PLoS One* 2017;12(2):e0172760. DOI: 10.1371/journal.pone.0172760
44. Khodabandehlou N., Mostafaei S., Etemadi A. et al. Human papilloma virus and breast cancer: the role of inflammation and viral expressed proteins. *BMC Cancer* 2019;19(1):61. DOI: 10.1186/s12885-019-5286-0
45. Akil N., Yasmeen A., Kassab A. et al. High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: a tissue microarray study. *Br J Cancer* 2008;99(3):404–7. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604503
46. Salman N.A., Davies G., Majidy F. et al. Association of high risk human papillomavirus and breast cancer: a UK based study. *Sci Rep* 2017;7:43591. DOI: 10.1038/srep43591
47. Biesaga B., Janecka-Widła A., Kołodziej-Rzepa M. et al. Low frequency of HPV positivity in breast tumors among patients from south-central Poland. *Infect Agent Cancer* 2021;16(1):67. DOI: 10.1186/s13027-021-00405-z
48. Wang Y.-W., Zhang K., Zhao S. et al. HPV status and its correlation with BCL2, p21, p53, Rb, and survivin expression in breast cancer in a Chinese population. *BioMed Res Int* 2017;2017:6315392. DOI: 10.1155/2017/6315392
49. Волгарева Г.М. Ассоциация рака молочной железы с онкогенными папилломавирусами: аргументы за и против. *Успехи молекулярной онкологии* 2023;10(1):18–24. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-18-24
Volkareva G.M. Breast cancer association with oncogenic papillomaviruses: arguments pro and con. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(1):18–24. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-18-24
50. Kroupis C., Markou A., Vourlidis N. et al. Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. *Clin Biochem* 2006;39(7):727–31. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2006.03.005
51. Makvandi M., Rashno M., Faghhihloo E. et al. Low presence of papillomavirus and its lack of correlation with clinicopathological factors in breast cancer: a case control study. *Iran J Microbiol* 2023;15(4):585–93. DOI: 10.18502/ijm.v15i4.13513
52. Glenn W.K., Ngan C.C., Amos T.G. et al. High risk human papilloma viruses (HPVs) are present in benign prostate tissues before development of HPV associated prostate cancer. *Infect Agent Cancer* 2017;12:46. DOI: 10.1186/s13027-017-0157-2

53. Ahmed M.Y., Salman N.A., Sandhu S. et al. Detection of high-risk human papillomavirus in prostate cancer from a UK based population. *Sci Rep* 2023;13(1):7633. DOI: 10.1038/s41598-023-34734-3
54. Wang J.L., Fang C.I., Wang M. et al. Human papillomavirus infection as a marker to predict overall survival in lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2014;134(1):65–71. DOI: 10.1002/ijc.28349
55. Rait G., Horsfall L. Twenty-year sociodemographic trends in lung cancer in non-smokers: a UK-based cohort study of 3.7 million people. *Cancer Epidemiol* 2020;67:101771. DOI: 10.1016/j.canep.2020.101771
56. Ochman B., Kiczmer P., Ziora P. et al. Incidence of concomitant neoplastic diseases, tumor characteristics, and the survival of patients with lung adenocarcinoma or squamous cell lung carcinoma in tobacco smokers and non-smokers-10-year retrospective single-centre cohort study. *Cancers (Basel)* 2023;15(6):1896. DOI: 10.3390/cancers15061896
57. Rojas L., Mayorga D., Ruiz-Patino A. et al. Human papillomavirus infection and lung adenocarcinoma: special benefit is observed in patients treated with immune checkpoint inhibitors. *ESMO Open* 2022;7(4):100500. DOI: 10.1016/j.esmoop.2022.100500
58. Chen T.-H., Huang C.-C., Yen K.-T. et al. Human papilloma virus 16 E6 oncoprotein associated with p53 inactivation in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2012;18(30):4051–8. DOI: 10.3748/wjg.v18.i30.4051
59. Ambrosio M.R., Vernillo R., De Carolis S. et al. Putative role of circulating human papillomavirus DNA in the development of primary squamous cell carcinoma of the middle rectum: a case report. *Front Oncol* 2019;9:93. DOI: 10.3389/fonc.2019.00093
60. Qiu Q., Li Y., Fan Z. Gene expression analysis of human papillomavirus-associated colorectal carcinoma. *Biomed Res Int* 2020;2020:5201587. DOI: 10.1155/2020/5201587

ORCID автора / ORCID of the author

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

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 12.10.2023. **Принята к публикации:** 24.04.2024.

Article submitted: 12.10.2023. **Accepted for publication:** 24.04.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-40-49>

Молекулярные классификации рака желудка и их клинический потенциал

М.В. Немцова^{1,2}, А.Д. Молчанов¹, Е.Б. Кузнецова^{1,2}, И.В. Буре^{1,3}

¹ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России; Россия, 119048 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

²Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;

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

Контакты: Марина Вячеславовна Немцова nemtsova_m_v@mail.ru

Рак желудка занимает 5-е место по частоте встречаемости среди онкологических заболеваний в мире и является одной из ведущих причин смертности, связанных с данной патологией. В клинической практике для характеристики рака желудка широко используется классификация Lauren, однако она не дает точной информации о течении опухолевого процесса и не позволяет выбрать оптимальный терапевтический подход. Более современные типологии опухолей, например предложенные исследовательскими группами проекта «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA) и Азиатской группы по исследованию рака (Asian Cancer Research Group, ACRG), основаны на профилировании молекулярных изменений в опухолевом геноме. На сегодняшний день существуют несколько новых классификаций, согласно которым рак желудка разделяют на типы в зависимости от ответа на разные виды лечения, например на терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета или терапию, основанную на активности патологических путей, ассоциированных с иммунитетом, процессами репарации ДНК, онкогенными и стромальными сигнатурами. Предложенные типологии способствуют улучшению диагностики и лечения данной патологии. В обзоре представлены существующие на данный момент классификации опухолей желудка и рассмотрен их практический потенциал.

Ключевые слова: рак желудка, хромосомная нестабильность, The Cancer Genome Atlas, Asian Cancer Research Group, рак желудка, ассоциированный с вирусом Эпштейна–Барр, рак желудка, ассоциированный с микросателлитной нестабильностью, хромосомно-нестабильный рак желудка, геномно-стабильный рак желудка

Для цитирования: Немцова М.В., Молчанов А.Д., Кузнецова Е.Б., Буре И.В. Молекулярные классификации рака желудка и их клинический потенциал. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):40–9.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-40-49>

Molecular classifications of gastric cancer and their clinical potential

M. V. Nemtsova^{1,2}, A. D. Molchanov¹, E. B. Kuznetsova^{1,2}, I. V. Bure^{1,3}

¹I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119048, Russia;

²Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia;

³Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 Barricadnaya St., Moscow 125993, Russia

Contacts: Marina Vyacheslavovna Nemtsova nemtsova_m_v@mail.ru

Gastric cancer is the 5th most common oncological disease in the world and one of the leading causes of death associated with this pathology. In clinical practice, the Lauren classification is widely used for gastric cancer characterization, but it does not provide accurate information on tumor progression and does not allow to select the optimal therapeutic approach. More modern tumor typologies, for example proposed by the The Cancer Genome Atlas (TCGA) and the Asian Cancer Research Group (ACRG), are based on profiling of molecular changes in the tumor genome. Currently, several new classifications exist dividing gastric cancer into groups depending on response to different treatment, for example, checkpoint inhibitors or therapy based on activity of pathological pathways associated with immunity, DNA repair, oncogenic and stromal signatures. The proposed typologies improve diagnosis and treatment of this pathology. The review describes currently available classifications of gastric tumors and considers their practical potential.

Keywords: gastric cancer, chromosomal instability, The Cancer Genome Atlas, Asian Cancer Research Group, Epstein–Barr virus-associated gastric cancer, microsatellite instability-associated gastric cancer, chromosomally unstable gastric cancer, genomically stable gastric cancer

For citation: Nemtsova M.V., Molchanov A.D., Kuznetsova E.B., Bure I.V. Molecular classifications of gastric cancer and their clinical potential. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(2):40–9. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-40-49>

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ) занимает 5-е место по распространенности в мире и составляет 7 % заболеваемости злокачественными новообразованиями. Чаще всего данная патология диагностируется в Азии [1]. Обычно РЖ выявляют на поздних стадиях, поэтому пациенты с этим заболеванием имеют неблагоприятный прогноз и ограниченные возможности лечения [2]. Традиционно по гистологической классификации Lauren выделяют кишечный, диффузный и смешанный типы РЖ [3]. Несмотря на то что эта система широко используется в клинической практике, она не дает точной информации о течении опухолевого процесса и не позволяет выбрать оптимальный терапевтический подход.

Относительная частота кишечного, диффузного и недифференцированного типов РЖ составляет около 53, 32 и 15 % соответственно [4]. Кишечный и диффузный типы значительно различаются по этиологии, эпидемиологии, механизмам канцерогенеза, биологическому поведению и прогнозу [5]. Диффузный РЖ ассоциирован с мутациями в гене *CDH1*, кодирующем молекулу клеточной адгезии E-кадгерин [6], и часто демонстрирует изменение экспрессии гена *RHOA* (ras homolog family member A), который относится к семейству малых ГТФаз и участвует в формировании цитоскелета и клеточной адгезии. Кишечный РЖ связан с атрофическим гастритом и инфекцией *Helicobacter pylori* [7].

Исследовательская группа проекта «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA) предложила классификацию опухолей, основанную на профилировании молекулярных изменений в опухолевом геноме [8]. При использовании подходов на основе анализа полноэкзомного секвенирования, изменения копийности хромосомных локусов, экспрессии генов, метилирования ДНК и активности белков РЖ разделен на 4 подтипа: ассоциированный с вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), ассоциированный с микросателлитной нестабильностью (microsatellite instability, MSI), хромосомно-нестабильный и геномно-стабильный [3, 8]. Предложенная молекулярная классификация способствует развитию исследований, направленных на улучшение диагностики и лечения пациентов с РЖ. Однако в настоящее время некоторые молекулярные подтипы этой опухоли, включая хромосомно-нестабильный и геномно-стабильный, еще недостаточно охарактеризованы и не имеют эффективных маркеров,

которые можно использовать для диагностики и молекулярной и гистологической верификации [9].

Известно, что злокачественные опухоли характеризуются высоким уровнем аномальных геномных изменений, называемых нестабильностью генома. Геномную нестабильность можно разделить на MSI и хромосомную нестабильность (chromosome instability, CIN). Оба эти типа нестабильности указывают на мутаторный фенотип опухоли [10]. Мутации, которые накапливаются с высокой частотой в микросателлитных повторах, являются отличительной чертой MSI. Микросателлитная нестабильность связана с генетическими или эпигенетическими изменениями генов *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* и *MLH1*, кодирующих белки системы репарации неспаренных оснований (MMR) [11]. Нарушение репарации неспаренных оснований способствует накоплению мутаций в опухолевой ткани и формированию гипермутаторного фенотипа опухоли.

Если для опухоли характерны накопление геномных изменений на хромосомном уровне, появление инсерций/делений или изменения копийности определенных локусов, то можно говорить о CIN. Сегодня определение подтипа РЖ с MSI не вызывает затруднений, однако диагностика других молекулярных подтипов РЖ представляет сложность и требует глубокого знания основных механизмов развития таких опухолей. Современные классификации используют MSI и CIN в качестве биологических характеристик, позволяющих выделить молекулярные подтипы новообразований.

На данный момент также существуют классификации РЖ по ответу опухоли на определенные виды лечения, например ингибиторами контрольных точек иммунитета. Они имеют непосредственный практический интерес, поскольку позволяют определить чувствительность и эффективность использования конкретных лекарственных средств.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ РАКА ЖЕЛУДКА, ОСНОВАННАЯ НА РЕЗУЛЬТАТАХ ПРОЕКТА «АТЛАС РАКОВОГО ГЕНОМА»

Для молекулярных классификаций типов опухоли использованы геномные сведения и высокотехнологичные методики. На основе анализа мутационных, экспрессионных, метиломных и протеомных данных, а также результатов исследования копийности определенных хромосомных локусов и профилирования микроРНК исследовательская группа TCGA предло-

Таблица 1. Характеристика молекулярных подтипов рака желудка (РЖ) по классификации, основанной на результатах проекта «Атлас ракового генома» (*The Cancer Genome Atlas*)

Table 1. Characteristics of gastric cancer (GC) molecular subtypes per classification based on the results of *The Cancer Genome Atlas* project

Показатель Parameter	РЖ, ассоциированный с вирусом Эпштейна–Барр (8,8 %) GC associated with Epstein-Barr virus (8.8 %)	РЖ, ассоциированный с микросателлитной нестабильностью (21,7 %) GC associated with microsatellite instability (21.7 %)	Геномно-стабильный РЖ (19,7 %) Genomically stable GC (19.7 %)	Хромосомно-нестабильный РЖ (49,8 %) Chromosomally unstable GC (49.8 %)
Локализация Location	Антральный отдел, тело желудка Antrum, gastric body	Любая Any	Любая Any	Пищеводно-желудочный переход (кардия) Gastroesophageal junction (cardia)
Гистологический тип опухоли Histological type	Любой Any	Кишечный Intestinal	Диффузный Diffuse	Кишечный Intestinal
Молекулярные маркеры Molecular markers	Гиперметилирование <i>CDKN2A/p16INK4A</i> , гиперэкспрессия лигандов рецепторов программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1) и 2 (PD-L2). Частые мутации в <i>PIK3CA</i> (80 % случаев) и <i>ARID1A</i> (55 % случаев), редкие – в <i>TP53</i> CDKN2A/p16INK4A hypermethylation, programmed cell death-ligands 1 (PD-L1) and 2 (PD-L2) hyperexpression. Frequent mutations in <i>PIK3CA</i> (80 % of cases) and <i>ARID1A</i> (55 % of cases), rare – in <i>TP53</i>	Микросателлитная нестабильность, мутаторный фенотип. Частые мутации в <i>TP53</i> , <i>KRAS</i> , <i>PIK3A</i> и <i>ARID1A</i> . Гиперметилирование <i>MLH1</i> Microsatellite instability, mutator phenotype. Frequent mutations in <i>TP53</i> , <i>KRAS</i> , <i>PIK3A</i> and <i>ARID1A</i> . <i>MLH1</i> hypermethylation	Частые мутации в <i>CDH1</i> и <i>RHOA</i> . Наличие химерных генов <i>CLDN18/ARHGAP</i> . Гиперэкспрессия генов клеточной адгезии и подвижности клеток Frequent mutations in <i>CDH1</i> and <i>RHOA</i> . Presence of chimeric <i>CLDN18/ARHGAP</i> genes. Hyperexpression of cell adhesion and cell motility genes	Часто встречаются анеуплоидия, амплификация генов рецепторов тирозинкиназ, мутации в <i>TP53</i> Aneuploidy, receptor tyrosine kinase gene amplification, mutations in <i>TP53</i> are common
Клинические маркеры Clinical markers	Чаще встречается у мужчин (81 % случаев) More common in men (81 % of cases)	Поздний возраст манифестации (72 года). Чаще встречается у женщин (56 % случаев) Manifests at older age (72 years). More common in women (56 % of cases)	Ранний возраст манифестации (59 лет) Manifests at younger age (59 years)	—

жила молекулярную классификацию опухолей. В результате осуществления этого международного проекта охарактеризованы более 20 тыс. образцов первичных опухолей 33 типов и образцов неопухолевого ткани. Сегодня на основе результатов TCGA разработана молекулярная классификация для рака молочной железы, желудка, легкого, поджелудочной железы, мочевого пузыря, почки, колоректального рака и др.

Согласно этой классификации выделены 4 молекулярных подтипа РЖ: 1) ассоциированный с ВЭБ (ВЭБ-зависимый подтип); 2) ассоциированный с MSI; 3) геномно-стабильный; 4) с хромосомной нестабильностью [8] (табл. 1).

РАК ЖЕЛУДКА, АССОЦИИРОВАННЫЙ С ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА–БАРР

По результатам, полученным в ходе реализации проекта TCGA, ВЭБ-зависимый подтип РЖ состав-

ляет примерно 9 % исследованных образцов РЖ и характеризуется наличием ВЭБ. К этому подтипу относятся аденокарциномы желудка, развивающиеся в результате клонального роста ВЭБ-инфицированных эпителиальных клеток слизистой оболочки желудка [12]. Данный подтип РЖ характеризуется уникальными геномными aberrациями, клинико-патологическими особенностями и хорошим прогнозом. Выживаемость пациентов с РЖ и ВЭБ-положительным статусом составляет 8,5 года, с ВЭБ-отрицательным статусом – 5,3 года [13]. Отличительной чертой этого подтипа РЖ является характерный фенотип метилирования CpG-островков некоторых генов, а также самый высокий уровень гиперметилирования опухолевой ДНК.

Благодаря достижениям, связанным с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования, проведено наиболее полное исследование

механизма метилирования ДНК в ВЭБ-положительных опухолях. J. Zhao и соавт. выявили гиперметилирование промоторов 886 генов, участвующих в молекулярных путях, ассоциированных с развитием ВЭБ-зависимого РЖ [14]. Специфический профиль метилирования включал гены *p14ARF*, *AQP3*, *p15*, *p16INK4A*, *DLC1*, *p73*, *Rec8*, *ACSS1*, *WWOX*, *FAM3B*, *BCL7A*, *IHH*, *BLU*, *TRABD*, *TFF1*, *TIMP3*, *FHIT*, *DAPK*, *FSD1*, *GSTP1*, *APC*, *SSTR1*, *CRBP1* и др. [15]. Два из этих генов, *PIK3CA* и *ARID1A*, имели самую высокую степень метилирования [16]. Интересно, что гиперметилирование промотора *CDKN2A/p16INK4A* и гиперметилирование промотора *MLH1* оказались взаимосоключающими событиями. Для этого подтипа РЖ характерно метилирование *CDKN2A/p16INK4A* при отсутствии метилирования *MLH1* [17].

Рак желудка, ассоциированный с ВЭБ, характеризуется высокой частотой соматических мутаций *PIK3CA* (80 % случаев) и *ARID1A* (55 % случаев), однако при этом в опухолях редко обнаруживают мутации в гене *TP53* [8]. Важной для терапевтического использования особенностью данного подтипа РЖ является гиперэкспрессия лигандов программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1) и 2 (PD-L2) в сочетании с усилением экспрессии определенных генов иммунного ответа [18].

РАК ЖЕЛУДКА С МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТЬЮ

Ко второму подтипу РЖ относятся опухоли с MSI. Он встречается в 21,7 % исследуемых образцов. Микросателлитная нестабильность – это процесс изменения репликации микросателлитных повторов в опухолевом геноме, связанный с нарушением процессов репарации неспаренных оснований, которые контролируются генами *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* и *PMS2*. Проблемы репарации способствуют усилению мутационного статуса и развитию гипермутаторного фенотипа опухоли. По данным TCGA, гипермутаторный фенотип РЖ, ассоциированного с MSI, включает 37 мутировавших генов, таких как *TP53*, *KRAS*, *PIK3A* и *ARID1A* [8]. Эти гены участвуют в осуществлении важных жизненных процессов, включая регуляцию клеточного цикла, транскрипции, апоптоза, поддержание целостности ДНК, ремоделирование хроматина и передачу клеточного сигнала.

Рак желудка, ассоциированный с MSI, отличается определенным фенотипом метилирования CpG-островков различных генов, включая гиперметилирование промотора *hMLH1*. Более 50 % образцов РЖ данного подтипа характеризуются гиперметилированием промотора *hMLH1*, тогда как мутации в этом гене присутствуют примерно в 15 % случаев [19].

Повышение интереса к MSI при РЖ связано с терапией ингибиторами контрольных точек иммунитета. Недавно для лечения всех типов солидных опухолей, имеющих MSI, был одобрен пембролизумаб. Статус

MSI, а также показатели мутационной нагрузки и нарушение системы репарации непарных оснований (MMR) являются маркерами для назначения терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета [20].

Кроме того, статус MSI является прогностическим фактором для пациентов с РЖ, которым назначается химиотерапия. Исследование MAGIC продемонстрировало худшие показатели выживаемости у больных с резектабельным первичным РЖ, ассоциированным с MSI высокой степени, при использовании химиотерапии в дополнение к хирургическому лечению [21]. Считается, что частота встречаемости MSI у пациентов с РЖ зависит от этнической принадлежности, поэтому определение этого маркера в различных национальных группах является важной задачей и позволяет выявить потребность в лечении ингибиторами контрольных точек.

Остальные опухоли согласно классификации, основанной на результатах проекта TCGA, разделены на подтипы в зависимости от изменения копийности генов и локусов, а также наличия крупных хромосомных аберраций в опухолевом геноме.

ГЕНОМНО-СТАБИЛЬНЫЙ РАК ЖЕЛУДКА

Третий подтип РЖ – геномно-стабильный – составляет 19,7 % исследованных образцов. К нему относятся опухоли с диффузным типом по классификации Lauren, имеющие наибольшую частоту мутаций в гене *CDH1*. Кроме того, новообразования этого подтипа характеризуются мутациями в гене *RHOA*, наличием химерных генов *CLDN18-ARHGAP* и гиперэкспрессией генов, отвечающих за процессы клеточной адгезии и подвижности опухолевых клеток.

Геномно-стабильный РЖ сегодня наименее изучен. Изначально считалось, что он имеет сходство с диффузным РЖ (по классификации Lauren). Сегодня показано, что эти подтипы РЖ значительно различаются. Несмотря на то что в образцах и того и другого подтипа обнаружены общие гипермутированные гены *CDH1* и *RHOA* [22], их мутационные профиль и сигнатуры, а также активируемые сигнальные пути имеют большие различия. Геномно-стабильный РЖ характеризуется мутациями в генах, участвующих в пролиферации клеток, что способствует развитию дифференцированной опухоли, тогда как при диффузном РЖ часто мутируют гены, контролирующие дифференцировку, поэтому опухоли преимущественно низкодифференцированные. Анализ показал, что диффузный РЖ связан с активацией патологических путей, регулирующих плюрипотентность и миграцию клеток, а геномно-стабильный – с активацией путей, ассоциированных с развитием бактериальной инфекции и нарушением клеточного цикла. Хотя сегодня не существует биологических маркеров, характеризующих геномно-стабильный РЖ, активация различных патологических путей позволяет объяснить его отличия от диффузного РЖ [23].

ХРОМОСОМНО-НЕСТАБИЛЬНЫЙ РАК ЖЕЛУДКА

Четвертый подтип РЖ – хромосомно-нестабильный – составляет 49,8 % исследованных образцов РЖ и характеризуется повышением частоты анеуплоидий и/или структурных хромосомных перестроек в опухолевых клетках. Хромосомная нестабильность делится на численную, связанную с изменением числа целых хромосом (анеуплоидия) или целых геномов (полиплоидия), и структурную нестабильность, ассоциированную с накоплением хромосомных перестроек. Большую роль в развитии CIN играют нарушения в генах, отвечающих за регуляцию клеточного деления и организацию его веретена. Идентифицированы несколько генов, специфически связанных с хромосомно-нестабильным РЖ, включая *AURKA*, *AURKB*, *CCNB1* и *CDK1*. Эти гены участвуют в регуляции митоза и контроле клеточного цикла; они часто амплифицируются или гиперэкспрессируются при таком подтипе РЖ [24]. По данным TCGA, хромосомно-нестабильные опухоли обычно демонстрируют кишечный фенотип по классификации Lauren и часто имеют мутации в *TP53* (71 % случаев) [8]. Сегодня существуют доказательства, что потеря функции *TP53* может являться

причиной возникновения CIN и быть связанной с развитием хромосомно-нестабильного РЖ [25]. Исследования мутационного профиля *TP53* при РЖ подтвердили повышение частоты соматических мутаций в хромосомно-нестабильных карциномах желудка [26]. Мутации в *TP53* при РЖ с CIN связаны с плохим прогнозом, а также с устойчивостью к химиопрепаратам и таргетным агентам.

По классификации, основанной на данных TCGA, подтипы РЖ имеют специфические клинические признаки. Опухоли с CIN чаще локализуются в желудочно-пищеводном переходе и кардии, тогда как ВЭБ-зависимые опухоли – в антральном отделе и теле желудка. Для геномно-стабильного РЖ характерен более ранний возраст манифестации (медиана возраста пациентов 59 лет) по сравнению с РЖ с MSI (медиана возраста пациентов 72 года). Рак желудка, ассоциированный с MSI, чаще встречается у женщин (56 % случаев), а ВЭБ-зависимый РЖ – у мужчин (81 % случаев) (см. табл. 1). К геномно-стабильному подтипу относятся опухоли диффузного типа по классификации Lauren (73 %), а к подтипу с MSI – преимущественно опухоли интестинального типа по этой классификации.

Таблица 2. Молекулярные подтипы рака желудка (РЖ) по классификации Азиатской группы по исследованию рака (Asian Cancer Research Group)

Table 2. Molecular subtypes of gastric cancer (GC) according to the classification of the Asian Cancer Research Group

Показатель Parameter	РЖ с MSI (23 %) GC with MSI (23 %)	РЖ с MSS и фенотипом эпителиально-мезенхималь- ного перехода (15 %) GC with MSS and epithelial- mesenchymal transition phenotype (15 %)	РЖ с MSS и активным <i>TP53</i> (26 %) GC with MSS and active <i>TP53</i> (26 %)	РЖ с MSS и инактивиро- ванным <i>TP53</i> (36 %) GC with MSS and inactive <i>TP53</i> (36 %)
Локализация Location	Антральный отдел желудка Antrum	Любая Any	Любая Any	Любая Any
Гистологический тип опухоли Histological type	Кишечный Intestinal	Диффузный Diffuse	Любой Any	Любой Any
Молекулярные маркеры Molecular markers	Микросателлитная неста- бильность. Гипермутирован- ный фенотип. Частые мутации в <i>TP53</i> , <i>KRAS</i> , <i>PIK3A</i> и <i>ARID1A</i> Microsatellite instability. Hypermutated phenotype. Frequent mutations in <i>TP53</i> , <i>KRAS</i> , <i>PIK3A</i> and <i>ARID1A</i>	Стабильные микросател- литные повторы. Гипому- тированный фенотип. Гиперэкспрессия генов эпителиально-мезенхи- мального перехода Microsatellite stable. Hypomutated phenotype. Hyperexpression of epithelial- mesenchymal transition genes	Стабильные микроса- теллитные повторы. Активная экспрессия <i>TP53</i> . Высокий процент опухолей с положительным ВЭБ-статусом Microsatellite stable. Active <i>TP53</i> expression. High percentage of EBV-positive tumors	Стабильные микро- сателлитные повторы. Нет экспрессии <i>TP53</i> , частые мутации в <i>TP53</i> Microsatellite stable. No <i>TP53</i> expression, frequent mutations in <i>TP53</i>
Клинические маркеры Clinical markers	Благоприятный прогноз. Низкая частота развития рецидивов. Лучшие показате- ли общей выживаемости Favorable prognosis. Low recurrence rate. Longest overall survival	Плохой прогноз. Ранний возраст манифестации. Высокая частота развития рецидивов Poor prognosis. Early age of manifestation. High recurrence rate	Промежуточный прогноз Intermediate prognosis	Промежуточ- ный прогноз Intermediate prognosis

Примечание. ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр; MSI – микросателлитная нестабильность; MSS – микросателлитная стабильность.
Note. EBV – Epstein–Barr virus; MSI – microsatellite instability; MSS – microsatellite stability.

Однако с точки зрения прогноза ни один из 4 подтипов РЖ не имеет существенных различий в показателях выживаемости пациентов.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ РАКА ЖЕЛУДКА АЗИАТСКОЙ ГРУППЫ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ РАКА

Существует также молекулярная классификация РЖ Азиатской группы по исследованию рака (Asian Cancer Research Group, ACRG), согласно которой выделяют 4 подтипа РЖ: 1) с MSI; 2) с микросателлитной стабильностью (microsatellite stability, MSS) и фенотипом эпителиально-мезенхимального перехода; 3) с MSS и активным *TP53* (MSS/*TP53*+); 4) с MSS и инактивированным *TP53* (MSS/*TP53*–) (табл. 2) [26].

По результатам исследования ACRG подтип с MSI составляет 23 % образцов РЖ и характеризуется наличием MSI и высокой частотой мутаций в генах *ARID1A*, *PIK3CA*, *PTEN*, *KRAS* и *ALK*. Этот подтип имеет некоторое сходство с аналогичным подтипом по классификации, основанной на данных TCGA. Опухоли с MSI имеют кишечный гистологический тип по классификации Lauren, локализируются преимущественно в антральном отделе желудка; их чаще выявляют на I и II стадиях. С учетом обнаружения новообразований данного подтипа на ранних стадиях у пациентов наблюдаются лучшие показатели общей выживаемости по сравнению с другими подтипами РЖ.

По данным ACRG, РЖ с MSS и фенотипом эпителиально-мезенхимального перехода составляет 15 % образцов РЖ. Для него характерны наименьшее количество соматических мутаций и высокая экспрессия генов, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом, а также более ранний возраст манифестации по сравнению с другими подтипами этой опухоли. Данный подтип РЖ относится к диффузному гистологическому типу по классификации Lauren. У пациентов с этой патологией отмечаются худшие показатели общей выживаемости по сравнению с пациентами с другими подтипами РЖ, а также самая высокая частота развития рецидивов, особенно с перитонеальной диссеминацией.

Оставшиеся опухоли с MSS разделены на подтипы в зависимости от активности гена *TP53*. Рак желудка подтипа MSS/*TP53*+ составляет 26 % и характеризуется высокой экспрессией *TP53*. Кроме того, среди MSS/*TP53*+ опухолей чаще всего встречаются новообразования с ВЭБ-положительным статусом. Подтип РЖ MSS/*TP53*– составляет 36 % и, напротив, характеризуется отсутствием экспрессии *TP53* и высокой частотой мутаций в этом гене.

Названные 4 подтипа РЖ также имеют характерные клинические проявления, отличающие их от подтипов РЖ по классификации, основанной на данных TCGA. Подтипы, выделенные по классификации ACRG, демонстрируют различия в выживаемости пациентов, что подтверждено другими исследованиями [26].

Несмотря на то что *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) является важным фактором патогенеза РЖ, статус этой бактерии не учитывался ни в одной из классификаций. В исследованиях, выполненных в ходе реализации проекта TCGA, *H. pylori* обнаруживалась редко, а в исследованиях ACRG – часто (43 % из 127 протестированных образцов), но не было выявлено связи этой инфекции с определенным подтипом РЖ.

Различия классификаций TCGA и ACRG, вероятно, отражают особенности набора клинической группы. Характерные черты подтипов РЖ также могут варьировать в зависимости от этнических особенностей больных и географического положения страны. Показано, например, что уровень заболеваемости РЖ в Западной Европе выше, чем в ЮАР (~19 и ~10 % соответственно), несмотря на большую распространенность инфекции *H. pylori* в Южной Африке. Сравнение подтипов РЖ показало различия в частоте встречаемости MSI у британских пациентов (3 % случаев) и пациентов Южной Африки (24 % случаев). В то же время у больных из Великобритании выявлена более высокая частота анеуплоидий и хромосомных перестроек (~27 % случаев) по сравнению с больными из ЮАР (~16 % случаев) [27]. Помимо геномной нестабильности, существуют и другие различия подтипов РЖ у пациентов из разных географических регионов. Сообщалось о более высокой активности Т-клеточных путей (например, передачи сигналов CTLA-4) и более выраженной инфильтрации опухоли иммунными клетками у японских пациентов с РЖ по сравнению с пациентами из Европы [28]. Своеобразие паттернов геномной нестабильности отражает вероятное различие биологических механизмов, вызывающих РЖ, у больных из разных географических регионов [29].

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ КЛАССИФИКАЦИИ РАКА ЖЕЛУДКА

В последнее время предпринимались попытки создания альтернативных классификаций молекулярных подтипов РЖ. Так, предложено разделить РЖ на группы в зависимости от чувствительности к лечению ингибиторами контрольных точек иммунитета. Решающее значение в повышении эффективности иммунотерапии имеет определение прогностических биомаркеров ответа на лечение, таких как экспрессия PD-L1 [30], нарушение репарации неспаренных оснований ДНК или MSI [31], опухолевая мутационная нагрузка [32]. Известно, что опухоли с высокой иммунной инфильтрацией более активно отвечают на иммунотерапию, чем опухоли с низкой иммунной инфильтрацией. По данным иммуногеномного анализа при РЖ мутации в *TP53* коррелируют с супрессией противоопухолевого иммунитета [33].

В своем исследовании L. Li и X. Wang выделили 3 подтипа РЖ на основе активности 15 патологических путей, ассоциированных с иммунитетом, процессами репарации ДНК, онкогенными и стромальными

сигнатурами: низкоиммунный подтип, подтип, обогащенный стромальным компонентом, и высокоиммунный подтип. Низкоиммунный подтип характеризовался низкой инфильтрацией иммунными клетками, высокой активностью репарации ДНК, высоким уровнем анеуплоидии, внутриопухолевой гетерогенности и частыми мутациями в *TP53*. Подтип, обогащенный стромальным компонентом, показал низкую активность репарации ДНК, геномную стабильность, низкую внутриопухолевую гетерогенность и плохой прогноз. Для высокоиммунного подтипа характерны сильно выраженная иммунная инфильтрация, высокая активность репарационных процессов, мутационная нагрузка опухоли и частота микросателлитной нестабильности, а также мутации в *ARID1A*, повышенная экспрессия PD-L1 и благоприятный прогноз. Идентификация новых подтипов РЖ позволяет по-новому взглянуть на опухолеобразование, а также имеет потенциальное клиническое значение для лечения РЖ [34].

Еще одна альтернативная классификация предложена Z. Lei и соавт., которые проанализировали закономерности экспрессии генов в 248 опухолях желудка и выявили 3 их подтипа: пролиферативный, метаболический и мезенхимальный [35]. Проллиферативный РЖ характеризовался повышенной экспрессией генов, связанных с регуляцией клеточного цикла, высокими частотой мутаций в *TP53*, частотой структурных нарушений (особенно амплификацией онкогенов *CCNE1*, *MYC*, *ERBB2* и *KRAS*) и кишечным типом по классификации Lauren. Опухоли этого подтипа имели высокий уровень нестабильности генома и гипометилирования ДНК. Для метаболического подтипа РЖ характерны активация генов, которые экспрессируются в нормальной слизистой оболочке желудка, а также гиперактивация путей, связанных с развитием определенного типа метаплазии и экспрессией спазмолитических пептидов. Опухоли данного подтипа были более чувствительны к лечению 5-фторурацилом по сравнению с другими подтипами РЖ, что подтверждено исследованием с участием двух независимых групп пациентов. Мезенхимальный подтип отличался повышенной экспрессией генов, связанных с клеточной адгезией, гиперэкспрессией *CDH2* (N-кадгерин) и низкой экспрессией *CDH1* (E-кадгерин), что характерно для мезенхимальных клеток, а также активацией путей, регулирующих эпителиально-мезенхимальный переход и стволовые опухолевые клетки. Данный подтип РЖ связан с диффузным типом по классификации Lauren и низкой частотой изменения копийности некоторых локусов (CNV); в нем определяли активацию путей эпителиально-мезенхимального перехода, трансформирующего фактора роста β (TGF- β), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), транскрипционного ядерного фактора каппа В (NF- κ B), мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) и сигнального пути Sonic Hedgehog (SHH). Клеточные линии мезенхимального

подтипа показали чувствительность к ингибиторам PI3K/АКТ/mTOR, что согласуется с гиперактивацией молекулярного пути mTOR. Несмотря на различия в геномных изменениях и реакции на лекарства, эти 3 подтипа не показали существенных различий в показателях общей и безрецидивной выживаемости.

Еще одна классификация РЖ – Single-patient classifier (SPC) – разработана на основе полимеразной цепной реакции в реальном времени для прогноза ответа на адьювантную химиотерапию пациентов с резектабельным РЖ II–III стадии [36]. Она основана на определении экспрессии 4 генов в парафинизированных срезах опухолевой ткани РЖ, фиксированных формалином. Используемые гены *GZMB*, *WARS*, *SFRP4* и *CDX1* идентифицированы из набора транскриптомных данных 1259 образцов опухолей. В отличие от других критериев молекулярного типирования РЖ, которые не применимы к отдельным пациентам, эту классификацию можно использовать для конкретного случая. Исследователи определили 3 клинически значимых подтипа РЖ (иммунный, эпителиальный и стволоподобный), для которых характерны определенные уровни экспрессии генов и клинически полезные биомаркеры, позволяющие распределить пациентов по подтипам (табл. 3). Классификация SPC предполагает использование двухуровневого алгоритма разделения на группы.

Классификацию SPC впервые применили в группе 307 пациентов с РЖ, также она использовалась в независимом исследовании CLASSIC на выборке 625 пациентов [36]. Данная классификация позволяет разделить опухоли по чувствительности к химиотерапии и прогнозу. По прогностической составляющей пациентов распределили на группы низкого, промежуточного и высокого риска, 5-летняя общая выживаемость которых составила 83,2; 74,8 и 66 % соответственно. К группе низкого риска относится иммунный РЖ (высокий уровень экспрессии *GZMB* и *WARS*), к группе высокого риска – стволоподобный РЖ (высокий уровень экспрессии *SFRP4*). Пациенты с низким уровнем экспрессии гена *SFRP4* отнесены к группе промежуточного риска. Эпителиальный РЖ (высокий уровень экспрессии *CDX1*) – подтип, при котором наблюдается хороший ответ опухоли на химиотерапию по сравнению с новообразованиями с низким уровнем экспрессии *CDX1*. В последующем исследовании подтверждено, что прогностическая ценность SPC превосходит прогностическую ценность традиционной классификации опухолей Tumor, Nodus and Metastasis [37]. Классификацию SPC рекомендуется применять для стратификации пациентов с локализованным резектабельным РЖ после операции с целью облегчения принятия терапевтических решений [36]. Так, для больных с иммунным РЖ не требуется адьювантная химиотерапия после хирургического вмешательства, поскольку у них обычно благоприятный прогноз, а дополнительная химиотерапия не улучшает показатели общей выжи-

Таблица 3. Молекулярные подтипы рака желудка (РЖ) по классификации Single-patient classifier (SPC)**Table 3.** Molecular subtypes of gastric cancer (GC) according to the Single-patient classifier (SPC)

Показатель Parameter	Иммунный РЖ Immune GC	Эпителиальный РЖ Epithelial GC	Стволоподобный РЖ Stem-like GC
Экспрессия генов Gene expression	<i>GZMB, WARS</i>	<i>CDX1</i>	<i>SFRP4</i>
Клинико-патологические характеристики Clinical and pathological characteristics	Положительный ВЭБ-статус, пожилой возраст Positive EBV status, elderly age	Отрицательный ВЭБ-статус, наличие стабильных микросателлитных повторов (MSS/MSI-L), ранний возраст манифестации Negative EBV status, presence of stable microsatellite repeats (MSS/MSI-L), early age of manifestation	Геномно-стабильный подтип (по классификации исследовательской группы TCGA, диффузный тип (по классификации Lauren) Genomically stable subtype (per TCGA research group classification), diffuse type (per Lauren classification)
Клиническое значение Clinical significance	Хороший прогноз, опухоль нечувствительна к химиотерапии Favorable prognosis, tumor is insensitive to chemotherapy	Ранний возраст манифестации, возраст, опухоль чувствительна к химиотерапии Early age of manifestation, tumor is sensitive to chemotherapy	Плохой прогноз Poor prognosis

Примечание. ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр; MSI-L – микросателлитная нестабильность низкого уровня; MSS – микросателлитная стабильность; TCGA – проект «Атлас ракового генома».

Note. EBV – Epstein–Barr virus; MSI-L – low microsatellite instability; MSS – microsatellite stability; TCGA – The Cancer Genome Atlas.

ваемости. Пациентам с эпителиальным РЖ рекомендуется адъювантная химиотерапия после операции, так как она повышает показатели выживаемости в этой группе. Авторы также подчеркнули необходимость разработки новых вариантов лечения стволоподобного РЖ, который имеет худший прогноз [38].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на достижения в диагностике и стратегиях лечения РЖ, во многих случаях данная патология выявляется на поздних стадиях, что приводит к неблагоприятному прогнозу. В связи с молекулярной гетерогенностью РЖ традиционные классификации, основанные на морфологии опухолей, не всегда позволяют подобрать оптимальную для пациента тактику терапии. В последнее время все большее значение приобретают классификации, базирующиеся на молекулярных особенностях опухолей и ответе на опре-

деленные виды лечения. Использование подходов на основе полноэкзомного секвенирования, анализа копийности хромосомных локусов, экспрессии генов, метилирования ДНК и активности белков позволило определить молекулярные подтипы РЖ, которые могут давать более подробную информацию об опухоли, чем гистопатологические характеристики. Сегодня продолжается работа, направленная на использование данных, полученных при выявлении и исследовании молекулярных подтипов, в клиническую практику, а также определение клинических, диагностических и прогностических маркеров для выделенных подтипов РЖ (классификации TCGA, ACRG и др.). Еще одним важным направлением исследований является установление связи молекулярно-генетических подтипов РЖ и ответа опухоли на терапию, а также разработка новых терапевтических агентов для успешного лечения пациентов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359–86. DOI: 10.1002/ijc.29210
- Japanese gastric cancer association japanese gastric cancer treatment guidelines 2018 (5th edition). *Gastric Cancer* 2021;24(1):1–21. DOI: 10.1007/s10120-020-01042-y
- Grabsch H.I., Tan P. Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms. *Dig Surg* 2013;30(2):150–8. DOI: 10.1159/000350876
- Hu B., El Hajj N., Sittler S. et al. Gastric cancer: classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol* 2012;3(3):251–61. DOI: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.021
- Lin X., Zhao Y., Song W.-M., Zhang B. Molecular classification and prediction in gastric cancer. *Comput Struct Biotechnol J* 2015; 13:448–58. DOI: 10.1016/j.csbj.2015.08.001
- Немцова М.В., Буре И.В., Залетаев Д.В. и др. Е-кадгерин в опухолевой прогрессии рака желудка. *Медицинская генетика* 2022;21(5):3–17. DOI: 10.25557/2073-7998.2022.05.3-17

- Nemtsova M.V., Bure I.V., Zaletaev D.V. et al. E-cadherin in gastric cancer tumorigenesis. *Medicinskaya genetika = Medical Genetics* 2022;21(5):3–17. (In Russ.). DOI: 10.25557/2073-7998.2022.05.3-17
7. Ma J., Shen H., Kapesa L., Zeng S. Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer. *Oncol Lett* 2016;11(5):2959–64. DOI: 10.3892/ol.2016.4337
 8. Comprehensive Molecular Characterization of Gastric Adenocarcinoma. *Nature* 2014;513(7517):202–9. DOI: 10.1038/nature13480
 9. Strand M.S., Lockhart A.C., Fields R.C. Genetics of gastric cancer. *Surg Clin North Am* 2017;97(2):345–70. DOI: 10.1016/j.suc.2016.11.009
 10. Loeb L.A. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 2001;61(8):3230–9.
 11. Kawakami H., Zaanan A., Sinicrope F.A. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2015;16(7):30. DOI: 10.1007/s11864-015-0348-2
 12. Naseem M., Barzi A., Brezden-Masley C. et al. Outlooks on Epstein–Barr virus associated gastric cancer. *Cancer Treat Rev* 2018;66:15–22. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.03.006
 13. Sun K., Jia K., Lv H. et al. EBV-positive gastric cancer: current knowledge and future perspectives. *Front Oncol* 2020;10:583463. DOI: 10.3389/fonc.2020.583463
 14. Zhao J., Liang Q., Cheung K.-F. et al. Genome-wide identification of Epstein–Barr virus-driven promoter methylation profiles of human genes in gastric cancer cells. *Cancer* 2013;119(2):304–12. DOI: 10.1002/cncr.27724
 15. Wang J., Liu W., Zhang X. et al. LMP2A induces DNA methylation and expression repression of AQP3 in EBV-associated gastric carcinoma. *Virology* 2019;534:87–95. DOI: 10.1016/j.virol.2019.06.006
 16. Ignatova E., Seriak D., Fedyanin M. et al. Epstein–Barr virus-associated gastric cancer: disease that requires special approach. *Gastric Cancer* 2020;23(6):951–60. DOI: 10.1007/s10120-020-01095-z
 17. Geddert H., zur Hausen A., Gabbert H.E., Sarbia M. EBV-infection in cardiac and non-cardiac gastric adenocarcinomas is associated with promoter methylation of P16, P14 and APC, but not HMLH1. *Cell Oncol (Dordr)* 2011;34(3):209–14. DOI: 10.1007/s13402-011-0028-6
 18. Koh J., Ock C.-Y., Kim J.W. et al. Clinicopathologic implications of immune classification by PD-L1 expression and CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes in stage II and III gastric cancer patients. *Oncotarget* 2017;8(16):26356–67. DOI: 10.18632/oncotarget.15465
 19. Ratti M., Lampis A., Hahne J.C. et al. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cell Mol Life Sci* 2018;75(22):4151–62. DOI: 10.1007/s00018-018-2906-9
 20. Chao J., Fuchs C.S., Shitara K. et al. Assessment of pembrolizumab therapy for the treatment of microsatellite instability-high gastric or gastroesophageal junction cancer among patients in the KEYNOTE-059, KEYNOTE-061, and KEYNOTE-062 clinical trials. *JAMA Oncol* 2021;7(6):895–902. DOI: 10.1001/jamaoncol.2021.0275
 21. Smyth E.C., Wotherspoon A., Peckitt C. et al. Mismatch repair deficiency, microsatellite instability, and survival: an exploratory analysis of the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy (MAGIC) trial. *JAMA Oncol* 2017;3(9):1197–203. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.6762
 22. Nam S., Kim J.H., Lee D.H. RHOA in gastric cancer: functional roles and therapeutic potential. *Front Genet* 2019;10:438. DOI: 10.3389/fgene.2019.00438
 23. Ling Y., Watanabe Y., Nagahashi M. et al. Genetic profiling for diffuse type and genomically stable subtypes in gastric cancer. *Comput Struct Biotechnol J* 2020;18:3301–8. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.10.021
 24. Ma H., He Z., Chen J. et al. Identifying of biomarkers associated with gastric cancer based on 11 topological analysis methods of cytohubba. *Sci Rep* 2021;11(1):1331. DOI: 10.1038/s41598-020-79235-9
 25. Zhang R., Liu Z., Chang X. et al. Clinical significance of chromosomal integrity in gastric cancers. *Int J Biol Markers* 2022;37(3):296–305. DOI: 10.1177/03936155221106217
 26. Cristescu R., Lee J., Nebozhyn M. et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med* 2015;21(5):449–56. DOI: 10.1038/nm.3850
 27. Buffart T.E., Louw M., van Grieken N.C.T. et al. Gastric cancers of Western European and African patients show different patterns of genomic instability. *BMC Med Genomics* 2011;4:7. DOI: 10.1186/1755-8794-4-7
 28. Lin S.J., Gagnon-Bartsch J.A., Tan I.B. et al. Signatures of tumour immunity distinguish asian and non-asian gastric adenocarcinomas. *Gut* 2015;64(11):1721–31. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-308252
 29. Chia N.-Y., Tan P. Molecular classification of gastric cancer. *Ann Oncol* 2016;27(5):763–9. DOI: 10.1093/annonc/mdw040
 30. Taube J.M., Klein A., Brahmer J.R. et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res* 2014;20(19):5064–74. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3271
 31. Le D.T., Uram J.N., Wang H. et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015;372(26):2509–20. DOI: 10.1056/NEJMoal500596
 32. Goodman A.M., Kato S., Bazhenova L. et al. Tumor mutational burden as an independent predictor of response to immunotherapy in diverse cancers. *Mol Cancer Ther* 2017;16(11):2598–2608. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0386
 33. Jiang Z., Liu Z., Li M. et al. Immunogenomics analysis reveals that TP53 mutations inhibit tumor immunity in gastric cancer. *Transl Oncol* 2018;11(5):1171–87. DOI: 10.1016/j.tranon.2018.07.012
 34. Li L., Wang X. Identification of gastric cancer subtypes based on pathway clustering. *NPJ Precis Oncol* 2021;5(1):46. DOI: 10.1038/s41698-021-00186-z
 35. Lei Z., Tan I.B., Das K. et al. Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. *Gastroenterology* 2013;145(3):554–65. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.05.010
 36. Cheong J.-H., Yang H.-K., Kim H. et al. Predictive test for chemotherapy response in resectable gastric cancer: a multi-cohort, retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2018;19(5):629–38. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30108-6
 37. Choi Y.Y., Jang E., Seo W.J. et al. Modification of the TNM staging system for stage II/III gastric cancer based on a prognostic single patient classifier algorithm. *J Gastric Cancer* 2018;18(2):142–51. DOI: 10.5230/jgc.2018.18.e14
 38. Jeon J., Cheong J.-H. Clinical implementation of precision medicine in gastric cancer. *J Gastric Cancer* 2019;19(3):235–53. DOI: 10.5230/jgc.2019.19.e25

Вклад авторов

М.В. Немцова, Е.Б. Кузнецова: написание текста статьи, редактирование;
 А.Д. Молчанов: подбор литературы по теме статьи, подготовка таблиц и рисунков;
 И.В. Буре: обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contributions

M.V. Nemtsova, E.B. Kuznetsova: article writing, editing;
 A.D. Molchanov: selection of literature on the topic of the article, preparation of tables and figures;
 I.V. Bure: literature review on the topic of the article, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID authors

М.В. Немцова / M.V. Nemtsova: <https://orcid.org/0000-0002-2835-5992>

Е.Б. Кузнецова / E.B. Kuznetsova: <https://orcid.org/0000-0001-5825-0430>

И.В. Буре / I.V. Bure: <https://orcid.org/0000-0003-2043-5848>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-75-10117-П).

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (grant No 20-75-10117-P).

Статья поступила: 06.10.2023. **Принята к публикации:** 19.03.2024.

Article submitted: 06.10.2023. **Accepted for publication:** 19.03.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-50-62>

Современный взгляд на роль генетических факторов в этиопатогенезе рака молочной железы

Н.В. Павлова^{1,2}, С.С. Дёмин^{1,2}, М.И. Чурносов², И.В. Пономаренко²

¹ОГБУЗ «Белгородский областной онкологический диспансер»; Россия, 308010 Белгород, ул. Куйбышева, 1;

²ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»; Россия, 308015 Белгород, ул. Победы, 85

Контакты: Сергей Сергеевич Дёмин doctor.dyomin@gmail.com

Целью настоящего обзора является обобщение современных представлений о генетических факторах риска развития рака молочной железы (РМЖ), оценка роли герминальных мутаций и однонуклеотидных полиморфизмов, связанных с заболеванием по данным полногеномных (GWAS) и других ассоциативных исследований.

Поиск необходимых источников осуществлялся в системах PubMed, Medline, Cochrane Library, eLIBRARY и NHGRI-EBI Catalog of GWAS. В анализ включены работы, опубликованные в период с января 2007 г. по декабрь 2022 г. Найдены 197 источников, посвященных изучению роли генетических факторов в развитии РМЖ. Поисковые запросы включали данные об ассоциациях различных молекулярно-генетических маркеров – герминальных мутаций, а также однонуклеотидных полиморфизмов с формированием РМЖ. Из этой совокупности работ в настоящий обзор вошли 45 исследований. Критерием включения в анализ было наличие данных GWAS и ассоциативных исследований, выполненных на репрезентативных выборках пациентов с необходимой мощностью. Также оценивались результаты, характеризующие клинико-патологическое значение (связь с молекулярными подтипами РМЖ, особенностями терапии, прогнозом заболевания) генетических факторов РМЖ. Исключены из анализа данные ассоциативных исследований генов-кандидатов злокачественных новообразований молочной железы, морфологически не являющихся карциномами, в которые вошли малочисленные (нерепрезентативные) выборки пациентов и группы контроля.

Мутации в генах с высокой и умеренной пенетрантностью (*BRCA1/2*, *CHEK2*, *PALB2* и др.) в 5 % случаев связаны с возникновением РМЖ. При этом их доля среди семей, в которых 2 и более члена страдают РМЖ, достигает лишь 30–40 %. В рамках GWAS выявлена роль более 180 полиморфных локусов, ассоциированных с РМЖ, которые определяют показатель наследуемости в 18 % случаев. По итогам близнецовых исследований этот показатель в 1,7 раза выше и достигает 31 %. При этом вклад средовых факторов – не более 16 %. Доля неустановленных наследственных факторов в формировании РМЖ составляет примерно 8 %, вместе с тем современные исследования ассоциаций различных генов-кандидатов (*ESR1/2*, *IGF1*, *EGFR*, *VEGF*, *TNFα*, *MMPs* и др.), чьи сигнальные пути регулируют опухолевую прогрессию РМЖ, показывают их вовлеченность в канцерогенез. Таким образом, неизвестная наследственность в формировании РМЖ может достигать 40 %.

Доля герминальных мутаций основных генов предрасположенности к РМЖ в популяции невысока, при этом генетические изменения внутри одного и того же гена (например, *BRCA1*) демонстрируют этническое или территориальное разнообразие. Вместе с тем значительная часть наследуемости РМЖ определяется различными генами-кандидатами, роль которых в формировании индивидуального риска РМЖ продемонстрирована GWAS. Активно накапливается фактический материал по вовлеченности основных генов-регуляторов канцерогенеза в развитие РМЖ. Каждая из трех рассмотренных групп генетических факторов имеет большое клинико-патологическое значение и способна влиять на течение и прогноз заболевания.

Ключевые слова: рак молочной железы, факторы риска, биологические механизмы, матриксные металлопротеиназы, полногеномные ассоциативные исследования, гены-кандидаты, герминальные мутации

Для цитирования: Павлова Н.В., Дёмин С.С., Чурносов М.И., Пономаренко И.В. Современный взгляд на роль генетических факторов в этиопатогенезе рака молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):50–62.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-50-62>

A modern view of the role of genetic factors in the etiopathogenesis of breast cancer

N.V. Pavlova¹, S.S. Dyomin^{1,2}, M.I. Churnosov², I.V. Ponomarenko²

¹Belgorod Regional Oncological Dispensary; 1 Kuibysheva St., Belgorod 308010, Russia;

²Belgorod National Research University; 85 Pobedy St., Belgorod 308015, Russia

Contacts: Sergey Sergeevich Demin doctor.dyomin@gmail.com

The aim of this review is to summarize current understandings of the genetic risk factors for the development of breast cancer (BC), evaluate the role of germline mutations and single nucleotide polymorphisms associated with the disease, based on genome-wide association studies (GWAS) and other associative studies.

The search for relevant sources was conducted in PubMed, Medline, Cochrane Library, eLIBRARY, and the NHGRI-EBI Catalog of GWAS. The analysis includes works published from January 2007 to December 2022. A total of 197 sources focused on the role of genetic factors in the development of BC were found. Search queries included data on associations of various molecular-genetic markers – germline mutations, and single nucleotide polymorphisms – with the formation of BC. From this body of work, 45 studies were included in the current review. The inclusion criterion for the analysis was the presence of GWAS data and associative studies conducted among patients with representative samples with the necessary power. Additionally, results characterizing the clinical-pathological significance (association with molecular subtypes of BC, therapy features, disease prognosis) of BC genetic factors were evaluated. Excluded from the analysis were data from associative studies of candidate genes for malignant breast neoplasms that are morphologically not carcinomas, performed on small (non-representative) patient samples and control groups.

Mutations in genes with high and moderate penetrance (*BRCA1/2*, *CHEK2*, *PALB2*, etc.) are associated with the onset of BC in 5 % of cases. Among families with two or more members affected by BC, their share reaches only 30–40 %. GWAS data revealed the role of more than 180 polymorphic loci associated with BC, which determine a heritability rate of about 18 %. According to twin studies, this rate is 1.7 times higher, reaching 31 %. Meanwhile, the contribution of environmental factors is no more than 16 %. The proportion of unidentified hereditary factors in BC formation is about 8 %. However, contemporary studies of associations of various candidate genes (*ESR1/2*, *IGF1*, *EGFR*, *VEGF*, *TNF α* , *MMPs*, etc.), whose signaling pathways regulate BC tumor progression, show their involvement in carcinogenesis. Thus, the unknown heritability in BC formation may reach 40 %.

The proportion of germline mutations in major BC predisposition genes in the population is low. Genetic variations within the same gene (e.g., *BRCA1*) show ethnic or territorial diversity. Nevertheless, a significant portion of BC heritability is determined by various candidate genes, whose role in forming individual BC risk is demonstrated by GWAS. Substantial evidence on the involvement of key carcinogenesis-regulating genes in BC development is being accumulated. Each of the three considered groups of genetic factors has important clinical-pathological significance and can influence the course and prognosis of the disease.

Keywords: breast cancer, risk factors, biological mechanisms, matrix metalloproteinases, genome wide associations study, candidate genes, germ-line mutations

For citation: Pavlova N.V., Dyomin S.S., Churnosov M.I., Ponomarenko I.V. A modern view of the role of genetic factors in the etiopathogenesis of breast cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(2):50–62. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-50-62>

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (PMЖ) – злокачественное новообразование, исходящее из эпителия долек и протоков ткани молочной железы. Ежегодно в мире регистрируются более 2 млн случаев данной патологии, и заболеваемость имеет стойкую тенденцию к увеличению [1]. По данным GLOBOCAN, PMЖ занимает 15,5 % в структуре смертности женского населения в мире, ежегодно унося жизни 685 тыс. женщин [2]. В РФ отмечается тенденция, соответствующая общемировой: за период 2008–2018 гг. стандартизованный показатель заболеваемости PMЖ увеличился с 42,83 до 51,63 на 100 тыс. населения при среднегодовом темпе прироста в 1,97 %. Среди женского населения РФ данная патология занимает 1-е место в структуре как онкозаболеваемости (20,9 % случаев), так и смертности от злокачественных ново-

образований (16,18 % случаев) [3], что свидетельствует о большом медико-социальном значении этого заболевания [4]. Существенно, что в Центрально-Черноземном районе, входящем в состав Центрального федерального округа РФ, показатели заболеваемости PMЖ выше, чем по стране в целом [5]. Так, в 2018 г. в Белгородской, Курской и Воронежской областях – регионах Центрально-Черноземного района – она составила 52,77; 53,64 и 51,78 случая на 100 тыс. населения соответственно, тогда как в РФ в целом этот показатель оказался равен 51,64 [3–5]. Рак молочной железы является непосредственной причиной смерти каждой 4–5-й женщины, умершей в возрасте 35–54 лет [6].

Генетические факторы имеют большое значение в развитии PMЖ. Отмечается, что примерно в 30 % случаев заболевание имеет наследственный характер [7].

Результаты близнецовых исследований показали, что совокупный риск развития РМЖ в парах сестер, у одной из которых диагностирована данная патология, составляет 28 % для монозиготных близнецов и 20 % для дизиготных близнецов. При этом наследуемость РМЖ достигает 31 %, а вклад средового компонента — 16 %, независимо от наличия менопаузы [8]. Результаты семейных исследований продемонстрировали, что структура генетических факторов риска развития РМЖ разнообразна. Среди членов так называемых раковых семей мутации в генах *BRCA1/2* обнаруживаются в 47 % случаев, прочие высокопенетрантные мутации (в генах *PALB2/FANCN*, *TP53*, *PTEN*, *CDH1*, *STK11*) — в 25 %, среднепенетрантные (в генах *NF1*, *CHEK2*, *ATM*, *NBN*, *RAD51C/D*, *MLH1*) — в 18 %, низкопенетрантные (в генах *MSH2*, *MSH6*) — в 5 %, наследственные генетические синдромы (например, синдром Ли–Фраумени) — в 5 % [7, 9–11]. Вместе с тем роль других генов-кандидатов, способных объяснить случаи возникновения РМЖ, не являющиеся семейными или наследственными, изучена недостаточно.

Таким образом, имеющиеся сведения указывают на большую роль генетических факторов в развитии РМЖ. Поэтому целью настоящего обзора явилось обобщение современных данных о генетических факторах риска возникновения этого заболевания. Также проведена оценка роли в развитии и клиническом течении РМЖ герминальных мутаций и однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms, SNPs), связанных с заболеванием, по результатам полногеномных и других ассоциативных исследований.

ГЕРМИНАЛЬНЫЕ МУТАЦИИ И РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Зарубежные и отечественные авторы выявили множество мутаций с высокой и умеренной пенетрантностью в основных драйверных генах РМЖ, включая *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *ATM*, *PALB2*, *CHEK2* и др. [12–14]. Большинство современных исследований в этой области затрагивает эпидемиологию, а также этнически обусловленные различия в спектре мутаций [15–17].

Например, результаты международного многоцентрового исследования Т. Rebbeck и соавт. с участием 19 581 носительницы мутаций *BRCA1* и 11 900 носительниц мутаций *BRCA2*, родившихся в период с 1937 по 2011 г., показали, что у 9052 (46 %) пациенток с мутацией *BRCA1* был РМЖ, у 2317 (12 %) — рак яичников (РЯ), у 1041 (5 %) — РМЖ и РЯ, у 7171 (37 %) — рака не было. У 6180 (52 %) носительниц мутации *BRCA2* диагностирован РМЖ, у 682 (6 %) — РЯ, у 272 (2 %) — РМЖ и РЯ, у 4766 (40 %) — злокачественные опухоли не выявлены [12].

В еще одном крупном международном зарубежном исследовании, в которое вошли 29 700 семей, изучались особенности распределения мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* по расово-этническому (на основе принципа самоидентификации) и географическому

признакам среди европеоидов, афроамериканцев, латиноамериканцев и азиатов различных частей света. Например, у евреев и представителей европеоидной восточноевропейской популяции в гене *BRCA1* обнаружены повторяющиеся мутации с «эффектом основателя» с.5266dup (5382insC) и с.68_69del (185delAG), у афроамериканцев и латиноамериканцев — с.815_824dup; у европеоидов и евреев — с.3756_3759del; у азиатов и евреев — с.5503 C>T и с.3770_3771del. Выявлены также мутации в гене *BRCA2*: у европеоидов и евреев — с.5946del (6174delT); у европеоидов, афроамериканцев, азиатов, латиноамериканцев и евреев — с.2808_2811del; у европеоидов и латиноамериканцев — с.6275_6276del; у европеоидов и евреев — с.3847_3848del; у афроамериканцев и латиноамериканцев — с.658_659del; у латиноамериканцев и евреев — с.3264dup. Прочие мутации повторяющегося характера в генах *BRCA1* и *BRCA2* встречались у афроамериканцев, азиатов и латиноамериканцев изолированно, не имея совпадений [13].

N. Tung и соавт. проанализировали данные 418 женщин европейской популяции, имеющих личную или семейную историю РМЖ, и выявили патогенные мутации в 10,7 % случаев. Мутации в генах *BRCA1/2* наблюдались у 6,1 % исследуемых. Другие гены предрасположенности к РМЖ включали *CHEK2*, *ATM*, *BRIPI*, *PALB2*, *PTEN*, *NBN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *MSH6* и *PMS2* (суммарная доля 4,6 %). При этом молодой возраст, принадлежность к евреям-ашкенази, трижды негативный РМЖ (ТНРМЖ) и наличие в семейном анамнезе РМЖ или РЯ были достоверно ассоциированы с наличием мутаций в генах *BRCA1/2* ($p \leq 0,01$). В отношении остальных генов предрасположенности к РМЖ достоверных различий с клинико-фенотипическими признаками выявлено не было [14].

В работе Е.Н. Имянитова отмечено, что в славянских популяциях РФ доля носительниц аллеля 5382insC *BRCA1* среди здоровых женщин не превышает 0,1 %, однако данный вариант формирует от 2 до 5 % случаев РМЖ. При этом у пациенток с наличием в семейном анамнезе онкологических заболеваний, билатеральным РМЖ или при возникновении заболевания в молодом возрасте данная мутация встречается в 10 % случаев. Мутации 1100delC в гене *CHEK2* и IVS2+1G>A в гене *CHEK2* выявлены у 2 % больных РМЖ и у 5 % больных с этой патологией в семейном анамнезе. Мутация 657del5 в гене *NBS1* (*NBN*) также наблюдается преимущественно в славянской популяции РФ и связана с повышенным риском развития РМЖ [15].

В работе Л.Н. Любченко и соавт. изучена роль герминальных мутаций в формировании и течении РМЖ. Отмечено, что среди славянского населения РФ в 70 % случаев обнаруживается мутация 5382insC в гене *BRCA1*, также встречаются мутации 4153delA, 300T>G (C61G), 185delAG, 2080delA, 3819delGTAAA, 3875delGTCT в гене *BRCA1* и 6174delT в гене *BRCA2* [16].

Y. Inagaki-Kawata и соавт. в японской популяции исследовали 1995 больных РМЖ. Были изучены пато-

генные варианты герминальных мутаций в 11 генах, вовлеченных в наследственный РМЖ: *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *CDH1*, *STK11*, *NF1*, *PALB2*, *ATM*, *CHEK2* и *NBN1*. Среди них 101 (5,1 %) больная имела патогенные герминальные мутации: 54 (53,5 %) – инсерции или делеции со сдвигом рамки считывания, 35 (34,7 %) – нон-сенс-мутации, 7 (6,9 %) – миссенс-мутации, 4 (4 %) – мутации сайта сплайсинга, 1 (1 %) – синонимичную мутацию. Патогенетически значимые для РМЖ мутации *BRCA2* выявлены у 62 (3,1 %) пациенток, *BRCA1* – у 15 (0,8 %), *PALB2* – у 9 (0,5%), *TP53* – у 4 (0,2 %), *PTEN* – у 4 (0,2 %), *CHEK2* – у 3 (0,2 %), *ATM* – у 3 (0,2 %), *NF1* – у 1 (0,05 %). Патогенных мутаций в генах *CDH1*, *STK11* и *NBN* обнаружено не было. Показано, что биаллельная инактивация генов *TP53* и *RBI*, а также *BRCA1* и *BRCA2* объясняется потерей гетерозиготности 17-й и 13-й хромосом соответственно. При этом в опухолях носительниц мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, также имеющих мутации в генах *TP53* и *RBI*, биаллельная инактивация обнаруживалась в 94 и 9,7 % случаев соответственно [17].

В работе А. Sokolenko и соавт. (2016) показана патологическая роль герминальных мутаций L1705P (с.5114 T>C) (1 случай) и W1837X (с.5511G>A) (1 случай) в гене *BRCA1*, обнаруженных у пациенток с ТНРМЖ. При этом в семьях этих больных наблюдалась полная сегрегация выявленных аллелей с *BRCA1*-ассоциированным РМЖ, а в образцах опухолей – выключение оставшейся копии «дикого» аллеля *BRCA1* (потеря гетерозиготности) [18].

В исследовании М.А. Бермишевой и соавт. представлены результаты скрининга мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *NBN*, *CHEK2*, *PALB2* и *BLM* у пациенток с РМЖ из Республики Башкортостан. Результаты показали, что частота данных мутаций составляет 7,5 % всех случаев РМЖ. Для пациенток славянского происхождения характерны мутации с5266dupC, с181T>G и с.4034delA в гене *BRCA1*, с.5932G>T в гене *ATM*, с.657_661del15 в гене *NBN*, с.444+1G>A, с.1100delC и dele9,10(5kb) в гене *CHEK2*, с.509_510delGA и с.172_175delTTGT в гене *PALB2* и с.642C>T в гене *BLM* [19]. Авторы проанализировали частоту встречаемости мутации с.5161C>T в гене *BRCA1* у пациентов с РМЖ, РЯ и раком предстательной железы татарской и башкирской этнической принадлежности, проживающих в Республике Башкортостан ($n = 696$). Установлено, что мутация с.5161C>T в гене *BRCA1* встречается у пациентов-татар с РМЖ, карциномами яичников и предстательной железы в 1,3 % (6/449) случаев; у пациентов-башкир она не была выявлена. Данная мутация также определена в контрольной выборке (2/700) [20].

Таким образом, почти повсеместно в отношении распространенных драйверных мутаций РМЖ прослеживается «эффект основателя», однако их распределение может быть территориально и этнически неоднородно. Так, в славянских популяциях РФ просле-

живается устойчивое доминирование мутации 5382insC в гене *BRCA1*, однако характерны территориальные различия в частоте встречаемости более редких герминальных мутаций (например, по данным Е.Н. Имяникова и Л.Н. Любченко и соавт. часто обнаруживаются мутации 4153delA, 300T>G (C61G), 185delAG в гене *BRCA1*, при этом в славянской популяции Республики Башкортостан преобладают мутации с5266dupC, с181T>G и с.4034delA в данном гене [15, 16]. Однако в пределах территории Западной Европы прослеживается формирование уникальных этнических мутационных паттернов: в частности, в еврейских популяциях обнаруживаются повторяющиеся мутации, присущие европеоидам (с.5266dup, с.68_69del и с.3756_3759del в гене *BRCA1*) и азиатам (с.5503 C>T и с.3770_3771del в гене *BRCA1*), что, возможно, обусловлено миграционными процессами. Такие особенности могут иметь большое значение для организации медико-генетического консультирования и скрининговых мероприятий на уровне отдельных регионов.

ПОЛНОГЕНОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Поскольку суммарный вклад высоко- и низкопенетрантных герминальных мутаций в развитии РМЖ составляет не более 10 % [14], различные авторские коллективы провели многочисленные исследования этиопатогенетически значимых генов-кандидатов РМЖ и несколько десятков GWAS-исследований, затрагивающих более 180 локусов [21]. Среди них особый интерес представляет исследование D. Easton и соавт., включающее 21 860 больных РМЖ и 22 578 женщин популяционного контроля европейской и азиатской популяций. Проанализированы 227 876 SNPs и продемонстрированы ассоциации 11 локусов с РМЖ. В частности, значимую связь с увеличением риска заболевания (аллельная модель) продемонстрировали локусы rs2981582 (C>T) *FGFR2* (отношение шансов (ОШ) 1,26; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,23–1,30; $p = 2 \cdot 10^{-76}$), rs12443621 (A>G) *TNRC9/LOC643714* (ОШ 1,11; 95 % ДИ 1,08–1,14; $p = 2 \cdot 10^{-19}$) и rs889312 (A>C) *MAP3K1* (ОШ 1,13; 95 % ДИ 1,10–1,16; $p = 7 \cdot 10^{-20}$) [22].

Результаты еще одного исследования С. Turnbull и соавт., в которое вошли представители европейской популяции с семейной историей РМЖ, продемонстрировали роль пяти ранее не изученных локусов в развитии данного заболевания у 12 576 пациенток с РМЖ и 12 223 женщин из группы популяционного контроля и трех изученных ранее SNPs. Выявлено, что аллели Т локуса rs1011970 (ОШ 1,20; 95 % ДИ 1,11–1,30; $p = 2,5 \cdot 10^{-8}$), А локуса rs704010 (ОШ 1,15; 95 % ДИ 1,09–1,23; $p = 3,5 \cdot 10^{-6}$) и Т локуса rs614367 (ОШ 1,15; 95 % ДИ 1,10–1,20; $p = 3,2 \cdot 10^{-15}$) являются факторами риска развития РМЖ. И напротив, аллели Т локуса rs2380205 (ОШ 0,86; 95 % ДИ 0,81–0,92; $p = 4,6 \cdot 10^{-7}$) и А локуса rs10995190 (ОШ 0,86; 95 % ДИ 0,82–0,91; $p = 5,1 \cdot 10^{-15}$) имеют протективное значение в отно-

шении заболевания. Также подтверждена взаимосвязь локусов rs3757318 (6q25.1) ($p = 2,9 \cdot 10^{-6}$), rs1562430 (8q24) ($p = 5,8 \cdot 10^{-7}$) и rs909116 ($p = 7,3 \cdot 10^{-7}$) гена *LSP1* с риском возникновения данной патологии [23].

B. Sehrawat и соавт. выявили новые генетические полиморфизмы, вовлеченные в формирование РМЖ, а также подтвердили данные, полученные в более ранних исследованиях [22, 23] в когорте из 1153 больных и 1215 лиц популяционного контроля (Канада). Шесть ранее не изученных локусов увеличивали риск развития РМЖ: rs1092913 гена *ROPN1L* (5p15.2) (для аллеля Т: ОШ 1,45; 95 % ДИ 1,24–1,69; $p = 1,89 \cdot 10^{-6}$), rs10411161 гена *ZNF577* (19q13.33) (для аллеля Т: ОШ 1,42; 95 % ДИ 1,22–1,65; $p = 7,09 \cdot 10^{-6}$), rs3848562 гена *ZNF577* (19q13.33) (для аллеля Т: ОШ 1,42; 95 % ДИ 1,22–1,66; $p = 9,23 \cdot 10^{-6}$), rs11878583 гена *ZNF577* (19q13.33) (для аллеля Т: ОШ 1,35; 95 % ДИ 1,16–1,57; $p = 1,35 \cdot 10^{-4}$), rs1429142 гена *EDNRA* (4q31.23) (для аллеля Т: ОШ 1,27; 95 % ДИ 1,11–1,45; $p = 3,59 \cdot 10^{-4}$), а также rs1981867 гена *CT6orf61* (16q23.2) (для аллеля G: ОШ 1,22; 95 % ДИ 1,09–1,36; $p = 4,32 \cdot 10^{-4}$) [24].

Исследование в восточноазиатской популяции, в которое вошли 19 091 больной РМЖ и 20 606 женщин контрольной группы, выявило, что локус rs9485372 (6q25.1), расположенный вблизи гена *TAB2* (для аллеля G: ОШ 0,90; 95 % ДИ 0,87–0,92; $p = 3,8 \cdot 10^{-12}$), SNP rs9383951 гена *ESR1* (6q25.1) (для аллеля G: ОШ 0,88; 95 % ДИ 0,84–0,93; $p = 1,9 \cdot 10^{-6}$) снижали риск возникновения заболевания, а локус rs7107217 (11q24.3) (для аллеля А: ОШ 1,08; 95 % ДИ 1,05–1,11; $p = 4,6 \cdot 10^{-7}$) являлся значимым фактором риска развития РМЖ [25].

M. Nan и соавт. провели двухэтапное полногеномное ассоциативное исследование, включавшее 14 224 пациентки с РМЖ восточноазиатской популяции и 14 829 женщин популяционного контроля. Согласно полученным результатам, локус rs12118297 (1p22.3), расположенный рядом с геном *LMO4*, уменьшает риск развития РМЖ (ОШ 0,91; 95 % ДИ (0,88–0,94); $p = 4,48 \cdot 10^{-8}$), что аналогично данным исследования консорциума DRIVE GAME-ON [26, 27], в которое вошли 16 003 больных с РМЖ и 41 335 женщин популяционного контроля европейского происхождения (ОШ 0,95; 95 % ДИ 0,91–0,99; $p = 0,019$). Функциональное значение данного полиморфизма состоит в том, что он способен регулировать экспрессию белка LINC00160, одновременно взаимодействуя с ER-зависимыми (ER – рецептор эстрогена) сигнальными путями. Другой локус – rs16992204 (21q22.12), – расположенный рядом с геном *LINC00160*, увеличивал риск развития РМЖ (ОШ 1,13; 95 % ДИ 1,07–1,18; $p = 4,63 \cdot 10^{-8}$), хотя в европейских популяциях не было обнаружено значимых ассоциаций с данным SNP [26].

K. Michailidou и соавт. провели большое многоэтапное исследование GWAS, в которое вошли 122 977 больных РМЖ и 105 974 женщины контрольной группы европейской популяции. Авторы также изучили данные 14 068 пациенток и 13 104 женщин группы контроля в азиатской популяции. Продемонстрированы

ассоциации 65 новых локусов, связанных с РМЖ, с порогом уровня значимости $p < 5 \cdot 10^{-8}$. Показано, что большая часть SNPs из исследованных локусов приходится на дистальные регуляторные элементы (авторы использовали анализ *in silico* для выявления целевых регуляторных элементов по каждому локусу в клетках молочной железы). Также установлено, что наследуемость РМЖ по всем SNPs, оказывающим регуляторное воздействие, суммарно была в 2–5 раз выше по сравнению со средним показателем по всему геному, с сильным обогащением для конкретных сайтов связывания факторов транскрипции [28].

Таким образом, в рамках ассоциативных исследований (GWAS и др.) выявлены многочисленные генетические маркеры, вовлеченные в развитие РМЖ, а также установлены различные биологические пути, характеризующие их функциональное значение. Однако для разных популяций получены неоднозначные результаты по одним и тем же полиморфизмам, например локус rs16992204, повышающий риск развития РМЖ в азиатской популяции, у европейцев не был ассоциирован с данной патологией. При этом «рисковое значение» в формировании РМЖ установлено для SNPs, которые не считались патогенетически значимыми в предыдущих работах по локусам rs1011970, rs704010 и rs614367, благодаря увеличению мощности исследований.

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ И РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (АССОЦИАТИВНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)

Поскольку суммарный вклад высоко- и низкопенетрантных герминальных мутаций в развитие РМЖ составляет примерно 10 % [14], а данные GWAS объясняют не более 18 % наследуемости при РМЖ [28], значительное количество работ по поиску ассоциаций генов-кандидатов с возникновением данной патологии посвящено изучению вовлеченности регуляторов основных сигнальных путей, играющих большую роль в канцерогенезе: генов ER, цитокинов, факторов роста, углеводного обмена и др. [29–34].

Так, результаты крупного исследования, проведенного в азиатской популяции, в которое вошли 12 821 пациентка с РМЖ и 14 739 женщин контрольной группы, продемонстрировали протективную роль полиморфизма rs9340799 гена *ESR1* (*XbaI*) в кодоминантной (для генотипа AG: ОШ 0,88; 95 % ДИ 0,79–0,97; $p = 0,015$) и доминантной (для генотипов AG + GG: ОШ 0,89; 95 % ДИ 0,80–0,98; $p = 0,022$) моделях [29].

Q. Zheng и соавт. в своем метаанализе изучили ассоциации полиморфизмов гена митоген-активируемой протеинкиназы 1 (*MAP3K1*), который расположен на хромосоме 5q11.2 и кодирует серин/треонинкиназу сигнального пути митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), регулирующего транскрипцию важных онкогенов *c-Myc*, *c-Elk1*, *c-Jun* и *cFos* в европейской, азиатской и африканской популяциях. Авторы выявили,

что значимые ассоциации с риском развития РМЖ наблюдались для SNPs rs889312 гена *MAP3K1* (для аллеля А в гетерозиготной кодоминантной модели: ОШ 1,09; 95 % ДИ 1,02–1,17; $p = 0,011$) и rs16886165 гена *MAP3K1* (для аллеля G: ОШ 1,14; 95 % ДИ 1,09–1,20; $p < 0,05$). При анализе подгрупп по этнической принадлежности значимые связи rs889312 с высоким риском возникновения данной патологии обнаружены у европейцев (для аллеля А: ОШ 1,12; 95 % ДИ (1,10–1,14); $p < 0,05$) и азиатов (для аллеля А: ОШ 1,09; 95 % ДИ 1,05–1,14; $p < 0,05$) [30].

J. Chen и соавт. провели метаанализ, в который вошли 33 194 больных РМЖ и 36 661 женщина контрольной группы, направленный на определение роли полиморфизма гена лейкоцит-специфического протеина 1-го типа (*LSP1*) в развитии РМЖ. Авторы продемонстрировали, что полиморфизм rs3817198 (Т>С) гена *LSP1* ассоциирован с возникновением карцином молочной железы (доминантная модель: ОШ 1,11; 95 % ДИ 1,06–1,17; $p = 0,021$) у женщин европейской и азиатской популяций. Вместе с тем данный SNP является протективным фактором в отношении риска развития РМЖ в африканской популяции (в рецессивной модели для генотипов ТС + ТТ: ОШ 0,43; 95 % ДИ 0,22–0,88; $p < 0,05$) [31].

Результаты исследования J. Shi и соавт. продемонстрировали большую роль полиморфизмов rs1019731 и rs12821878 гена *IGF1* в отношении риска развития РМЖ. В европейской популяции минорные аллели двух SNPs – rs1019731 и rs12821878 – были связаны со снижением риска возникновения РМЖ (для аллеля А: ОШ 0,67; 95 % ДИ 0,53–0,84; $p < 0,01$ и ОШ 0,73; 95 % ДИ 0,61–0,88); $p < 0,01$ соответственно). У азиатских женщин выявлена связь между четырьмя SNPs гена *IGF1*, находящимися в сильном неравновесии по сцеплению. Обнаружено, что в постменопаузе наличие минорных аллелей в локусах rs17727841 гена *IGF1* (ОШ 0,44; 95 % ДИ 0,27–0,72; $p < 0,01$), rs2288378 гена *IGF1* (ОШ 0,43; 95 % ДИ 0,26–0,69; $p < 0,01$), rs7136446 гена *IGF1* (ОШ 0,45; 95 % ДИ 0,28–0,72; $p < 0,01$) и rs7956547 гена *IGF1* (ОШ 0,45; 95% ДИ 0,28–0,73; $p < 0,01$) достоверно связано со снижением риска развития РМЖ [32].

Интересные данные получены Т.Ф. Маливановой и соавт. в отношении полиморфизмов -308G>A *TNFA* (rs1800629) и -238(G/A) *TNFA* (rs361525), которые входят в определенные гаплотипы по комплексу генов человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA) в общероссийской популяции. Показано, что изученные полиморфизмы гена *TNFA* не влияют на общую предрасположенность к РМЖ, что отличается от результатов метаанализа С. Shen и соавт., в котором определено протективное значение полиморфизма -308G>A *TNFA* (для аллеля А: ОШ 0,927; 95 % ДИ 0,879–0,978; $p = 0,005$) в формировании РМЖ в европейской популяции. Однако авторы выявили ассоциацию аллелей -308А и -238А гена *TNFA* с развитием РМЖ в составе гаплотипов АН8.1 и В57 соответственно [33].

Одной из целей исследования Z. Li и соавт. было изучение ассоциаций четырех SNPs гена *VEGF*: -460Т/С (rs833061), -634G/С (rs2010963), -2578С/А (rs699947) и +936Т/С (rs3025039) с заболеваемостью РМЖ в североазиатской популяции. Отмечены значительные различия в частотах аллелей и распределении генотипов -634G/С *VEGF* между группой больных РМЖ и здоровыми женщинами ($p = 0,006$). По данному локусу (rs2010963) у носительниц аллеля G выявлен более низкий риск развития РМЖ (ОШ 0,866; 95 % ДИ 0,782–0,959; $p = 0,013$); наличие генотипов СG (ОШ 0,860; 95 % ДИ 0,757–0,978; $p = 0,022$) и GG (ОШ 0,778; 95 % ДИ 0,656–0,924; $p = 0,004$) также обуславливало низкий риск возникновения РМЖ. Гаплотип (-460Т/-634С/-2578С/+936С) оказался ассоциирован с повышенным риском развития РМЖ (ОШ 1,445; 95 % ДИ (1,123–1,859; $p = 0,004$), тогда как гаплотип (-460Т/-634G/-2578С/+936С) был протективным фактором (ОШ 0,736; 95 % ДИ 0,563–0,963; $p = 0,025$) [34].

Исследования ассоциаций полиморфизма генов *MMPs* с формированием и течением РМЖ проводились зарубежными и отечественными авторскими коллективами [35–39]. Матриксные металлопротеиназы (*MMPs*) рассматриваются в качестве значимых регуляторов опухолевой прогрессии. Их экспрессия влияет на развитие различных типов карцином молочной железы [35–37]. Наряду с этим биологические эффекты *MMPs* могут быть взаимосвязаны с конституциональными и генетическими особенностями больных РМЖ [38–39].

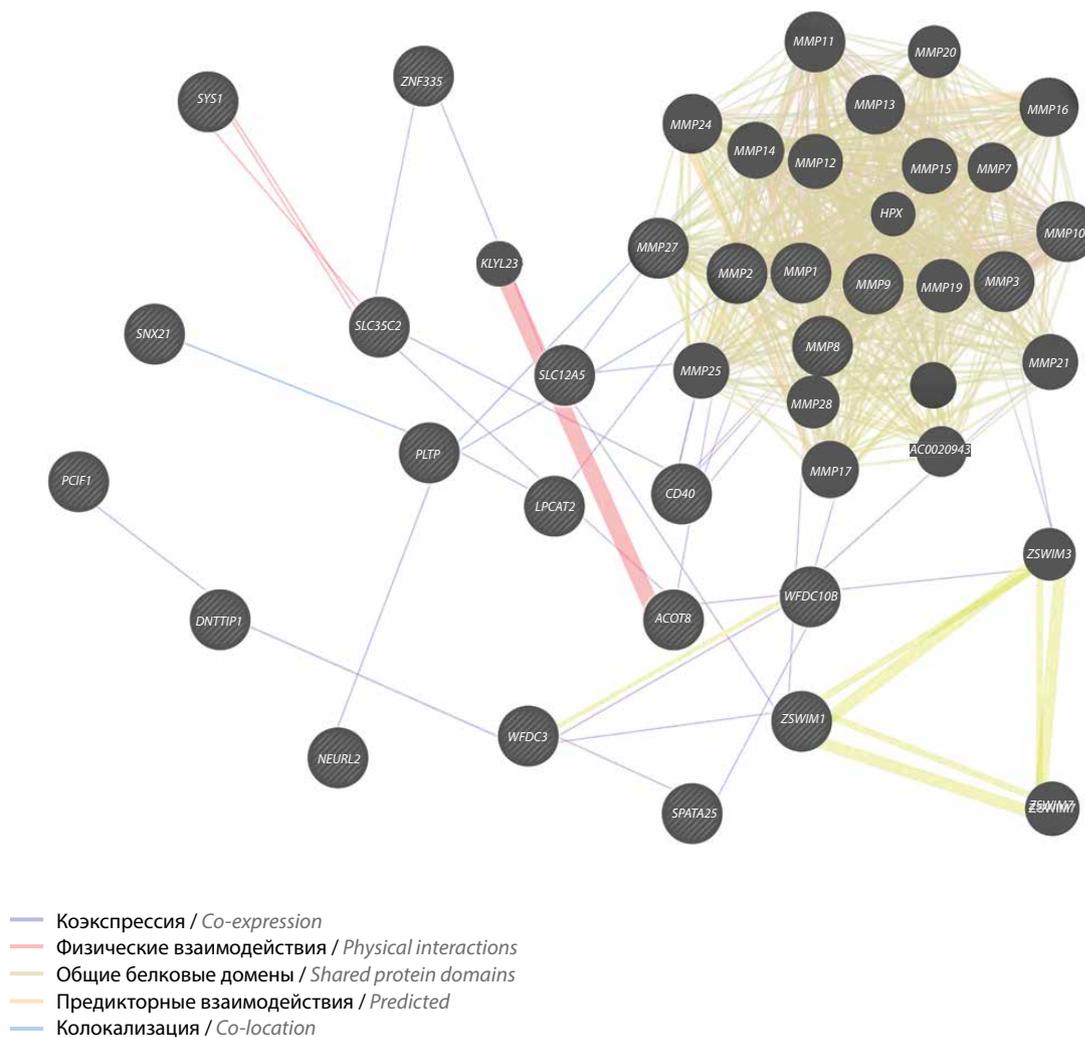
Отечественные авторы изучали вовлеченность полиморфных маркеров промоторных участков генов *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* в формирование вариантов клинического течения РМЖ в общероссийской женской популяции. Показано, что у больных РМЖ реже выявляется генотип 6А6А промотора гена -1171 5А/6А *MMP3* (rs35068180), приводящий к снижению экспрессии *MMP3* (ОШ 0,46; 95 % ДИ 0,30–0,72; $p = 0,00047$), что является протективным фактором в отношении развития РМЖ [35].

Аналогичные исследования проводились и за рубежом. Так, в метаанализе L. Zhang и соавт. рассматривались полиморфизмы *MMP9* в локусах rs17576, rs2250889, rs3918242 и rs3787268. При этом для локуса rs3918242 полиморфизма с.-1562С>Т *MMP9* продемонстрировано, что, хотя частота аллеля риска С была выше у пациенток с РМЖ, чем в контрольной группе, только генотип ТТ в рецессивной модели оказался достоверно связан с повышенным риском развития РМЖ (ТТ vs СТ + СС: ОШ 1,55; 95 % ДИ 1,12–2,16; $p = 0,009$). Остальные полиморфизмы не показали значимых связей с изучаемым заболеванием [36].

Результаты исследования Н.В. Павловой и соавт. показали, что распределение аллельных вариантов с.836А>G (rs17576) и с.1721С>G (rs2250889) *MMP9* значительно различалось в группах больных РМЖ и здоровых женщин популяционного контроля, при этом

минорные аллели G этих SNPs являлись протективными факторами в отношении РМЖ (в аллельной модели: ОШ 0,82; 95 % ДИ 0,68–0,99 и ОШ 0,71; 95 % ДИ 0,52–0,97 соответственно; $p_{\text{perm}} \leq 0,035$ (по результатам пермутационного теста)). Продемонстрированы межгенные взаимодействия, определяющие подверженность РМЖ (с использованием онлайн-программы GeneMANIA), в основе которых лежат коэкспрессия (40,67 %), общие белковые домены (30,90 %), физические (15,96 %) и предикторные (8,77 %) взаимодействия, а также колокализация (3,71 %) [37] (см. рисунок). Также авторы выявили, что ожирение оказывает значительное модифицирующее влияние на ассоциацию генов *MMPs* с риском развития РМЖ у женщин в постменопаузе: полиморфные локусы *MMP9* с.836A>G (rs17576) и с.1721C>G (rs2250889) являются протективными факторами в отношении РМЖ у женщин с ожирением (для аллельной модели: ОШ 0,71; $p = 0,047$, для аддитивной модели: ОШ 0,55; $p = 0,042$

соответственно). Генотипы ТТ *MMP2* (с.-1306 C>T, rs243865) и АА *MMP9* (с.1331-163 G>A, rs3787268) повышали риск развития РМЖ у женщин без ожирения в рецессивной модели (ОШ 0,31; $p = 0,043$ и ОШ 2,36; $p = 0,024$ соответственно) [38]. Кроме того, продемонстрировано, что генотип ТТ rs1940475 *MMP8* связан с риском развития РМЖ у женщин с высокопенетрантными мутациями в генах *BRCA1* и *CHEK2* (3,84 %) и встречается в 6–7 раз реже по сравнению с пациентками, не имеющими этих мутаций (22,80 %; $p_{\text{perm}} = 0,04$). А среди больных РМЖ, не имеющих высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2*, с заболеванием ассоциированы полиморфизмы гена *MMP9* rs17576 (использовались ковариаты (cov): возраст и индекс массы тела) (ОШ_{cov} = 0,81; $p_{\text{cov}} = 0,03$), rs2250889 (доминантная модель: ОШ_{cov} 0,61; аддитивная модель: ОШ_{cov} 0,66; $p_{\text{cov}} = 0,03$), rs3787268 (ОШ_{cov} 2,03; $p_{\text{cov}} = 0,04$) и 9 различных гаплотипов шести изученных локусов *MMP9* ($p_{\text{perm}} < 0,05$) [39].



Сеть генов-кандидатов, вовлеченных в формирование рака молочной железы (программа GeneMANIA)
 A network of candidate genes involved in the formation of breast cancer (GeneMANIA program)

Таким образом, результаты ассоциативных исследований SNPs генов, отвечающих за экспрессию сигнальных молекул, которые регулируют опухолевую прогрессию, неоднозначны. Например, в одном из отечественных исследований полиморфного маркера $-308G>A$ *TNF α* не выявлено его значимых взаимосвязей с развитием РМЖ, тогда как результаты большого европейского метаанализа показали протективное значение этого локуса в возникновении заболевания. Наряду с этим имеются убедительные данные об ассоциациях как отдельных генов-кандидатов, так и определенных гаплотипов с формированием РМЖ. Например, аллель G локуса rs2010963 -634G/C *VEGF* обуславливает низкий риск развития РМЖ у его носительниц, а гаплотип (-460T/-634C/-2578C/+936C) 4 локусов гена *VEGF* связан с повышенным риском развития РМЖ. В одной из отечественных работ показано, что при отсутствии в генотипе больных высокопенетрантных мутаций *BRCA1* и *CHEK2* с заболеванием ассоциированы полиморфизмы гена *MMP9* rs17576, rs2250889, rs3787268 и 9 различных гаплотипов гена *MMP9*.

Итак, несмотря на то, что имеется много данных о роли SNPs генов-кандидатов в формировании РМЖ (данные GWAS и других многочисленных ассоциативных работ), нередко результаты работ не согласуются между собой. В связи с этим необходимы дальнейшие генетико-эпидемиологические исследования РМЖ, направленные на уточнение роли различных генетических факторов и межгенных взаимодействий в формировании заболевания в различных этнотерриториальных группах населения.

Согласно имеющимся GWAS-данным, развитие РМЖ связано с более чем 180 SNPs различных генов-кандидатов, которые определяют показатель наследуемости в 18 %. Однако показатель наследуемости заболевания, по результатам GWAS, существенно меньше (в 1,7 раза), чем показатели, полученные в близнецовых исследованиях (31 %). Эти данные указывают на наличие проблемы недостающей наследственности при РМЖ: около 40 % наследственных факторов, определяющих подверженность заболеванию, на сегодняшний момент остаются неизвестными, что определяет необходимость продолжения генетико-эпидемиологических исследований, направленных на поиск генетических детерминант РМЖ.

ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ НА ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Высокопенетрантные мутации в генах предрасположенности к РМЖ, а также многочисленные функционально значимые для развития заболевания генетические полиморфизмы могут быть тесно связаны с морфологическими характеристиками опухоли. Например, результаты работы Л.Н. Любченко и соавт. показали, что у носительниц герминальных мутаций

в гене *BRCA1* преобладает инфильтративно-протоковый рак, 80 % *BRCA1*-ассоциированных карцином относятся к ТНПМЖ с преобладанием базального фенотипа. Тем не менее лишь 10 % случаев ТНПМЖ случаев являются *BRCA1*-ассоциированными [16].

Y. Inagaki-Kawata и соавт. выявили, что у носительниц мутаций в гене *BRCA1* с большей вероятностью разовьется ТНПМЖ (определяет неблагоприятный прогноз) по сравнению с носительницами прочих герминальных мутаций ($p = 0,0007$) и женщинами без таковых ($p = 0,0001$). В отношении мутаций в гене *BRCA2* не установлены значимые взаимосвязи с различными молекулярными подтипами РМЖ [17].

Интересные данные в отношении ТНПМЖ получены в ходе исследования К. Purrington и соавт. (GWAS), проведенного в европейской популяции, в которое вошли 2148 больных и 1309 женщин группы популяционного контроля. Авторы проанализировали ассоциацию 10 локусов (*LGR6*, *MDM4*, *CASP8*, *2q35*, *2p24.1*, *TERT-rs10069690*, *ESR1*, *TOX3*, *19p13.1*, *RALY*) с ТНПМЖ. Выявлена связь с ТНПМЖ для группы из 15 «новых» локусов (*PEX14*, *2q24.1*, *2q31.1*, *ADAM29*, *EBF1*, *TCF7L2*, *11q13.1*, *11q24.3*, *12p13.1*, *PTHLH*, *NTN4*, *12q24*, *BRCA2*, *RAD51L1-rs2588809*, *MKLI*). Кроме того, локусы rs12525163 гена *ESR1* (ОШ 1,15; $p = 4,9 \cdot 10^{-4}$) и rs1864112 (19p13.1) (ОШ 0,84; $p = 1,8 \cdot 10^{-9}$) также продемонстрировали значимую ассоциацию с развитием ТНПМЖ. Интересно, что оценка полигенного риска (среди 27 «новых» полиморфизмов и 74 ранее известных) показала 4-кратную разницу в показателях групп с самым высоким (3,4 %) и самым низким (0,8 %) рисками развития ТНПМЖ (ОШ 4,03; 95 % ДИ 3,46–4,70; $p = 4,8 \cdot 10^{-69}$) [40].

Полногеномное ассоциативное исследование, проведенное D. Нюо и соавт. в популяции женщин африканского происхождения (участвовали 1093 пациентки с РМЖ и 2939 женщин популяционного контроля) установило ассоциацию локуса rs1307471 (13q26.21), расположенного рядом с геном *TNFSF10*, с развитием ER-отрицательного РМЖ (ОШ 1,29; 95 % ДИ 1,18–1,40; $p = 1,8 \cdot 10^{-8}$). Ген *TNFSF10* экспрессируется в широком спектре тканей, включая лимфоциты крови, молочную, предстательную, слюнные железы, легкие и селезенку. При этом протеин TNFSF10 вызывает апоптоз опухолевых клеток при ТНПМЖ, в то время как ER-положительные опухоли устойчивы к его действию. Авторы также подтвердили функциональное значение локусов rs10069690 (5p15.33) (ОШ 1,30; $p = 2,4 \cdot 10^{-10}$) в развитии повышенного риска ER-отрицательного РМЖ и rs12998806 (2q35) (ОШ 1,34; $p = 2,2 \cdot 10^{-8}$) в формировании ER-положительного РМЖ [41].

Результаты исследования спорадического РМЖ китайских авторов продемонстрировали значимую ассоциацию полиморфизма rs2981582 гена *FGFR2* (кодминантная модель для генотипов СТ + ТТ: ОШ 1,44, 95 % ДИ 1,17–1,77; $p = 0,003$) с повышением риска развития ER-положительного РМЖ по сравнению

с ER-отрицательным вариантом этого заболевания. Напротив, полиморфный локус rs250108 гена *FGF1* был значимо ассоциирован с гормон-отрицательным РМЖ (кодоминантная модель для генотипов СТ + ТТ: ОШ 1,68; 95 % ДИ 1,20–2,35; $p = 0,008$). Интересно, что локус rs2051579 гена *RBFOX2* не был достоверно связан с общим риском развития РМЖ, однако его аллель А значимо ассоциирован со снижением риска возникновения заболевания лишь среди больных, имеющих ER-отрицательный вариант опухоли (в кодоминантной модели для генотипов СА + АА: ОШ 0,71; 95 % ДИ 0,52–0,97; $p = 0,033$) [42].

Результаты большого метаанализа показали роль полиморфизма гена *LSP1*. Локус rs3817198 (Т>С) *LSP1* ассоциирован с карциномами молочной железы у лиц с мутациями в генах *BRCA1* (в аддитивной модели для аллеля Т: ОШ 1,08; 95 % ДИ 1,03–1,12; $p < 0,05$) и *BRCA2* (в аддитивной модели для аллеля Т: ОШ 1,11; 95 % ДИ 1,05–1,18; $p < 0,05$), а также может способствовать развитию ER-положительных карцином молочной железы (в аддитивной модели для аллеля Т: ОШ 1,11; 95 % ДИ 1,02–1,21; $p < 0,05$) [31].

Установлена патогенетическая роль гена *IGF1* в отношении морфологических вариантов карцином молочной железы в азиатской популяции. Полиморфный маркер rs2288378 этого гена обуславливает фенотипическую гетерогенность РМЖ, уменьшая частоту карцином ER+/PR+/HER2– (PR – рецептор прогестерона, HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа), прогностически более благоприятных по сравнению с ТНРМЖ (ОШ 0,53; 95 % ДИ 0,35–0,82; $p = 0,04$) [32].

А. Vartnykaitė и соавт. проанализировали вовлеченность генов *MMPs* в развитие клинико-патологических особенностей РМЖ в европейской популяции. Среди 100 больных РМЖ проведен поиск ассоциаций между шестью генетическими вариантами *MMPs* (*MMP1* rs1799750, *MMP2* rs243865, *MMP3* rs3025058, *MMP7* rs11568818, *MMP8* rs11225395, *MMP9* rs3918242) и определенными фенотипическими характеристиками: возрастом установления диагноза, размером опухоли, поражением регионарных лимфатических узлов, рецепторным статусом и гистологическим типом опухоли, степенью злокачественности, прогрессированием и летальным исходом. Показано, что у пациенток с генотипом 1G1G *MMP1* (rs1799750) низкодифференцированный РМЖ развивается реже по сравнению с пациентками с генотипом 2G2G *MMP1* (rs1799750) (ОШ 0,095; 95 % ДИ 0,022–0,406; $p = 0,001$). Также установлено, что генотип GG *MMP7* (rs11568818) сильно ассоциирован с развитием низкодифференцированного РМЖ по сравнению с генотипом AA (ОШ 6,562; 95 % ДИ 1,532–28,120; $p = 0,011$). Полиморфизм rs11225395 гена *MMP8* не показал статистически значимой связи с PR-отрицательным РМЖ ($p > 0,05$), а наличие аллеля С *MMP9* (rs3918242) было достоверно связано со снижением вероятности развития HER2-

положительного РМЖ (ОШ 0,256; 95 % ДИ (0,157–0,419; $p = 0,000$). Другие молекулярные маркеры не продемонстрировали значимых взаимосвязей с РМЖ [43].

Таким образом, влияние генетических факторов на морфологические характеристики РМЖ значительно. У больных, имеющих герминальные мутации в генах *BRCA1/2*, часто встречаются базальноподобные карциномы, а результаты GWAS и других ассоциативных исследований генов-кандидатов РМЖ продемонстрировали выраженное влияние генетических факторов на фенотип опухоли (например, локусы rs12525163, rs4679741, rs1106333, rs78754389, rs2981582, rs2288378 и др.). Одни из упомянутых генетических маркеров находятся в сильном неравновесии по сцеплению (например, локусы rs17727841, rs2288378, rs7136446 и rs7956547 гена *IGF1*). Другие также проявляют свои биологические эффекты при присутствии в генотипе высокопенетрантных мутаций (например, локус rs3817198 (Т>С) *LSP1* ассоциирован с карциномами молочной железы у лиц с мутациями в генах *BRCA1*). Наличие у больных ER/PR-отрицательных карцином, в частности ТНРМЖ, тесно связано с неблагоприятным прогнозом заболевания, поэтому определение молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с морфологическими характеристиками РМЖ, может иметь большое практическое значение в диспансерном наблюдении.

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Отдельные молекулярно-генетические факторы, вовлеченные в патогенез РМЖ, значимо определяют течение и прогноз заболевания. Y. Inagaki-Kawata и соавт. установили значимую роль мутаций в гене *BRCA1* в развитии ТНРМЖ ($p = 0,0007$) в рамках тенденций и выявили, что прогрессирование заболевания чаще отмечалось среди молодых носительниц мутаций в гене *BRCA1* [17].

Интересные результаты были получены А. Могга и соавт. в ходе исследования GWAS, в которое вошли 91 686 пациенток с РМЖ европейского происхождения. Авторы установили значимые ассоциации локуса rs5934618 с развитием РМЖ III стадии (для аллеля G: отношение рисков (ОР) 1,32; 95 % ДИ 1,20–1,45; $p = 1,4 \cdot 10^8$) [44].

Согласно результатам исследования Т.А. Маливановой и соавт., влияние полиморфизмов гена *TNFA* на прогноз РМЖ зависит от наличия определенных маркерных аллелей гаплотипа АН8.1 (*HLA-A*01*, *HLA-B*08* и *HLA-DRB1*03*). Так, при заболевании II стадии 10-летняя выживаемость более 80 % наблюдалась у носительниц генотипов –308AG *TNFA* и –238GG *TNFA* при наличии маркерных аллелей гаплотипа АН8.1 и –308GG *TNFA* и –238GG *TNFA* независимо от маркеров АН8.1; при этом 10-летняя общая выживаемость была менее 50 % у носительниц генотипов

–308AG *TNF α* и –238GG *TNF α* при отсутствии маркеров АН8.1 и генотипов –308GG *TNF α* и –238AG *TNF α* ($p = 0,0076$) [33].

Изучение ассоциаций SNPs гена *VEGF* –460Т/С (rs833061), –634G/С (rs2010963), –2578С/А (rs699947) и +936Т/С (rs3025039) – с агрессивностью течения и экспрессией опухолевых маркеров РМЖ населения севера КНР показало, что экспрессия иммуногистохимического маркера Ki-67 зависит от полиморфного локуса rs2010963 гена *VEGF* и значимо увеличивается у носительниц генотипа СС ($p = 0,031$) [34].

А.В. Шевченко и соавт. установили, что в женской популяции РФ генотип –1562СС *MMP9* (rs3918242) (ОШ 0,60; 95 % ДИ 0,37–0,97; $p = 0,0389$) уменьшает экспрессию синтезируемого фермента и лимфогенное метастазирование РМЖ. Доля генотипа –1171 5А/6А *MMP3* (rs35068180) повышена среди больных РМЖ (ОШ 1,61; 95 % ДИ 1,03–2,50; $p = 0,0034$), однако при этом снижается степень злокачественности карцином [35].

Таким образом, определенные генетические маркеры значимо влияют на течение и прогноз РМЖ. При этом одни факторы определяют развитие клинически неблагоприятных фенотипов (мутации *BRCA1* связаны с прогрессированием РМЖ у молодых женщин), другие (rs5934618, –308 G/A *TNF α* и –238G/A *TNF α*) оказывают влияние на выживаемость больных, а третьи (rs833061, rs2010963, rs699947, rs3025039, rs3918242, rs35068180) определяют агрессивность, степень злокачественности и способность опухолей к метастазированию. Эти данные могут иметь практическое значение при выборе клинической стратегии ведения больных РМЖ.

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ ЛЕЧЕНИЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Высокопенетрантные мутации в генах предрасположенности к РМЖ и многочисленные функционально значимые для развития заболевания генетические полиморфизмы связаны с чувствительностью карцином к противоопухолевой лекарственной терапии. Так, Е.Н. Имянитов отмечает, что *BRCA1*-ассоциированные карциномы молочной железы крайне чувствительны к цисплатину [15].

В отношении различных типов лекарственного лечения РМЖ А. Могга и соавт. выявили значимые ассоциации локуса rs4679741 с развитием ER-положительного РМЖ у пациенток, получавших гормональную терапию (для аллеля G: ОР 1,18; 95 % ДИ 1,11–1,26; $p = 1,6 \cdot 10^{-7}$), а также локусов rs1106333 (для аллеля А: ОР 1,68; 95 % ДИ 1,39–2,03; $p = 5,6 \cdot 10^{-8}$) и rs78754389 (для аллеля А: ОР 1,79; 95 % ДИ 1,46–2,20; $p = 5,6 \cdot 10^{-8}$) с развитием ER-отрицательного РМЖ у пациенток, получавших химиотерапию [44].

По данным метаанализа, показавшего «рисковое значение» локуса rs3817198 (Т>С) *LSP1* в развитии ER-положительных карцином молочной железы, экспрессия протеина *LSP1* находилась в обратной зависимости

от концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) доксорубина ($p = 8,91 \cdot 10^{-15}$; $Cor = -0,23$), 5-фторурацила ($p = 1,18 \cdot 10^{-22}$; $Cor = -0,29$) и цисплатина ($p = 1,35 \cdot 10^{-42}$; $Cor = -0,40$) [31].

Результаты клинического исследования Y. Wang и соавт. продемонстрировали роль SNPs гена рецептора эпидермального фактора роста (*EGFR*) в индивидуальной чувствительности к неoadьювантной химиотерапии у 118 пациенток с РМЖ. Авторы выявили, что частота генотипа АА локуса rs845552 у больных с HER2-положительным РМЖ была выше по сравнению с другими генотипами (АА vs АG: $p = 0,039$; АА vs GГ: $p = 0,005$; АА vs АG + GГ: $p = 0,009$). Также отмечено, что лечебный патоморфоз реже достигался у пациенток с генотипом СТ локуса rs1468727 по сравнению с носительницами генотипов СС + ТТ (ОШ 0,288; 95 % ДИ 0,109–0,762; $p = 0,012$) или только генотипа СС (ОШ 0,254; 95 % ДИ 0,076–0,849; $p = 0,026$). Кроме того, установлены значимые ассоциации SNPs локусов rs1468727 и rs845552 гена *EGFR* с гепато-, дермато-, нейротоксичностью, а также с алопецией в процессе лекарственного лечения (для генотипа ТТ: ОШ 17,183; 95% ДИ 1,524–193,721; $p = 0,021$; для генотипа GГ: ОШ 10,876; 95 % ДИ 1,059–111,680; $p = 0,045$) [45].

Таким образом, результаты GWAS и других ассоциативных исследований генов-кандидатов РМЖ продемонстрировали значимое влияние генетических факторов на особенности выбора противоопухолевого лекарственного лечения. Потеря гетерозиготности в клетках карцином у больных с мутациями в генах *BRCA1/2* значительно повышает чувствительность новообразований к воздействию препаратов платины. Также показано модулирующее действие некоторых химиотерапевтических препаратов на экспрессию продуктов гена, определяющего риск развития РМЖ (*LSP1*), а для двух локусов гена *EGFR* (rs1468727 и rs845552) определены гено-фенотипические закономерности ответа на противоопухолевое лечение и возникновение побочных эффектов.

Итак, генетические факторы, определяющие клинико-патологические особенности РМЖ, имеют серьезное клиническое значение и большие перспективы. Более широкое их использование в практической медицине позволит эффективно определять индивидуальную тактику ведения и лечения больных РМЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре продемонстрировано значение генетических факторов в формировании и течении РМЖ. Показано, что заболевание обусловлено влиянием герминальных мутаций в генах восприимчивости к РМЖ (*BRCA1*, *BRCA2*, *CHECK2*, *NBN*, *PTEN* и др.) не более чем в 5 % случаев. В отношении высокопенетрантных драйверных мутаций прослеживается «эффект основателя», при этом их распределение в популяциях неоднородно. Например, среди славянского населения РФ наблюдается устойчивое доминирование мутации

5382insC в гене *BRCA1*. Вместе с тем носительство мутаций данной группы у пациенток с РМЖ обуславливает развитие ТНРМЖ, характеризующегося тяжелыми течением и прогнозом. Однако у больных с мутациями в гене *BRCA 1/2* отмечена высокая восприимчивость к терапии цисплатином.

В связи с малой распространенностью герминальных мутаций в популяции значение других генетических детерминант по-прежнему остается предметом обсуждения. Так, согласно данным исследования GWAS, наследуемость при РМЖ составляет 18 %. Установлены молекулярно-генетические маркеры, вовлеченные в развитие заболевания, а также выявлены различные биологические пути, определяющие их функциональное значение. Определена клиничко-патологическая роль различных полиморфных маркеров при РМЖ. Например, установлено значимое влияние на развитие ТНРМЖ 27 различных локусов.

При этом на современном этапе значительная часть генетических детерминант РМЖ (>40 %) остается недостаточно изученной. Современные исследования ассоциаций различных генов-кандидатов (*ESR1/2*, *VEGF*, *TNF α* , *MMPs* и др.) с формированием РМЖ указывают на их вовлеченность в разнообразные пути канцерогенеза (например, инвазии, метастазирования и др.). Для таких локусов характерны сильное влияние на фенотип опухоли, восприимчивость к карцином к противоопухолевому лекарственному лечению, особенности течения и прогноза. Тем не менее детальные механизмы действия генетических факторов на развитие РМЖ по-прежнему неясны, а их влияние на этиопатогенез и клиническое течение заболевания многовекторно. В связи с этим уточнение роли молекулярно-генетических маркеров в формировании РМЖ и его клинических особенностей остается важной научно-практической задачей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Gradishar W.J., Anderson B.O., Blair S.L. et al. Breast cancer version 3.2014. *J Natl Compr Canc Netw* 2014;12(4):542–90. DOI: 10.6004/jncn.2014.0058
2. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660
3. Злокачественные новообразования в России в 2018 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. 250 с. Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskii, G.V. Petrova. *Malignant neoplasms in Russia in 2018*. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2019. 250 p. (In Russ.).
4. Пасенов К.Н. Особенности ассоциаций SHBG-связанных генов с раком молочной железы у женщин в зависимости от наличия наследственной отягощенности и мутаций в генах *BRCA1/CHEK2*. Научные результаты биомедицинских исследований 2024;10(1): 69–88. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-1-0-4 Pasenov K.N. Features of associations of SHBG-related genes with breast cancer in women, depending on the presence of hereditary burden and mutations in the *BRCA1/CHEK2* genes. *Nauchnye rezul'taty biomedicinskikh issledovaniy = Research Results in Biomedicine* 2024; 10(1):69–88. (In Russ.). DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-1-0-4
5. Здравоохранение в России. 2021: стат. сб. Росстат, 2021. 171 с. *Healthcare in Russia. 2021: stat. sb. Rosstat, 2021. 171 p.* (In Russ.).
6. 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
7. Lilyquist J., Ruddy K.J., Vachon C.M., Couch F.J. Common genetic variation and breast cancer risk-past, present, and future. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2018;27(4):380–94. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-17-1144
8. Möller S., Mucci L.A., Harris J.R. et al. The heritability of breast cancer among women in the Nordic twin study of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016;25(1):145–50. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0913
9. Shiovitz S., Korde L.A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol* 2015;26(7):1291–9. DOI: 10.1093/annonc/mdv022
10. Валова Я.В., Мингажева Э.Т., Прокофьева Д.С. и др. Рак яичников в составе наследственных онкологических синдромов (обзор). Научные результаты биомедицинских исследований 2021;7(4):330–62. Valova Ya.V., Mingazheva E.T., Prokof'eva D.S. et al. Ovarian cancer as part of hereditary oncological syndromes (review). *Nauchnye rezul'taty biomedicinskikh issledovaniy = Research Results in Biomedicine* 2021;7(4):330–62. (In Russ.). DOI: 10.18413/2658-6533-2021-7-4-0-2
11. Shen L., Zhang S., Wang K., Wang X. Familial breast cancer: disease related gene mutations and screening strategies for chinese population. *Front Oncol* 2021;11:740227. DOI: 10.3389/fonc.2021.740227
12. Rebbeck T.R., Mitra N., Wan F. Association of type and location of *BRCA1* and *BRCA2* mutations with risk of breast and ovarian cancer. *JAMA* 2015;313(13):1347–61. DOI: 10.1001/jama.2014.5985
13. Rebbeck T.R., Friebel T.M., Friedman E. et al. Mutational spectrum in a worldwide study of 29,700 families with *BRCA1* or *BRCA2* mutations. *Hum Mutat* 2018;39(5):593–620. DOI: 10.1002/humu.23406
14. Tung N., Lin N.U., Kidd J. et al. Frequency of germline mutations in 25 cancer susceptibility genes in a sequential series of patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2016;34(13):1460–8. DOI: 10.1200/JCO.2015.65.0747
15. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы. Практическая онкология 2010;11(4):258–66. Imyanitov E.N. Hereditary breast cancer. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology* 2010;11(4):258–66. (In Russ.).
16. Любченко Л.Н., Батенева Е.И., Абрамов И.С. и др. Наследственный рак молочной железы и яичников. Злокачественные опухоли 2013;2(6):53–60 Lyubchenko L.N., Bateneva E.I., Abramov I.S. et al. Hereditary breast and ovarian cancer. *Zlokachestvennyye opukholi = Malignant Tumors* 2013;2(6):53–60. (In Russ.).
17. Inagaki-Kawata Y., Yoshida K., Kawaguchi-Sakita N. et al. Genetic and clinical landscape of breast cancers with germline *BRCA1/2*

- variants. *Commun Biol* 2020;3(1):578. DOI: 10.1038/s42003-020-01301-9
18. Sokolenko A.P., Volkov N.M., Preobrazhenskaya E.V. et al. Evidence for a pathogenic role of *BRCA1* L1705P and W1837X germ-line mutations. *Mol Biol Rep* 2016;43(5):335–8. DOI: 10.1007/s11033-016-3968-0
 19. Бермишева М.А., Богданова Н.В., Гилязова И.Р. и др. Этнические особенности формирования генетической предрасположенности к развитию рака молочной железы. *Генетика* 2018; 54(2):233–42. DOI: 10.7868/S0016675818020042
Bermisheva M.A., Bogdanova N.V., Giljazova I.R. et al. Ethnic features of genetic susceptibility to breast cancer. *Genetica = Genetics* 2018;54(2):233–42. (In Russ.). DOI: 10.7868/S0016675818020042
 20. Бермишева М.А., Зиннатуллина Г.Ф., Гилязова И.Р. и др. Распространенность мутации с.5161C>Т гена *BRCA1* у пациентов с онкологическими заболеваниями из Республики Башкортостан. *Успехи молекулярной онкологии* 2021;8(4):84–93. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-84-93
Bermisheva M.A., Zinnatullina G.F., Giljazova I.R. et al. The prevalence of the c.5161C>T mutation of the *BRCA1* gene in patients with cancer from the Republic of Bashkortostan. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2021;8(4): 84–93. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-84-93
 21. GWAS Catalog. The NHGRI-EBI Catalog of human genome-wide association studies. Available at: <https://www.ebi.ac.uk/gwas/search?query=breast%20carcinoma>.
 22. Easton D.F., Pooley K.A., Dunning A.M. et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 2007;28;447(7148):1087–93. DOI: 10.1038/nature05887
 23. Turnbull C., Ahmed S., Morrison J. et al. Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci. *Nat Genet* 2010;42(6):504–7. DOI: 10.1038/ng.586
 24. Sehrawat B., Sridharan M., Ghosh S. et al. Potential novel candidate polymorphisms identified in genome-wide association study for breast cancer susceptibility. *Hum Genet* 2011;130(4):529–37. DOI: 10.1007/s00439-011-0973-1
 25. Long J., Cai Q., Sung H. et al. Genome-wide association study in east Asians identifies novel susceptibility loci for breast cancer. *PLoS Genet* 2012;8(2):e1002532. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002532
 26. Han M.R., Long J., Choi J.Y. et al. Genome-wide association study in East Asians identifies two novel breast cancer susceptibility loci. *Hum Mol Genet* 2016;25(15):3361–71. DOI: 10.1093/hmg/ddw164
 27. Cai Q., Zhang B., Sung H. et al. Genome-wide association analysis in East Asians identifies breast cancer susceptibility loci at 1q32.1, 5q14.3 and 15q26.1. *Nat Genet* 2014;46(8):886–90. DOI: 10.1038/ng.3041
 28. Michailidou K., Lindström S., Dennis J. et al. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. *Nature* 2017;551(7678):92–4. DOI: 10.1038/nature24284
 29. Sun T., Lian R., Liang X., Sun D. Association between *ESR1* XBAI and breast cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Clin Invest Med* 2022;45(1):E21–34. DOI: 10.25011/cim.v45i1.37842
 30. Zheng Q., Ye J., Wu H. et al. Association between mitogen-activated protein kinase kinase 1 polymorphisms and breast cancer susceptibility: a meta-analysis of 20 case-control studies. *PLoS One* 2014;9(3):e90771. DOI: 10.1371/journal.pone.0090771
 31. Chen J., Xiao Q., Li X. et al. The correlation of leukocyte-specific protein 1 (LSP1) rs3817198(T>C) polymorphism with breast cancer: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2022;101(45):e31548. DOI: 10.1097/MD.00000000000031548
 32. Shi J., Aronson K.J., Grundy A. et al. Polymorphisms of insulin-like growth factor 1 pathway genes and breast cancer risk. *Front Oncol* 2016;6:136. DOI: 10.3389/fonc.2016.00136
 33. Маливанова Т.Ф., Алферова Е.В., Осташкин А.С. и др. Общая выживаемость больных раком молочной железы зависит от сочетания полиморфизмов гена фактора некроза опухоли и HLA-гаплогрупп. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология* 2020;38(1):40–8.
 - Malivanova T.F., Alferova E.V., Ostashkin A.S. et al. The overall survival rate of breast cancer patients depends on a combination of polymorphisms of the tumor necrosis factor gene and HLA haplotypes. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology* 2020;38(1):40–8. (In Russ.).
 34. Li Z., Wang Y., Liu C. et al. Association between VEGF single nucleotide polymorphism and breast cancer in the Northern China Han population. *Breast Cancer Res Treat* 2021;186(1):149–56. DOI: 10.1007/s10549-020-06024-3
 35. Шевченко А.В., Коненков В.И., Гарбуков Е.Ю., Стахеева М.Н. Ассоциированность полиморфизма в промоторных участках генов металлопротеиназ (MMP2, MMP3, MMP9) с вариантами клинического течения рака молочной железы у женщин России. *Вопросы онкологии* 2014 60(5):630–5. Shevchenko A.V., Konenkov V.I., Garbukov E.Yu., Stakheeva M.N. The association of polymorphism in the promoter regions of metalloproteinase genes (MMP 2, MMP3, MMP 9) with variants of the clinical course of breast cancer in Russian women. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2014;60(5):630–5. (In Russ.).
 36. Zhang X., Jin G., Li J., Zhang L. Association between four MMP-9 polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis. *Med Sci Monit* 2015;21:1115–23. DOI: 10.12659/MSM.893890
 37. Pavlova N., Demin S., Churnosov M. et al. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms are associated with breast cancer in the caucasian women of Russia. *Int J Mol Sci* 2022;23(20): 12638. DOI: 10.3390/ijms232012638
 38. Pavlova N., Demin S., Churnosov M. et al. The modifying effect of obesity on the association of matrix metalloproteinase gene polymorphisms with breast cancer risk. *Biomedicines* 2022;10(10):2617. DOI: 10.3390/biomedicines10102617
 39. Павлова Н.В., Орлова В.С., Батлущкая И.В. и др. Роль высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2* в характере ассоциаций полиморфизма генов матричных металлопротеиназ с раком молочной железы. *Научные результаты биомедицинских исследований* 2022;8(2):180–97. Pavlova N.V., Orlova V.S., Batlutskaya I.V. et al. The role of highly penetrant mutations in *BRCA1* and *CHEK2* genes in the pattern of associations of matrix metalloproteinase gene polymorphisms with breast cancer. *Nauchnye rezultaty biomedicinskikh issledovaniy = Research Results in Biomedicine* 2022;8(2):180–97. (In Russ.). DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-4
 40. Purrington K.S., Slager S., Eccles D. et al. Genome-wide association study identifies 25 known breast cancer susceptibility loci as risk factors for triple-negative breast cancer. *Carcinogenesis* 2014;35(5): 1012–9. DOI: 10.1093/carcin/bgt404
 41. Huo D., Feng Y., Haddad S. et al. Genome-wide association studies in women of African ancestry identified 3q26.21 as a novel susceptibility locus for oestrogen receptor negative breast cancer. *Hum Mol Genet* 2016;25(21):4835–46. DOI: 10.1093/hmg/ddw305
 42. Cen Y.L., Qi M.L., Li H.G. et al. Associations of polymorphisms in the genes of *FGFR2*, *FGF1*, and *RBFOX2* with breast cancer risk by estrogen/progesterone receptor status. *Mol Carcinog* 2013;52 Suppl 1:E52–9. DOI: 10.1002/mc.21979
 43. Bartnykaitė A., Savukaitytė A., Bekampytė J. et al. The role of matrix metalloproteinase single-nucleotide polymorphisms in the clinicopathological properties of breast cancer. *Biomedicines* 2022;10(8):1891. DOI: 10.3390/biomedicines10081891
 44. Morra A., Escala-Garcia M., Beesley J. et al. Association of germline genetic variants with breast cancer-specific survival in patient subgroups defined by clinic-pathological variables related to tumor biology and type of systemic treatment. *Breast Cancer Res* 2021;23(1):86. DOI: 10.1186/s13058-021-01450-7
 45. Wang Y., Wu Z., Zhou L. et al. The impact of *EGFR* gene polymorphisms on the response and toxicity derived from neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Gland Surg* 2020;9(4):925–35. DOI: 10.21037/gS-20-330

Вклад авторов

Н.В. Павлова, И.В. Пономаренко: обзор публикаций по теме статьи, анализ данных;
С.С. Дёмин: написание текста статьи, обзор публикаций по теме статьи;
М.И. Чурносов: анализ данных.

Authors' contributions

N.V. Pavlova, I.V. Ponomarenko: review of publications on the topic of the article, data analysis;
S.S. Dyomin: article writing, review of publications on the topic of the article;
M.I. Churnosov: data analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.В. Павлова / N.P. Pavlova: <https://orcid.org/0000-0002-7754-5231>
С.С. Дёмин / S.S. Dyomin: <https://orcid.org/0000-0002-9956-4775>
М.И. Чурносов / M.I. Churnosov: <https://orcid.org/0000-0003-1254-6134>
И.В. Пономаренко / I.V. Ponomarenko: <https://orcid.org/0000-0002-5652-0166>

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.
Funding. The work was performed without external funding.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-63-73>

Современные подходы к суицидальной генотерапии злокачественных новообразований

Е.В. Дудкина, В.В. Ульянова, О.Н. Ильинская

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

Контакты: Вера Владимировна Ульянова ulyanova.vera@gmail.com

Одним из перспективных направлений противоопухолевой терапии является суицидальная генотерапия, основанная на внедрении в опухолевые клетки цитотоксических генов. Чаще всего это гены ферментов бактериального или вирусного происхождения, способные напрямую или опосредованно уничтожать клетки опухоли. В настоящем обзоре представлены сведения о современных стратегиях суицидальной генотерапии злокачественных новообразований, описаны их достоинства и недостатки, а также проанализированы свойства потенциального кандидата для создания на его основе новой высокоэффективной суицидальной системы, совмещающей в себе достоинства уже существующих подходов.

Ключевые слова: онкологическое заболевание, генотерапия, суицидальный ген, цитотоксичность, биназа

Для цитирования: Дудкина Е.В., Ульянова В.В., Ильинская О.Н. Современные подходы к суицидальной генотерапии злокачественных новообразований. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):63–73.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-63-73>

Modern approaches in suicidal gene therapy of malignant neoplasms

E.V. Dudkina, V.V. Ulyanova, O.N. Ilinskaya

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

Contacts: Vera Vladimirovna Ulyanova ulyanova.vera@gmail.com

One of the promising directions in antitumor therapy is suicidal gene therapy based on the introduction of cytotoxic genes into tumor cells. Most often, these genes encode for enzymes of bacterial or viral origin, capable of direct or indirect killing of tumor cells. This review provides information about modern strategies for suicidal cancer gene therapy, discusses their advantages and disadvantages, and analyzes the properties of a potential candidate for creating a new highly effective suicidal system, combining the advantages of existing approaches.

Keywords: cancer, gene therapy, suicidal gene, cytotoxicity, binase

For citation: Dudkina E.V., Ulyanova V.V., Ilinskaya O.N. Modern approaches in suicidal gene therapy of malignant neoplasms. *Uspekhii molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(2):63–73. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-63-73>

ВВЕДЕНИЕ

Изучение молекулярной природы канцерогенеза показало, что в основе малигнизации клеток лежат нарушения в их генетическом аппарате. В процессе жизнедеятельности под действием различных канцерогенов в клетках образуются и накапливаются мутации, приводящие к инициации и прогрессии опухолевого роста. В настоящее время разработан широкий спектр подходов к лечению онкологических заболеваний, основу которых составляют лучевая и химиотерапия, а также хирургическое удаление опухоли. Данные

стратегии направлены на элиминацию опухолевых клеток из организма и являются «золотым стандартом» противоопухолевой терапии, несмотря на высокую агрессивность их воздействия на организм пациента.

Современные методы лечения злокачественных новообразований (ЗНО) предполагают использование препаратов на основе моноклональных антител и низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназ. Данные лекарственные средства отличаются высокой эффективностью и действуют даже на поздних стадиях заболевания [1, 2]. Однако с течением времени эффективность

терапии снижается в связи с возникновением лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Кроме того, возникает ряд побочных эффектов, снижающих качество жизни пациентов. Таким образом, высокая токсичность, а также развитие метастазов и резистентности опухолей к терапии сильно ограничивают эффективность существующих методов лечения [3].

Для решения этих проблем в течение последних двух десятилетий разрабатывались новые подходы к противоопухолевой терапии. Генотерапия – одно из современных перспективных направлений в лечении онкологических заболеваний, направленных на борьбу с малигнизацией клеток на молекулярно-генетическом уровне. В основе данного метода лежит доставка терапевтических нуклеиновых кислот (ДНК, РНК, матричной РНК (мРНК), малой интерферирующей РНК (миРНК)), антисмысловых олигонуклеотидов и т. д.) в клетки-мишени с целью восстановления работы поврежденных генов, участвующих в инициации канцерогенеза. К основным стратегиям генотерапии злокачественных опухолей относят создание копии или замену поврежденного гена, доставку и увеличение экспрессии терапевтических генов, а также ингибирование экспрессии поврежденного/мутировавшего гена [4]. Так, различают онколитическую вирусную терапию, иммунотерапию, генотерапию на основе антисмысловых олигонуклеотидов, систем редактирования генома ZFN, TALENs и CRISPR/Cas, а также суицидальную генотерапию [5].

Суицидальная генотерапия является одной из наиболее обнадеживающих терапевтических стратегий при ЗНО. В ее основе лежит использование генов,

экспрессия которых в опухолевых клетках вызывает их гибель. Чаще всего в качестве суицидальных используют гены ферментов, метаболизирующих нетоксичное пролекарство в противоопухолевый агент, а также гены токсинов и проапоптотических белков [6].

Целью настоящего обзора стала систематизация данных о последних достижениях в области суицидальной генотерапии онкологических заболеваний.

СИСТЕМЫ ФЕРМЕНТ/ПРОЛЕКАРСТВО

Наиболее популярным направлением в суицидальной генотерапии ЗНО является подход, основанный на введении в опухолевые клетки генов ферментов, способных метаболизировать пролекарство в цитотоксический агент [7] (рис. 1). В качестве целевого гена для конверсии пролекарства изучены различные ферменты, преимущественно бактериального и вирусного происхождения, такие как тимидинкиназа, цитозиндезаминаза, оксидаза D-аминокислот, карбоксипептидаза, пуридиннуклеотидфосфорилаза, тимидинфосфорилаза, ксантин-гуанинфосфорилтрансфераза, нитроредуктаза, пенициллин-G-амидаза, фермент активации множественных лекарств, β-лактамаза, пероксидаза хрена, β-галактозидаза и дезоксирибонуклеотидкиназа. Использование бактериальных и вирусных ферментов позволяет добиться специфичности распознавания субстратов, а отсутствие их аналогов у человека – избежать перекрестной ферментативной реактивности при метаболизме субстратов в клетках человека. Однако основным недостатком данных систем является их значительная иммуногенность. При этом ферменты млекопитающих также могут быть

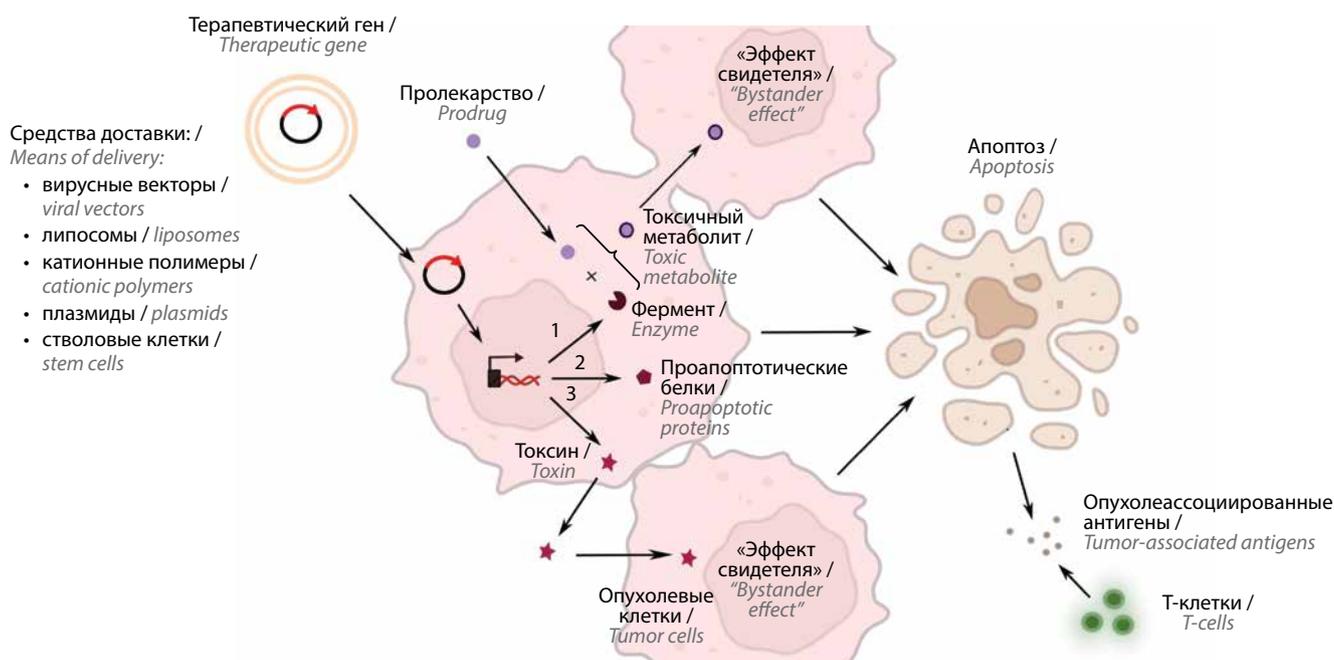


Рис. 1. Стратегии суицидальной генотерапии онкологических заболеваний. 1 – системы фермент/пролекарство; 2 – системы на основе проапоптотических генов; 3 – системы на основе токсинов

Fig. 1. Strategies of suicidal gene therapy of oncological diseases. 1 – enzyme/prodrug systems; 2 – systems based on proapoptotic genes; 3 – systems based on toxins

использованы в качестве целевых генов в случаях, когда уровни экспрессии этих ферментов в клетках-мишенях значительно ниже, чем в здоровых клетках. Так, пониженная экспрессия в опухолевых клетках наблюдается у генов, кодирующих ферменты β -глюкуронидазу, карбоксипептидазу А, цитохром Р450 и дезоксицитидинкиназу [8].

На сегодняшний день наиболее известной системой фермент/пролекарство является комбинация гена фермента тимидинкиназы вируса простого герпеса 1-го типа и пролекарства 9-(2-гидрокси-1-(гидроксиметил)этокси)метилгуанина – ганцикловира (HSVtk/GCV). Ген тимидинкиназы в составе генетической конструкции доставляют в клетки-мишени, которые затем обрабатывают пролекарством – ганцикловирином (GCV), который не может фосфорилироваться тимидинкиназой млекопитающих. Экспрессия вирусной тимидинкиназы приводит к фосфорилированию GCV в ганцикловириномонофосфат, который под действием клеточных тимидинкиназ метаболизируется до ганцикловиридифосфата и трифосфата. На уровне трифосфата GCV может конкурировать с эндогенным 2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфатом за включение в растущую цепь ДНК, что приводит к обрыву цепи, ингибированию синтеза ДНК и запуску апоптоза в опухолевых клетках [9].

Несмотря на многообещающие результаты, разрабатываются все новые подходы к модификации системы HSVtk/GCV с целью усиления цитотоксических свойств. Одним из таких подходов является использование системы совместной экспрессии. Так, например, ген моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1), экспрессируемый совместно с геном тимидинкиназы, продемонстрировал превосходный противоопухолевый эффект, обусловленный MCP-1-опосредованным рекрутированием макрофагов моноцитарного происхождения и приводящий к активации противоопухолевого иммунитета [10]. В России разработан генотерапевтический препарат антионкоРАН-М, представляющий собой плазмиду, несущую гены цитотоксичной тимидинкиназы и цитокина – гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора. Экспрессия гена тимидинкиназы способствует превращению пролекарства в противоопухолевый агент, а накопление цитокина гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора приводит к привлечению и активации клеток иммунной системы и запуску противоопухолевого иммунитета [11]. Комбинированная терапия тремя суицидальными генами (тимидинкиназа-р53-нитроредуктаза (ТК-р53-NTR)) и терапевтическими микроРНК miR-100, anti-miR-21 и anti-miR-10b) в присутствии пролекарств GCV и CB1954 показала эффективность *in vivo* в лечении метастазов в легких на моделях мышей после интраназального введения с использованием нетоксичных наночастиц золота [12].

Еще одним примером суицидальной генотерапии типа фермент/пролекарство является система на осно-

ве гена цитозиндезаминазы, превращающей 5-фторцитозин (5-FC) в цитотоксический 5-фторурацил (5-FU) (CD/5-FC). В качестве целевого гена используют фермент бактерий или дрожжей, экспрессия которого в клетках-мишенях приводит к конверсии пролекарства и обеспечивает прямое уничтожение опухолевых клеток за счет локальной продукции 5-FU [13].

Пролекарство 5-FC представляет собой пероральный противогрибковый препарат, одобренный Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA), относительно нетоксичный и способный эффективно преодолевать гематоэнцефалический барьер. Цитотоксический метаболит 5-FU является одним из наиболее часто используемых при лечении ЗНО желудочно-кишечного тракта, молочной железы, головы и шеи химиотерапевтических препаратов [14], однако он обладает рядом недостатков, обусловленных коротким периодом полураспада, отсутствием селективности в отношении опухолевых клеток и появлением у них лекарственной устойчивости [15].

После первичной конверсии клеточные ферменты метаболизируют 5-FU до цитотоксических антиметаболитов, ингибирующих синтез нуклеиновых кислот в клетке. Токсичный 5-FU через фторуридин преобразуется либо в рибонуклеотид 5-фторурацилтрифосфат, либо в 5-фтор-2-деоксиуридин-5-монофосфат. В то время как первый включается в РНК и препятствует ее процессингу, второй необратимо ингибирует тимидилатсинтазу и препятствует синтезу ДНК в клетке [16].

К преимуществам системы CD/5-FC относят ее радиосенсибилизирующую способность: накопление 5-FU повышает эффективность лучевой терапии [17]; при этом показано, что 5-FC и 5-FU способны проникать в большинство участков тела, включая стекловидное тело, спинномозговую и перитонеальную жидкость [18].

На основе системы CD/5-FC разработан генотерапевтический препарат ТОСА-511 [19]. Он показал высокую эффективность на ранних стадиях клинических исследований, однако результаты III фазы испытаний были отрицательными: медиана общей выживаемости после обработки ТОСА-511 составила 11,1 мес по сравнению с 12,2 мес при стандартном лечении [20]. Кроме того, в ряде клинических исследований сообщалось о негативном воздействии 5-FC на организм пациентов, включающем как незначительные побочные эффекты (тошнота, рвота и диарея), так и серьезные осложнения, (гепатотоксичность и апластическую анемию) [18]. Предполагают, что токсичность 5-FC связана с дополнительной продукцией 5-FU кишечной флорой [21].

С целью улучшения эффективности использования системы CD/5-FC в клинической практике в настоящее время проводят поиск новых и модификацию ранее разработанных систем. Так, получены мутантные формы бактериальных цитозиндезаминаз с улучшенными фармакокинетическими свойствами, включая высокое сродство и более низкую концентрацию

полуМаксимального ингибирования (IC_{50}) к 5-FC [22]. В результате скрининга метагеномных библиотек окружающей среды идентифицирована новая изоцитозиндезаминаза, специфически превращающая 5-фторизоцитозин (5-FIC) в 5-FU [23]. Предполагается, что кишечная флора не будет метаболизировать 5-FIC так активно, как в случае с 5-FC, что позволит снизить риск возникновения побочных эффектов. Обнаружена способность фермента урацилфосфорибозилтрансферазы конвертировать 5-FU сразу в фторуридинмонофосфат, что может повысить чувствительность пролекарства почти в 100 раз [24].

Механизм действия суицидальных систем фермент/пролекарство носит комплексный характер (см. таблицу). Во-первых, они напрямую уничтожают опухолевые клетки-мишени за счет конверсии пролекарства в цитотокси-

ческий метаболит, при этом гибель опухолевых клеток происходит по Bcl-2- контролируемому митохондриальному пути апоптоза [16]. Помимо антипролиферативной активности системы фермент/пролекарство способны подавлять миграцию опухолевых клеток. При этом GCV демонстрирует более заметный антимиграционный эффект по сравнению с 5-FC и менее выраженные побочные свойства [25]. Во-вторых, системы фермент/пролекарство способны опосредованно уничтожать опухолевые клетки, не экспрессирующие суицидальный ген, благодаря «эффекту свидетеля» [26]. Этот эффект обусловлен высвобождением растворимых форм токсичных метаболитов, их проникновением в соседние клетки через щелевые контакты или путем пассивного транспорта, стимуляцией местного микроокружения и эндоцитозом апоптотических везикул (см. рис. 1). Наиболее

Преимущества и ограничения современных подходов к суицидальной генотерапии злокачественных новообразований
Advantages and limitations of modern approaches in suicidal gene therapy of malignant neoplasms

Суицидальная система The suicidal system	Преимущества Advantages	Ограничения Limitations	Источник Source
Системы фермент/ пролекарство Enzyme/prodrug systems	Способность проникать в различные ткани, «эффект свидетеля», индукция противоопухолевого иммунитета, радиосенсибилизирующая способность The ability to penetrate into various tissues, the "bystander effect", induction of antitumor immunity, radiosensitizing ability	Необходимость использования пролекарств, зависимость от жизненного цикла, высокая иммуногенность, короткий период полураспада, возникновение лекарственной устойчивости, побочные эффекты The need to use prodrugs, dependence on the life cycle, high immunogenicity, short half-life, the emergence of drug resistance, side effects	[7–29]
Системы на основе токсинов Toxin-based systems	Независимость от клеточного цикла, «эффект свидетеля» Independence from the cell cycle, "the bystander effect"	Отсутствие избирательности, ограниченное проникновение и слабое распределение в солидных опухолях, возникновение лекарственной устойчивости, токсичность, иммуногенность Lack of selectivity, limited penetration and poor distribution in solid tumors, the emergence of drug resistance, toxicity, immunogenicity	[30–44]
Системы на основе проапоптотических генов Systems based on proapoptotic genes	Отсутствие иммуногенности, активность в гетерогенных тканях, независимость от жизненного цикла, немедленная индукция апоптоза Lack of immunogenicity, activity in heterogeneous tissues, independence from the life cycle, immediate induction of apoptosis	Отсутствие избирательности Lack of selectivity	[45–52]
Перспективная система на основе гена цитотоксического фермента биназы A promising system based on the gene of the cytotoxic enzyme binase	Мультитаргетность действия, отсутствие пролекарства, отсутствие лекарственной устойчивости, высокая избирательность действия, низкая иммуногенность, высокая проникающая способность, «эффект свидетеля» Multitargeting action, lack of prodrug, lack of drug resistance, high selectivity of action, low immunogenicity, high penetrating ability, "the bystander effect"	Возможность возникновения побочных эффектов The possibility of side effects	[65–76]

сильный «эффект свидетеля» демонстрирует система CD/5-FU за счет эффективной диффузии 5-FU через клеточные мембраны опухолевых клеток [27]. Токсичный метаболит GCV заряжен отрицательно и поэтому не может легко проходить через клеточные мембраны, но способен диффундировать в соседние клетки посредством щелевых контактов [28].

Помимо диффузии противоопухолевого агента «эффект свидетеля» индуцирует противоопухолевый иммунитет, привлекая цитотоксические Т-клетки в зону опухолевого роста (см. рис. 1). Погибающие под действием цитотоксического агента опухолевые клетки выделяют в среду некротические материалы и опухолевые антигены, что вызывает активацию иммунной системы пациента и в некоторых случаях приводит к уничтожению даже отдаленных метастазов [13]. У пациентов, получавших генную терапию, выявлено достоверное повышение уровня интерлейкина-12 и интерферона γ по сравнению с контрольной группой, что связано с активацией иммунной системы в ответ на опухолевые антигены, высвобождаемые в кровь после некроза опухолевых клеток [29].

СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ТОКСИНОВ

Гены токсинов представляют собой перспективные инструменты суицидальной генотерапии (см. таблицу). Продукты этих генов способны необратимо вмешиваться в процессы биосинтеза белка или нарушать целостность цитоплазматической мембраны, что приводит к непосредственной гибели клеток без необходимости добавления пролекарств (см. рис. 1). Они могут действовать независимо от клеточного цикла, в отличие от цитотоксичных агентов, нацеленных на синтез ДНК, и тем самым способны уничтожать как покоящиеся (опухолевые стволовые клетки), так и быстро делящиеся опухолевые клетки. В качестве суицидальных генов используют гены, кодирующие растительные рибосом-инактивирующие белки (РИБ) (рицин, сапонин, диантин и др.) [30], а также домены бактериальных токсинов (экзотоксин А псевдомонад, дифтерийный токсин, стрептолизин О и др.) [8].

Энтеротоксин *Clostridium perfringens* и стрептолизин О *Streptococcus pyrogenes* обладают селективной цитотоксичностью, обусловленной взаимодействием с трансмембранными белками клаудином-3 и клаудином-4, экспрессия которых сильно повышена при онкологических заболеваниях человека, включая рак молочной, поджелудочной, предстательной желез, яичников и толстой кишки [31]. Модификация энтеротоксинов позволяет расширить спектр чувствительных к ним опухолей за счет приобретения способности связываться с клаудинами других типов, сверхэкспрессированных при раке щитовидной железы и немелкоклеточном раке легкого [32]. Связывание токсинов с клаудинами запускает образование пор в мембране, что приводит к быстрому и эффективному уничтожению опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* [31, 33].

Высокая концентрация токсина способствует массовому образованию пор, что вызывает некротическую гибель клеток, в то время как низкая концентрация токсина — к апоптозу. Противоопухолевое действие токсинов усиливается за счет «эффекта свидетеля», опосредованного их высвобождением из трансфицированных клеток в составе экзосом с последующим проникновением в близлежащие клетки [33].

Рибосом-инактивирующие белки способны удалять специфический аденин из петли GAGA в 23S/25/28S рибосомных РНК (рРНК), необратимо блокируя процессы трансляции, а также вызывать фрагментацию ДНК [34]. Рицин из *Ricinus communis* и сапорин из *Saponaria officinalis* показали высокую эффективность против опухолевых клеток в исследованиях *in vitro* и *in vivo* [35, 36]. Рицин, как и другие РИБ 1-го типа, благодаря наличию дополнительной цепи, обладающей свойствами лектина, способен лучше проникать в клетки и является более цитотоксичным, чем сапонин и другие РИБ 2-го типа.

Бактериальные токсины, такие как экзотоксин А псевдомонад и дифтерийный токсин, катализируют перенос от НАД⁺-АДФ-рибозы к фактору элонгации EF2, вызывая необратимую остановку синтеза белка вследствие ингибирования связывания EF2 с рибосомой [8]. Генотерапевтические конструкции на основе активных доменов, полученных из токсинов *Corynebacterium diphtheriae* или *Pseudomonas aeruginosa*, эффективно элиминируют опухолевые клетки из организма, значительно снижая размер опухоли. Однако их использование и широкое внедрение в клиническую медицину ограничены в связи с отсутствием избирательности действия данных белков. Для повышения специфичности и снижения риска побочных эффектов фрагменты токсинов сшивают со специфическими молекулами, например антителами против опухолеспецифичных антигенов, создавая иммунотоксины [37], несмотря на вероятность снижения их противоопухолевой активности. Еще одним подходом является контроль экспрессии аттенуированных форм токсинов с помощью опухолеспецифичных промоторов [38].

К данному моменту FDA одобрены 3 генотерапевтических препарата на основе доменов бактериальных токсинов. Первый препарат — денилейкин дифтитокс, или ONTAK, — в настоящее время отозванный с рынка, представляет собой рекомбинантный интерлейкин-2 человека, слитый с фрагментами дифтерийного токсина А и В. Он предназначался для лечения гематологических ЗНО, несущих CD25-высокоаффинную α -субъединицу рецептора интерлейкина-2 [39]. Второе лекарственное средство — таграксосуф (IL3-DT) — генотерапевтический препарат того же типа, созданный на основе рекомбинантного интерлейкина-3 человека, сшитого с фрагментом дифтерийного токсина, для лечения гематологических CD123⁺ опухолей [40]. Третий препарат — моксетумомаб пасудотокс — содержит Fv-фрагмент рекомбинантного мышиноного моно-

клонального антитела против CD22, сшитого с фрагментом PE38 экзотоксина А синегнойной палочки (анти-CD22-ETA) и предназначен для лечения взрослых с рецидивирующим или рефрактерным волосатоклеточным лейкозом [41].

Иммунотоксины из-за своих размеров характеризуются ограниченным проникновением и слабым распределением в солидных опухолях (см. таблицу). Опухолевые клетки способны вырабатывать резистентность к иммунотоксинам за счет снижения презентации антигена на клеточной поверхности, нарушения процессинга токсина или его расщепления в лизосоме [42, 43]. Некоторые иммунотоксины могут связывать нормальные клетки и повреждать эндотелий сосудов. Для преодоления этих недостатков предложен способ внутриклеточного синтеза каталитически активного домена III экзотоксина А синегнойной палочки с модифицированной мРНК, упакованной в липидные наночастицы [44]. Такой подход показал свою эффективность как *in vitro*, так и *in vivo* на мышинной модели меланомы B16. Терапия не только подавляла рост опухоли, но и повышала показатели общей выживаемости мышей.

СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПРОАПОПТОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ

Использование в качестве целевых генов в суицидальной генотерапии ферментов, филогенетически отдаленных от млекопитающих, несмотря на положительные результаты исследований, всегда ограничено риском возникновения иммунных реакций при введении их в организм пациента. В связи с этим в настоящее время разработаны системы на основе проапоптотических генов человека, экспрессия которых приводит к немедленному запуску апоптоза в клетках-мишенях и их гибели (см. рис. 1).

Наиболее известными генами-убийцами, используемыми в данной стратегии, являются гены, кодирующие ферменты семейства каспаз [45, 46] и члены семейства Bcl-2, такие как BimS, Вах и редуцированный Bid [47, 48]. Транслокация tBid, образованного путем расщепления проапоптотического белка Bid, в митохондрии приводит к высвобождению цитохрома С и активации каспаз, индуцирующих апоптоз в различных клеточных линиях [47].

Для создания суицидальной конструкции на основе генов каспаз цитотоксичный синтетический аналог каспазы 9 (iCasp9) сшивают с модифицированным человеческим FK506-связывающим белком, обеспечивающим димеризацию каспазы в клетках, обработанных синтетическим препаратом AP20187. Димеризация вызывает активацию каспазы 3 и других компонентов внутреннего апоптотического пути, что приводит к эффективному уничтожению опухолевых клеток, экспрессирующих трансген, независимо от их пролиферативного статуса и гетерогенного микроокружения [49]. При этом iCasp9 одинаково эффективно действует в условиях как монослоя, так и трехмерного культивирования

клеток, в отличие от эндокринной терапии, опосредованной тамоксифеном, которая в 3D-культуре продемонстрировала более низкую эффективность по сравнению с 2D-культурой [50]. В системе *in vivo* iCasp9 приводила к уменьшению объема опухоли молочной железы у мышей [46].

Несмотря на это, экспрессия каспазы требует жесткого контроля в связи с отсутствием селективности ее апоптотического действия [51, 52]. Однако для полного удаления опухоли монотерапии iCasp9 недостаточно, требуется дальнейшее ее усиление с помощью химиотерапевтических или иммунотерапевтических препаратов [46]. Так, было показано, что сочетание iCasp9 с бортезомибом – ингибитором деградации каспаз, благодаря синергизму обладало более эффективным и длительным цитотоксическим действием, чем только iC9 [50].

Основным преимуществом суицидальных систем на основе проапоптотических белков человека является отсутствие у них иммуногенности (см. таблицу). Кроме того, они активны в гетерогенных тканях и функционируют независимо от жизненного цикла клетки. Экспрессия генов проапоптотических белков приводит к немедленному запуску апоптоза в клетках-мишенях и их гибели в течение нескольких минут после введения препарата, тогда как другие известные методы суицидальной генотерапии требуют длительного применения и удаляют меньшую часть клеток, содержащих генотерапевтическую конструкцию. На животных моделях терапевтический эффект проапоптотических генов замечен уже через 1 нед, в то время как эффект системы фермент/пролекарство проявлялся лишь через 30 дней [46].

ОГРАНИЧЕНИЯ СУИЦИДАЛЬНОЙ ГЕНОТЕРАПИИ

Основным недостатком суицидальной генотерапии онкологических заболеваний, ограничивающим их широкое применение в клинической практике, является низкая селективность, обусловленная неэффективной целевой доставкой, неконтролируемой экспрессией цитотоксичного трансгена и «эффектом свидетеля», обеспечивающим свободную диффузию токсичных метаболитов внутри разнородной клеточной популяции.

Одной из ключевых стратегий, разработанных для решения этих проблем, является использование опухолеспецифичных промоторов, способных запускать экспрессию трансгена только в опухолевых клетках [53]. Такой подход позволяет избежать токсичной экспрессии суицидных генов в нормальных клетках организма при попадании в них генотерапевтической конструкции, а также минимизировать риск возникновения побочных эффектов, вызванных системной токсичностью противоопухолевых препаратов. Для усиления селективности суицидальной системы были изучены промоторы миогенина человека, рецептора фактора роста эндотелия сосудов, сурвивина и др. [53]. Селективный противо-

опухолевый эффект системы HSVtk/GCV достигнут с использованием промотора hTERT как в чувствительных к цисплатину, так и в устойчивых к нему клетках [54]. Прямое введение гена бактериального токсина А синегнойной палочки под контролем химерного модифицированного энхансера/промотора гена простатического специфического антигена человека в простату мышей приводило к резкому уменьшению размера железы [55].

Безопасная и эффективная доставка генов является фундаментальной основой для проведения успешной генотерапии. Идеальная система доставки терапевтического гена должна иметь большую емкость, высокую эффективность трансфекции, обеспечивать устойчивую экспрессию трансгена и его таргетную доставку, а также быть легкодоступной и безопасной для организма [56].

Доставку трансгена в опухолевые клетки проводят как вирусным, так и невирусным способами. Благодаря более высокой эффективности трансдукции и долговременной экспрессии генов вирусные векторы являются более предпочтительными [57]. При этом процент клеток, экспрессирующих трансген, составляет около 10 % [58]. Несмотря на это, трансдукция опухолей *in vivo* приводит к значительной задержке роста опухоли у животных с ее полной регрессией в некоторых случаях, обусловленной впечатляющим действием «эффекта свидетеля» в системе *in vivo* [59]. К недостаткам вирусных систем относят риск инсерционного мутагенеза в случае интеграции вирусов в геном клетки-мишени и развития иммунного ответа. Кроме того, вирусные векторы характеризуются ограниченной нагрузочной способностью и сложностью получения в промышленных масштабах [60].

Синтетические наноносители, полученные из липидных и/или полимерных соединений, были разработаны в качестве альтернативы для обхода недостатков вирусных векторов. Среди них в суицидальной генотерапии наиболее востребованными оказались полиэтиленимин и его производные. К основным преимуществам катионных полимеров по сравнению с вирусными векторами относят более низкие затраты и простоту производства, более высокую универсальность, меньшую иммуногенность/отсутствие системной токсичности, способность конденсировать ДНК более крупного размера, а также возможность вставки пептидов/аптамеров или определенных доменов для таргетной доставки трансгена в клетки-мишени. Показано, что у ксенотрансплантированных мышей, которым с помощью полиэтиленимина вводили рекомбинантную плазмиду, кодирующую ген тимидинкиназы, значительно уменьшался объем опухоли *in vivo*, вплоть до 80 % [61].

Однако при использовании невирусных носителей важно учитывать нестабильность полиплексов в крови и других биологических жидкостях, а также их более низкие специфичность и эффективность доставки трансгена по сравнению с вирусными векторами.

В настоящее время одним из наиболее многообещающих способов доставки нуклеиновых кислот в клетки является использование стволовых клеток. Показано, что некоторые их типы обладают тропностью к опухолевым клеткам [26]. Опухолево-трофическую миграцию стволовых клеток связывают с воспалительными и ангиогенными факторами, секретируемыми астроцитами и микроглиальными клетками опухоли, а также фактором 1 стромальных клеток, хемокиновым лигандом CXCL12, рецептором фактора роста эндотелия сосудов, фактором роста гепатоцитов, фактором 1 α , индуцируемым гипоксией, и активатором плазминогена урокиназного типа [61]. Результаты ряда исследований продемонстрировали способность мезенхимальных стволовых клеток доставлять гены к различным моделям опухолей, таким как глиобластома, мелко-клеточный рак легкого и рак молочной железы [62]. В ходе проведенного впервые с участием пациентов с рецидивирующей мультиформной глиобластомой клинического исследования I фазы выявлено, что суицидальная генная терапия с использованием аллогенных мезенхимальных стволовых клеток в качестве носителей гена тимидинкиназы вируса простого герпеса безопасна [63]. Кроме того, показано, что стволовые клетки секретируют цитотоксические метаболиты, способные элиминировать опухолевые клетки [64]. Однако иммуносупрессивное действие мезенхимальных стволовых клеток может приводить к злокачественной трансформации, росту опухоли и усилению метастазирования, что указывает на необходимость проведения дополнительных исследований их безопасности и эффективности.

Несмотря на вышеизложенные пути преодоления существующих недостатков суицидальной генотерапии, использование контролируемой системы экспрессии, как и таргетная доставка токсичных генов, не решает проблему неспецифической токсичности суицидальных систем, обусловленной механизмом «эффекта свидетеля». В связи с этим поиск и разработка новых суицидальных генов представляют особый интерес для развития современных подходов к противоопухолевой терапии.

БИНАЗА КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ АГЕНТ СУИЦИДАЛЬНОЙ ГЕНОТЕРАПИИ

Среди генов цитотоксических белков, способных уничтожать опухолевые клетки, особое внимание заслуживают ферменты рибонуклеазы (РНКазы), осуществляющие гидролиз и процессинг РНК. Известен широкий спектр РНКаз, обладающих избирательным апоптоз-индуцирующим действием в отношении опухолевых клеток различного происхождения [65].

Среди них одним из наиболее перспективных противоопухолевых агентов является микробная РНКаза *Bacillus pumilus* 7P – биназа [66]. Изучение физико-химических и структурно-функциональных свойств этого белка указывает на возможность создания

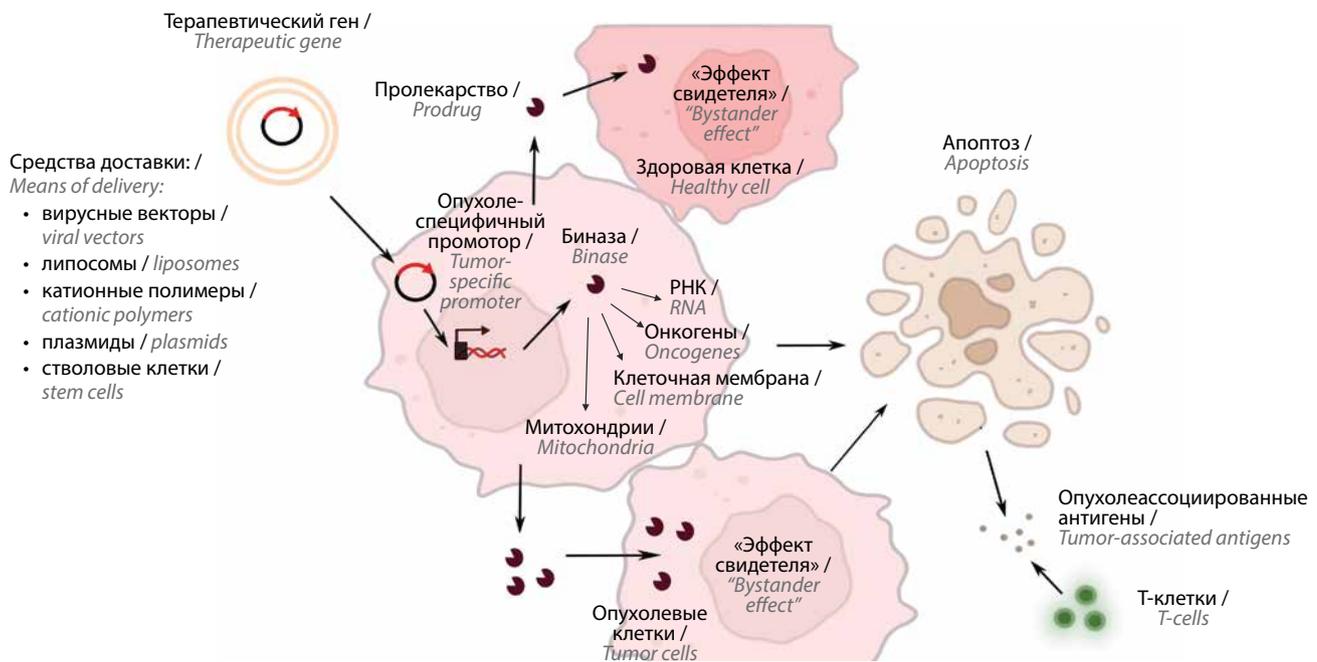


Рис. 2. Стратегия суицидальной генотерапии онкологических заболеваний на основе перспективного гена-кандидата цитотоксичной биназы
 Fig. 2. Strategy of suicidal gene therapy of oncological diseases based on a promising candidate gene of cytotoxic binase

генотерапевтической суицидальной конструкции на его основе (рис. 2). Противоопухолевая активность биназы доказана в отношении клеток аденокарциномы легкого, рака яичников, шейки матки, молочной железы, хронической миелогенной лейкемии и других малигнизированных клеток, экспрессирующих онкогены *RAS*, *KIT*, *AML1-ETO*, *FLT3*, *E6* и *E7*, но не *fms* и *src* [67–69]. Продемонстрирована способность биназы снижать рост первичной опухоли и метастазов у животных с индуцированными опухолями карциномы легкого Льюиса, лимфосаркомы RLS40 и меланомы B-16 [70].

Главным преимуществом биназы как потенциального противоопухолевого агента является мультитаргетность ее действия (см. таблицу). Цитотоксический потенциал биназы не связан с какой-то одной молекулярной мишенью, а включает в себя ряд возможных событий, тем или иным образом приводящих к запуску апоптоза в опухолевых клетках. Такая особенность исключает возникновение лекарственной устойчивости опухолевых клеток и делает этот белок уникальным противоопухолевым агентом. По своей природе фермент представляет собой сильный поликатион, способный избирательно взаимодействовать и проникать в опухолевые клетки. Взаимодействие биназы с клеточными белками приводит к модуляции сигнальных путей в клетке и интернализации фермента. Так, было показано, что биназа взаимодействует с онкогенами *EGFR* и *RAS*, что приводит к ингибированию сигнального каскада MAPK и запуску апоптоза в трансформированных клетках [69, 71]. Внутри клеток биназа гидролизует одно- и двухцепочечную РНК

с образованием сигнальных микроРНК, участвующих в активации экспрессии проапоптотических генов [72]. Она индуцирует как митохондриальный, так и лиганд-зависимый пути апоптоза [70]. Вклад в индукцию апоптоза РНКазами также может вносить образующийся после каталитического расщепления РНК интермедиат 2',3'-цГМФ (цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат) [73]. Показано, что проникновение в митохондрии интермедиата 2',3'-цАМФ вызывало увеличение проницаемости мембраны и ее разрушение [74]. Так, образование пор в митохондриях приводило к развитию апоптоза в клетках лейкоза Касуми-1, обработанных биназой [68]. При этом особо стоит отметить, что она проникает не только в опухолевые клетки, но и в нормальные, не оказывая при этом на них значимого токсического влияния [75].

Еще одним преимуществом биназы является ее низкая иммуногенность; она не индуцирует поликлональный Т-клеточный ответ [76]. Этот фермент нечувствителен к блокирующему действию цитозольного ингибитора РНКаз млекопитающих [66]. Кроме того, показано, что биназа запускает регенеративные процессы в печени мышей с карциномой легкого Льюиса и не оказывает общетоксического действия на организм здоровых мышей [70].

Принимая во внимание особенности противоопухолевого действия биназы, можно утверждать, что создание на ее основе генотерапевтической конструкции позволит селективно уничтожать опухолевые клетки за счет не только внутриклеточной экспрессии гена цитотоксичной биназы, но и «эффекта свидетеля», обусловленного легкостью проникновения катионной

биназы в клетки. При этом данный фермент не будет вызывать побочных эффектов, связанных с его возможным попаданием в нормальные клетки, и индуцировать иммунный ответ, что снизит риск возникновения нежелательных реакций терапии до минимума.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени достигнуты многообещающие результаты в области суицидальной генотерапии ЗНО, которые уже сегодня могут быть использованы в клинической практике. Ключевыми направлениями

дальнейшего развития такого метода лечения являются поиск и модификация цитотоксичных генов, а также разработка систем доставки и обеспечения их селективной экспрессии в опухолевых клетках. Одним из перспективных кандидатов для создания новой суицидальной генетической конструкции может стать ген бактериального фермента – рибонуклеазы биназы, обладающей селективной противоопухолевой активностью, в основе которой лежит многоуровневый механизм цитотоксического действия, не требующий внесения пролекарств и приводящий в конечном счете к апоптозу.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Pottier C., Fresnais M., Gilon M. et al. Tyrosine kinase inhibitors in cancer: breakthrough and challenges of targeted therapy. *Cancers (Basel)* 2020;12(3):731. DOI: 10.3390/cancers12030731
- Zinn S., Vazquez-Lombardi R., Zimmermann C. et al. Advances in antibody-based therapy in oncology. *Nat Cancer* 2023;4(2):165–80. DOI: 10.1038/s43018-023-00516-z
- Weiss F., Lauffenburger D., Friedl P. Towards targeting of shared mechanisms of cancer metastasis and therapy resistance. *Nat Rev Cancer* 2022;22(3):157–73. DOI:10.1038/s41568-021-00427-0
- Sun W., Shi Q., Zhang H. et al. Advances in the techniques and methodologies of cancer gene therapy. *Discov Med* 2019;27(146):45–55.
- Cesur-Ergün B., Demir-Dora D. Gene therapy in cancer. *J Gene Med* 2023;25(11):e3550. DOI: 10.1002/jgm.3550
- Navarro S.A., Carrillo E., Griñán-Lison C. et al. Cancer suicide gene therapy: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2016;26:1095–104. DOI: 10.1080/13543776.2016.1211640
- Sheikh S., Ernst D., Keating A. Prodrugs and prodrug-activated systems in gene therapy. *Mol Ther* 2021;29(5):1716–28. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.04.006
- Ardini M., Vago R., Fabbrini M.S., Ippoliti R. From immunotoxins to suicide toxin delivery approaches: is there a clinical opportunity? *Toxins (Basel)* 2022;14(9):579. DOI: 10.3390/toxins14090579
- Tamura R., Miyoshi H., Yoshida K. et al. Recent progress in the research of suicide gene therapy for malignant glioma. *Neurosurg Rev* 2021;44(1):29–49. DOI: 10.1007/s10143-019-01203-3
- Hong S., Zhang P., Zhang H. et al. Enforced effect of tk-MCP-1 fusion gene in ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2012;31(1):74. DOI: 10.1186/1756-9966-31-74
- Alekseenko I.V., Snezhkov E.V., Chernov I.P. et al. Therapeutic properties of a vector carrying the HSV thymidine kinase and GM-CSF genes and delivered as a complex with a cationic copolymer. *J Transl Med* 2015;13:78. DOI: 10.1186/s12967-015-0433-0
- Liu Y., Sukumar U.K., Jugniot N. et al. Inhaled gold nano-star carriers for targeted delivery of triple suicide gene therapy and therapeutic microRNAs to lung metastases: development and validation in a small animal model. *Adv Ther (Weinh)* 2022;5(8):2200018. DOI: 10.1002/adtp.202200018
- Ding Y., Fan J., Deng L. et al. Antitumor efficacy of cytosine deaminase-armed vaccinia virus plus 5-fluorocytosine in colorectal cancers. *Cancer Cell Int* 2020;20:243. DOI: 10.1186/s12935-020-01340-6
- Emamian M., Abbaspour A., Shahani T et al. Non-viral suicide gene therapy: cytosine deaminase gene directed by VEGF promoter and 5-fluorocytosine as a gene directed enzyme/prodrug system in breast cancer model. *Drug Res (Stuttg)* 2021;71(7):395–406. DOI: 10.1055/a-1488-6054
- Takahashi M., Valdes G., Hiraoka K. et al. Radiosensitization of gliomas by intracellular generation of 5-fluorouracil potentiates prodrug activator gene therapy with a retroviral replicating vector. *Cancer Gene Ther* 2014;21(10):405–10. DOI: 10.1038/cgt.2014.38
- El-Sayed A.S.A., Mohamed N.Z., Yassin M.A. et al. Microbial cytosine deaminase is a programmable anticancer prodrug mediating enzyme: antibody, and gene directed enzyme prodrug therapy. *Heliyon* 2022;8(9):e10660. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e10660
- Ostertag D., Amundson K.K., Lopez Espinoza F. et al. Brain tumor eradication and prolonged survival from intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil using a nonlytic retroviral replicating vector. *Neuro Oncol* 2012;14(2):145–59. DOI: 10.1093/neuonc/nor199
- Vermes A., Guchelaar H.J., Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* 2000;46(2):171–9. DOI: 10.1093/jac/46.2.171
- Mitchell L.A., Lopez Espinoza F., Mendoza D. et al. Toca 511 gene transfer and treatment with the prodrug, 5-fluorocytosine, promotes durable antitumor immunity in a mouse glioma model. *Neuro Oncol* 2017;19(7):930–9. DOI: 10.1093/neuonc/nox037
- Cloughesy T.F., Petrecca K., Walbert T. et al. Effect of vocimagene amiretrorepvec in combination with flucytosine vs standard of care on survival following tumor resection in patients with recurrent high-grade glioma: a randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2020;6(12):1939–46. DOI: 10.1001/jamaoncol.2020.3161
- Kazlauskas A., Darinskas A., Meškys R. et al. Isocytosine deaminase Vcz as a novel tool for the prodrug cancer therapy. *BMC Cancer* 2019;19(1):197. DOI: 10.1186/s12885-019-5409-7
- Vosough P., Vafadar A., Naderi S. et al. Escherichia coli cytosine deaminase: structural and biotechnological aspects. *Biotechnol Appl Biochem* 2024;71(1):5–16. DOI: 10.1002/bab.2516
- Aučynaitė A., Rutkienė R., Tauraitė D. et al. Discovery of bacterial deaminases that convert 5-fluoroisocytosine into 5-fluorouracil. *Front Microbiol* 2018;9:2375. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02375
- Ho Y.K., Woo J.Y., Tu G.X.E. et al. A highly efficient non-viral process for programming mesenchymal stem cells for gene directed enzyme prodrug cancer therapy. *Sci Rep* 2020;10(1):14257. DOI: 10.1038/s41598-020-71224-2
- Xu N., Tian H., Po Fung C. et al. Inhibition of human oral squamous cell carcinoma proliferation and migration by prodrug-activating suicide gene therapies. *Exp Ther Med* 2023;25(2):92. DOI: 10.3892/etm.2023.11790
- Horikawa M., Koizumi S., Oishi T. et al. Potent bystander effect and tumor tropism in suicide gene therapy using stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Cancer Gene Ther* 2023;30(1):85–95. DOI: 10.1038/s41417-022-00527-5
- Tanaka T., Duflot-Dancer A., Tiraby M. et al. Bystander effect from cytosine deaminase and uracil phosphoribosyl transferase genes *in vitro*: a partial contribution of gap junctions. *Cancer Lett* 2009;282(1):43–7. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.02.050

28. Oishi T., Ito M., Koizumi S. et al. Efficacy of HSV-TK/GCV system suicide gene therapy using SHED expressing modified HSV-TK against lung cancer brain metastases. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2022;26:253–65. DOI: 10.1016/j.omtm.2022.07.001
29. Rainov N.G. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther* 2000;11(17):2389–401. DOI: 10.1089/104303400750038499
30. Fabbrini M.S., Katayama M., Nakase I., Vago R. Plant ribosome-inactivating proteins: progresses, challenges and biotechnological applications (and a few digressions). *Toxins (Basel)* 2017;9(10):314. DOI: 10.3390/toxins9100314
31. Pahle J., Menzel L., Niesler N. et al. Rapid eradication of colon carcinoma by *Clostridium perfringens* enterotoxin suicidal gene therapy. *BMC Cancer* 2017;17(1):129. DOI: 10.1186/s12885-017-3123-x
32. Piontek A., Eichner M., Zwanziger D. et al. Targeting claudin-overexpressing thyroid and lung cancer by modified *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Mol Oncol* 2020;14(2):261–76. DOI: 10.1002/1878-0261.12615
33. Pahle J., Kobelt D., Aumann J. et al. Effective oncolytic treatment of pancreatic cancer by claudin-targeted suicide gene therapy with *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE). *Cancers (Basel)* 2021;13(17):4393. DOI: 10.3390/cancers13174393
34. Bagga S., Seth D., Batra J.K. The cytotoxic activity of ribosome-inactivating protein saporin-6 is attributed to its rRNA N-glycosidase and internucleosomal DNA fragmentation activities. *J Biol Chem* 2003;278(7):4813–20. DOI: 10.1074/jbc.M207389200
35. Sama S., Woith E., Walther W. et al. Targeted suicide gene transfections reveal promising results in nu/nu mice with aggressive neuroblastoma. *J Control Release* 2018;275:208–16. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.02.031
36. Herawati I.E., Lesmana R., Levita J., Subarnas A. Cytotoxicity, apoptosis, migration inhibition, and autophagy-induced by crude ricin from *ricinus communis* seeds in a549 lung cancer cell lines. *Med Sci Monit Basic Res* 2022;28:e936683. DOI: 10.12659/MSMBR.936683
37. Morgan R.N., Saleh S.E., Farrag H.A., Aboshanab K.M. New insights on *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-based immunotoxins in targeted cancer therapeutic delivery. *Ther Deliv* 2023;14(1):31–60. DOI: 10.4155/tde-2022-0055
38. Dai L., Yu X., Huang S. et al. The therapeutic potential of attenuated diphtheria toxin delivered by an adenovirus vector with survivin promoter on human lung cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2021;22(1):79–87. DOI: 10.1080/15384047.2020.1859870
39. Zinser E., Rössner S., Littmann L. et al. The IL-2 diphtheria toxin fusion protein denileukin diftotox modulates the onset of diabetes in female nonobese diabetic animals in a time-dependent manner and breaks tolerance in male nonobese diabetic animals. *J Immunol* 2012;189(3):1173–81. DOI: 10.4049/jimmunol.1102691
40. Pemmaraju N., Konopleva M. Approval of tagraxofusp-erzs for blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Blood Adv* 2020;4(16):4020–7. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019000173
41. Dhillon S. Moxetumomab pasudotox: first global approval. *Drugs* 2018;78(16):1763–7. DOI: 10.1007/s40265-018-1000-9
42. Dieffenbach M., Pastan I. Mechanisms of resistance to immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin a in cancer therapy. *Biomolecules* 2020;10(7):979. DOI: 10.3390/biom10070979
43. Cerise A., Bera T.K., Liu X. et al. Anti-mesothelin recombinant immunotoxin therapy for colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2019;18(3):192–9. DOI: 10.1016/j.clcc.2019.06.006
44. Granot-Matok Y., Ezra A., Ramishetti S. et al. Lipid nanoparticles-loaded with toxin mRNA represents a new strategy for the treatment of solid tumors. *Theranostics* 2023;13(11):3497–508. DOI: 10.7150/thno.82228
45. Nakashima I., Saito S., Akahoshi E. et al. Non-viral inducible caspase 9 mRNA delivery using lipid nanoparticles against breast cancer: an *in vitro* study. *Biochem Biophys Res Commun* 2022;635:144–53. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.09.105
46. Pathak S., Singh V., Kumar N., Jayandharan G.R. Inducible caspase 9-mediated suicide gene therapy using AAV6 vectors in a murine model of breast cancer. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2023;31:101166. DOI: 10.1016/j.omtm.2023.101166
47. Long Q., Yang R., Lu W. et al. Adenovirus-mediated truncated Bid overexpression induced by the Cre/LoxP system promotes the cell apoptosis of CD133+ ovarian cancer stem cells. *Oncol Rep* 2017;37(1):155–62. DOI: 10.3892/or.2016.5263
48. Garg H., Salcedo R., Trinchieri G., Blumenthal R. Improved nonviral cancer suicide gene therapy using survivin promoter-driven mutant Bax. *Cancer Gene Ther* 2010;17(3):155–63. DOI: 10.1038/cgt.2009.63
49. Rossignoli F., Grisendi G., Spano C. et al. Inducible Caspase9-mediated suicide gene for MSC-based cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2019;26(1–2):11–6. DOI: 10.1038/s41417-018-0034-1
50. Moradi-Mehr S., Khademy M., Akbari-Birgani S. et al. Comparative evaluation of the therapeutic strategies using a minimal model of luminal-A breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2023;666:107–14. DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.05.028
51. Shariat S.F., Desai S., Song W. et al. Adenovirus-mediated transfer of inducible caspases: a novel “death switch” gene therapeutic approach to prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61(6):2562–71.
52. Kemper K., Rodermond H., Colak S. et al. Targeting colorectal cancer stem cells with inducible caspase-9. *Apoptosis* 2012;17(5):528–37. DOI: 10.1007/s10495-011-0692-z
53. Montaña-Samaniego M., Bravo-Estupiñan D.M., Méndez-Guerrero O. et al. Strategies for targeting gene therapy in cancer cells with tumor-specific promoters. *Front Oncol* 2020;10:605380. DOI: 10.3389/fonc.2020.605380
54. Ji X., Zhang J., Cheng L. et al. Oncolytic adenovirus delivering herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene reduces the growth of human retinoblastoma in an *in vivo* mouse model. *Exp Eye Res* 2009;89(2):193–9. DOI: 10.1016/j.exer.2009.03.007
55. Peng W., Chen J., Huang Y.H., Sawicki J.A. Tightly-regulated suicide gene expression kills PSA-expressing prostate tumor cells. *Gene Ther* 2005;12(21):1573–80. DOI: 10.1038/sj.gt.3302580
56. Yahya E.B., Alqadhi A.M. Recent trends in cancer therapy: a review on the current state of gene delivery. *Life Sci* 2021;269:119087. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119087
57. Li X., Le Y., Zhang Z. et al. Viral vector-based gene therapy. *Int J Mol Sci* 2023;24(9):7736. DOI: 10.3390/ijms24097736
58. Greig J.A., Martins K.M., Breton C. et al. Integrated vector genomes may contribute to long-term expression in primate liver after AAV administration. *Nat Biotechnol* 2023. DOI: 10.1038/s41587-023-01974-7
59. Zweiri J., Christmas S.E. Demonstration of anti-tumour bystander killing with prodrug-preloaded suicide gene-engineered tumour cells: a potential improvement for cancer therapeutics. *Cancer Cell Int* 2020;20:26. DOI: 10.1186/s12935-020-1115-4
60. Srivastava A., Mallela K.M.G., Deorkar N., Brophy G. Manufacturing challenges and rational formulation development for AAV viral vectors. *J Pharm Sci* 2021;110(7):2609–24. DOI: 10.1016/j.xphs.2021.03.024
61. Nguyen Q.M., Dupré P.F., Haute T. et al. Suicide gene strategies applied in ovarian cancer studies. *Cancer Gene Ther* 2023;30(6):812–21. DOI: 10.1038/s41417-023-00590-6
62. Ghasempour E., Hesami S., Movahed E. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy in the brain tumors. *Stem Cell Res Ther* 2022;13(1):527. DOI: 10.1186/s13287-022-03212-4
63. Oraee-Yazdani S., Tavanaei R., Rostami F. et al. Suicide gene therapy using allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cell gene delivery vehicles in recurrent glioblastoma multiforme: a first-in-human, dose-escalation, phase I clinical trial. *J Transl Med* 2023;21(1):350. DOI: 10.1186/s12967-023-04213-4

64. Hendijani F., Javanmard S.H., Sadeghi-aliabadi H. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cell secretome display antiproliferative effect on leukemia cell line and produce additive cytotoxic effect in combination with doxorubicin. *Tissue Cell* 2015;47(3):229–34. DOI: 10.1016/j.tice.2015.01.005
65. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents. *Bioessays* 2008;30(8):781–90. DOI: 10.1002/bies.20789
66. Dudkina E.V., Ulyanova V.V., Ilinskaya O.N. Supramolecular organization as a factor of ribonuclease cytotoxicity. *Acta Naturae* 2020;12(3):24–33. DOI: 10.32607/actanaturae.11000
67. Mitkevich V.A., Burnysheva K.M., Petrushanko I.Y. et al. Binase treatment increases interferon sensitivity and apoptosis in SiHa cervical carcinoma cells by downregulating E6 and E7 human papilloma virus oncoproteins. *Oncotarget* 2017;8(42):72666–75. DOI: 10.18632/oncotarget.20199
68. Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Y. et al. Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells. *Biochimica* 2013;95(6):1344–9. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.02.016
69. Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E. et al. Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochim Biophys Acta* 2016;1863(7 Pt. A):1559–67. DOI: 10.1016/j.bbamer.2016.04.005
70. Mironova N.L., Petrushanko I.Y., Patutina O.A. et al. Ribonuclease binase inhibits primary tumor growth and metastases via apoptosis induction in tumor cells. *Cell Cycle* 2013;12(13):2120–31. DOI: 10.4161/cc.25164
71. Dudkina E., Ulyanova V., Asmandiyarova V. et al. Two main cancer biomarkers as molecular targets of binase antitumor activity. *Biomed Res Int* 2024;2024:8159893. DOI: 10.1155/2024/8159893
72. Mitkevich V.A., Tchurikov N.A., Zelenikhin P.V. et al. Binase cleaves cellular noncoding RNAs and affects coding mRNAs. *FEBS J* 2010;277(1):186–96. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07471.x
73. Sokurenko J.V., Zelenikhin P.V., Ulyanova V.V. et al. Identification of 2',3'-cGMP as an intermediate of RNA catalytic cleavage by binase and evaluation of its biological action. *Bioorg Khim* 2015;41(1):37–43. DOI: 10.1134/s1068162015010136
74. Azarashvili T., Krestinina O., Galvita A. et al. Ca²⁺-dependent permeability transition regulation in rat brain mitochondria by 2',3'-cyclic nucleotides and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296(6):C1428–39. DOI: 10.1152/ajpcell.00006.2009
75. Cabrera Fuentes H.A., Kalacheva N.V., Mukhametshina R.T. et al. Binase penetration into alveolar epithelial cells does not induce cell death. *Biomed Khim* 2012;58(3):272–80. DOI: 10.18097/pbmc20125803272
76. Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Y. et al. Binase induces apoptosis of transformed myeloid cells and does not induce T-cell immune response. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361(4):1000–5. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.07.143

Вклад авторов

Е.В. Дудкина, В.В. Ульянова, О.Н. Ильинская: сбор, анализ и интерпретация данных литературы, написание текста статьи, научное редактирование.

Authors' contributions

E.V. Dudkina, V.V. Ulyanova, O.N. Ilinskaya: collection, analysis and interpretation of literature data, article writing, scientific editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.В. Дудкина / E.V. Dudkina: <https://orcid.org/0000-0002-2817-1384>

В.В. Ульянова / V.V. Ulyanova: <https://orcid.org/0000-0003-1768-3314>

О.Н. Ильинская / O.N. Ilinskaya: <https://orcid.org/0000-0001-6936-2032>

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 (проект № 21-74-10036) в рамках Программы стратегического академического лидерства ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» («Приоритет-2030»).

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 21-74-10036) within the framework of the Strategic Academic Leadership Program of the Kazan (Volga Region) Federal University ("Priority-2030").

Статья поступила: 09.04.2024. Принята к публикации: 03.05.2024.

Article submitted: 09.04.2024. Accepted for publication: 03.05.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-74-84>

Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b как мишень для таргетной терапии: особенности структуры, функции и экспрессии

Р.Г. Киямова, Р.А. Власенкова, Л.Ф. Булатова

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

Контакты: Рамзия Галлямовна Киямова kiyamova@mail.ru

Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b представляет собой трансмембранный белок семейства переносчиков фосфатов SLC34 и является привлекательным объектом для прецизионной (таргетной) терапии ряда заболеваний человека. Вместе с другими членами этого семейства данный транспортер принимает участие в поддержании фосфатного гомеостаза в организме млекопитающих. Ген транспортера NaPi2b (*SLC34A2*) имеет широкий паттерн экспрессии в здоровых тканях, включая клетки эпителия тонкого кишечника, где NaPi2b играет основную роль в абсорбции поступающих с пищей фосфатов. NaPi2b переносит в клетки вместе с тремя ионами натрия 1 двухвалентный остаток ортофосфорной кислоты. Транспорт NaPi2b регулируется содержанием фосфата в употребляемых продуктах питания, pH, гормонами и витаминами, включая витамин D, эстроген, глюкокортикоиды и эпидермальный фактор роста. Транспортер NaPi2b существует в двух изоформах – 689 и 690 аминокислотных остатков. Молекулярная масса NaPi2b зависит от степени гликозилирования и варьирует в пределах от 70 до 100 кДа. По разным данным, транспортер имеет от 6 до 12 трансмембранных доменов, 2 котранспортных домена, большой домен внеклеточной локализации, а также N- и C-концевые домены, которые обращены вовнутрь клетки. Нарушения функции NaPi2b приводят к развитию ряда заболеваний, включая легочный альвеолярный микролитиаз и гиперфосфатемию; при этом известно, что легочный альвеолярный микролитиаз связан с мутациями в гене *SLC34A2*, кодирующем NaPi2b. Высокий уровень содержания NaPi2b установлен в ряде злокачественных опухолей, в том числе яичника, легкого, молочной, щитовидной желез, толстой кишки, мочевого пузыря, печени, желудка, почки, а также в глиомах. Опухольеспецифическая конформация большого внеклеточного домена транспортера NaPi2b, мутации и особенности экспрессии гена транспортера в норме и при патологиях показывают, что NaPi2b является перспективной мишенью для разработки против него высокоселективных таргетных лекарственных средств для лечения онкологических заболеваний и метаболических нарушений.

Ключевые слова: NaPi2b, *SLC34A2*, злокачественное новообразование, экспрессия гена, мутация

Для цитирования: Киямова Р.Г., Власенкова Р.А., Булатова Л.Ф. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b как мишень для таргетной терапии: особенности структуры, функции и экспрессии. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):74–84.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-74-84>

Sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b as a candidate for targeted therapy: features of structure, function, and expression

R.G. Kiyamova, R.A. Vlasenkova, L.F. Bulatova

Biomarker Research Laboratory, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University; 18 Kremlevskaya St., Kazan 420008, Russia

Contacts: Ramziya Gallyamovna Kiyamova kiyamova@mail.ru

The sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b is an integral membrane protein of the SLC34 phosphate transporter family and is an attractive target for precision therapy of several human diseases. Together with other members of this family, the NaPi2b transporter is involved in maintaining phosphate homeostasis in the mammalian body. The NaPi2b transporter gene (*SLC34A2*) has a broad expression pattern in healthy tissues, including small intestinal epithelial cells, where NaPi2b plays a major role in the absorption of dietary phosphate. NaPi2b transports one divalent

orthophosphoric acid residue into cells along with three sodium ions. NaPi2b transport is regulated by dietary phosphate, pH, hormones, and vitamins including vitamin D, estrogen, glucocorticoids, and epidermal growth factor. The NaPi2b transporter exists in two isoforms – 689 and 690 amino acid residues. The molecular weight of NaPi2b depends on the degree of glycosylation and varies from 70 to 100 kDa. According to various sources, the transporter has from 6 to 12 transmembrane domains, 2 co-transport domains, a large extracellular localization domain, as well as N- and C-terminal domains that face the inside of the cell. Impaired NaPi2b function leads to the development of several diseases, including pulmonary alveolar microlithiasis and hyperphosphatemia, and pulmonary alveolar microlithiasis is known to be associated with mutations in the *SLC34A2* gene encoding NaPi2b. High levels of NaPi2b have been found in several malignant tumors, including ovary, lung, breast, thyroid, colon, bladder, liver, stomach, kidney, and in gliomas. The tumor-specific conformation of the large extracellular domain of the NaPi2b transporter, mutations, and features of expression of the transporter gene in normal and pathological conditions show that NaPi2b is a promising target for the development of highly selective targeted drugs against it for the treatment of cancer and metabolic disorders.

Keywords: NaPi2b, *SLC34A2*, malignant neoplasm, gene expression, mutation

For citation: Kiyamova R.G., Vlasenkova R.A, Bulatova L.F. Sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b as a candidate for targeted therapy: features of structure, function, and expression. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = Advances in Molecular Oncology 2024;11(2):74–84. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-74-84>

ВВЕДЕНИЕ

Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b – это интегральный мембранный белок, который принадлежит к семейству транспортеров SLC34 и участвует в поддержании фосфатного гомеостаза в организме млекопитающих [1, 2]. Интересно, что повышенная экспрессия гена транспортера NaPi2b обнаружена в клетках многих злокачественных новообразований (ЗНО), что делает NaPi2b привлекательной мишенью для создания таргетных противоопухолевых препаратов. На сегодняшний день уже созданы гуманизированные антитела, направленные против эпитопа MX35 транспортера NaPi2b, модифицированные цитостатиками [3] и радиоизотопами [4], которые показали свою эффективность на ксенографтных моделях с карциномой яичника и легкого.

Несмотря на то что NaPi2b присутствует в нормальных тканях, гуманизированные антитела, созданные на основе антител MX35, накапливаются преимущественно в опухолевых тканях [4, 5]; это может свидетельствовать об опухолеспецифической конформации эпитопа MX35 внутри большого внеклеточного домена транспортера.

В данном обзоре описываются структура и функция NaPi2b, анализируется его содержание в нормальных тканях и злокачественных опухолях, а также наличие мутаций в гене транспортера NaPi2b, ассоциированных с некоторыми патологиями, с целью охарактеризовать его в качестве мишени для прецизионной (таргетной) терапии онкологических и метаболических заболеваний, связанных с нарушением транспорта фосфатов в организме человека.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b

Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b принадлежит к семейству мембранных

транспортеров SLC34, куда также входят транспортеры NaPi2a и NaPi2c, которые участвуют в поддержании гомеостаза фосфатов в организме млекопитающих [6]. Благодаря работе фосфатного переносчика NaPi2b происходит всасывание неорганического фосфата в тонком кишечнике (абсорбция) [7], а в проксимальных канальцах почек за счет работы транспортеров NaPi2a и NaPi2c – реабсорбция большинства поступивших в организм фосфатов (70–80 %) [6]. Транспортер NaPi2b является вторичным симпортером [8, 9]: благодаря градиенту ионов натрия осуществляется транспорт фосфатов внутрь клетки. За один цикл переносчик NaPi2b транспортирует в клетки вместе с тремя ионами натрия один двухвалентный остаток ортофосфорной кислоты [10, 11]. Регуляция транспортной активности NaPi2b в тонком кишечнике зависит от содержания фосфатов в употребляемых продуктах питания [12], витамина D (кальцитриола) [13], показателя pH [14], глюкокортикоидов [15], эстрогена [16] и эпидермального фактора роста [17], что позволяет поддерживать уровень фосфатов в крови млекопитающих, включая человека, в диапазоне 0,8–1,5 ммоль [18].

Ген транспортера *SLC34A2* (NG_021185.2) был впервые клонирован в 90-х годах XX в. двумя группами исследователей: Н. Hilfiker и соавт. [19] и J.A. Feild и соавт. [20]. Транспортер NaPi2b является интегральным мембранным белком, который представлен в двух изоформах: 690 (изоформа а) или 689 (изоформа б) аминокислотных остатков [11]. Молекулярная масса NaPi2b зависит от уровня гликозилирования и варьирует от 70 до 100 кДа [15, 21], а количество предсказанных трансмембранных доменов для транспортера NaPi2b колеблется от 6 до 12 [10, 11, 21–23].

В настоящее время нет экспериментально подтвержденной трехмерной структуры транспортера NaPi2b, но существует пространственная модель NaPi2b камбалы, предсказанная *in silico* с использованием моделей

транспортера дикарбоксилатов *V. cholerae* (VcINDY) [22, 24] и NaPi2a, более изученного транспортера семейства SLC34 [11, 25].

Согласно этой модели транспортер NaPi2b имеет 2 котранспортных домена, 6 трансмембранных доменов, а его N- и C-концевые домены характеризуются внутриклеточной локализацией [11]. Следует отметить, что в предсказанной модели гена натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b в клетках нормальных тканей и органов отсутствует большой внеклеточный домен, который предположительно располагается между 3-м и 4-м трансмембранными доменами транспортера согласно моделям, предложенным другими авторами [10, 11, 21, 23, 26, 27].

Например, в работе Л.Ф. Булатовой и соавт. методом микроскопии с помощью антител к разным доменам транспортера NaPi2b на живых и пермеабализованных клетках линии карциномы яичника OVCAR-4 экспериментально подтверждена внутриклеточная локализация N- и C-концевых доменов NaPi2b, а также показана внеклеточная локализация его большого внеклеточного домена [11, 26].

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b В НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЯХ

Следует отметить, что в отличие от других транспортеров семейства SLC34 переносчик фосфатов

Таблица 1. Источники, предоставляющие сведения об экспрессии гена натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b в клетках органов млекопитающих

Table 1. Literature sources that provide information on the expression of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b gene in mammalian organ cells

Орган Organ	Источники, предоставляющие сведения о содержании матричной РНК гена NaPi2b в клетках органов млекопитающих Sources providing information of matrix RNA NaPi2b gene content in mammalian organ cells	Источники, предоставляющие сведения о содержании белка NaPi2b в клетках органов млекопитающих Sources providing information of NaPi2b protein content in mammalian organ cells
Тонкий кишечник Small intestine	Н. Hilfiker и соавт., 1998 [19]; J.A. Feild и соавт., 1999 [20] H. Hilfiker et al., 1998 [19]; J.A. Feild et al., 1999 [20]	Н. Hilfiker и соавт., 1998 [19] H. Hilfiker et al., 1998 [19]
Толстый кишечник Colon	Н. Hilfiker и соавт., 1998 [19] H. Hilfiker et al., 1998 [19]	—
Легкое Lung	Н. Hilfiker и соавт., 1998 [19]; J.A. Feild и соавт., 1999 [20] H. Hilfiker и соавт., 1998 [19]; J.A. Feild et al., 1999 [20]	R. Kiyamova и соавт., 2011 [29] R. Kiyamova et al., 2011 [29]
Трахея Trachea	M. Nishimura и S. Naito, 2008 [28] M. Nishimura and S. Naito, 2008 [28]	—
Молочная железа Breast	M. Nishimura и S. Naito, 2008 [28] M. Nishimura and S. Naito, 2008 [28]	K. Huber и соавт., 2007 [32]; R. Kiyamova и соавт., 2011 [29] K. Huber et al., 2007 [32]; R. Kiyamova et al., 2011 [29]
Щитовидная железа Thyroid	J.A. Feild и соавт., 1999 [20] J.A. Feild et al., 1999 [20]	—
Слюнная железа Salivary gland	M. Nishimura и S. Naito, 2008 [28] M. Nishimura and S. Naito, 2008 [28]	V. Homann и соавт., 2005 [33] V. Homann et al., 2005 [33]
Семенник Testis	Н. Hilfiker и соавт., 1998 [19] H. Hilfiker et al., 1998 [19]	Y. Xu и соавт., 2003 [30] Y. Xu et al., 2003 [30]
Матка/фаллопиевы трубы Uterus/fallopian tubes	M. Nishimura и S. Naito, 2008 [28] M. Nishimura and S. Naito, 2008 [28]	R. Kiyamova и соавт., 2011 [29] R. Kiyamova et al., 2011 [29]
Плацента Placenta	M. Nishimura и S. Naito, 2008 [28] M. Nishimura and S. Naito, 2008 [28]	—
Сетчатка глаза Retina	M. Nishimura и S. Naito, 2008 [28] M. Nishimura and S. Naito, 2008 [28]	—
Почка Kidney	Н. Hilfiker и соавт., 1998 [19]; J.A. Feild и соавт., 1999 [20] H. Hilfiker et al., 1998 [19]; J.A. Feild et al., 1999 [20]	—
Печень Liver	Н. Hilfiker и соавт., 1998 [19] H. Hilfiker et al., 1998 [19]	P. Frei и соавт., 2005 [31] P. Frei et al., 2005 [31]

NaPi2b имеет более широкий спектр экспрессии в тканях млекопитающих (табл. 1). Например, транспортеры NaPi2a и NaPi2c на данный момент выявлены только в проксимальных канальцах почечных нефронов, где они принимают участие в реабсорбции фосфатов [10]. На уровне матричной РНК (мРНК) экспрессия гена транспортера NaPi2b выявлена в тканях кишечника, легкого, трахеи, молочной, щитовидной, слюнной желез, семенника, матки, почки, сетчатки глаза и плаценты [13, 28]. Продемонстрировано содержание белка транспортера NaPi2b в альвеолярных клетках 2-го типа в легких [29], энтероцитах тонкого кишечника [19], эпителиальных (люминальных) клетках, выстилающих полости органов и желез, включая семенники [30], протоки печени [31], молочные [32] и слюнные железы [33].

В тонком кишечнике транспортер NaPi2b локализуется на люминальной мембране энтероцитов щеточной каемки, как было отмечено выше, и абсорбирует фосфат из пищи, поступающей в полость кишечника [7]. В нормальных тканях легкого транспортер NaPi2b представлен на апикальной поверхности альвеолоцитов 2-го типа, и предполагается, что он участвует в абсорбции фосфата из сурфактанта альвеол [34]. В эпителиальных клетках протоков молочной железы уровень белка NaPi2b повышается во время лактации, предположительно влияя на доставку фосфата в грудное молоко [32]. На нокаутных мышах показано, что ген транспортера NaPi2b экспрессируется в придатках яичка, где принимает участие в поддержании фосфатов на уровне 18–40 мМ, что важно для созревания сперматозоидов [30]. Продемонстрировано, что NaPi2b присутствует на люминальной поверхности клеточной мембраны эпителиальных клеток, выстилающих фаллопиевы трубы у женщин, где он предположительно принимает участие в созревании яйцеклеток путем поддержания высокого уровня фосфатов [29].

Показано, что ген фосфатного транспортера NaPi2b экспрессируется в клетках толстого восходящего сегмента почки человека, при этом уровень его экспрессии почти в 100 раз ниже, чем в альвеолоцитах [28].

Таким образом, транспортер NaPi2b присутствует в клетках целого ряда тканей млекопитающих и человека, при этом его содержание в тканях сильно варьирует, что связано, вероятно, с тонкой регуляцией уровня фосфатов в организме человека в зависимости от потребления фосфатов и особенностей фосфатного метаболизма в тканях разных органов млекопитающих.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b В КЛЕТКАХ РЯДА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Изучение экспрессии гена фосфатного транспортера NaPi2b в клетках злокачественных опухолей важно для понимания роли данного транспортера в злокачественной трансформации и разработки против него противоопухолевых препаратов.

На сегодняшний день высокая экспрессия гена транспортера NaPi2b обнаружена в клетках карциномы яичника [35–38], легкого [39, 40], молочной [41], щитовидной [42] желез и ряда других ЗНО (табл. 2). Высокий уровень NaPi2b в клетках рака яичника (РЯ) выявлен разными методами, включая серийный анализ геной экспрессии (SAGE-анализ) [35], полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени [37], вестерн-блоттинг [36] и иммуногистохимическое исследование [29, 36]. В работе В. Гришковой и соавт. отмечен высокий уровень содержания белка NaPi2b в клетках серозного подтипа РЯ, а также в клетках высокодифференцированных опухолей эндометриоидного подтипа РЯ с помощью вестерн-блоттинга лизатов опухолей пациентов с карциномой яичника [36]. В клетках муцинозных опухолей РЯ содержание NaPi2b с помощью вестерн-блоттинга авторы не выявили [36].

Данные об экспрессии гена транспортера NaPi2b в злокачественных опухолях легкого довольно противоречивы. Показано, что уровень мРНК гена NaPi2b в злокачественных опухолях легкого снижен по сравнению с образцами нормальных тканей легкого [43, 44]. Изучение содержания белка NaPi2b в опухолях легкого с помощью иммуногистохимического анализа продемонстрировало его высокий уровень в аденокарциномах легкого [40]. Результаты другого крупного исследования продемонстрировали, что высокий уровень NaPi2b связан с лучшими показателями общей выживаемости пациентов с карциномой легкого [45]. По нашему предположению, противоречивые данные, полученные при анализе экспрессии гена транспортера NaPi2b в карциномах легкого на уровне мРНК и белка, связаны с гетерогенным профилем экспрессии гена NaPi2b в злокачественных опухолях легкого различных гистологических типов, а также с особенностями локализации NaPi2b в опухолевых клетках и регуляции на уровне трансляции, что требует дальнейшего более детального анализа.

Высокая экспрессия гена транспортера NaPi2b обнаружена в клетках папиллярной карциномы щитовидной железы [46]. Иммуногистохимический анализ образцов пациентов с данной патологией выявил большое содержание в них NaPi2b [47–49], при этом не было обнаружено различий в уровне NaPi2b в разных гистологических подтипах папиллярной карциномы щитовидной железы [47].

Высокий уровень транспортера NaPi2b отмечен и в клетках других злокачественных опухолей, а именно толстой кишки [50], мочевого пузыря [51], печени [52], желудка [53], почки [54], а также в глиомах [55].

Высокое содержание транспортера NaPi2b в опухолевых клетках, его локализация на мембране клеток, а также наличие потенциального опухолеспецифического эпитопа в составе большого внеклеточного домена транспортера позволяют сделать вывод, что этот транспортер является привлекательной мишенью для

Таблица 2. Источники, предоставляющие сведения об экспрессии гена натрий-зависимого фосфатного транспортера *NaPi2b* в клетках злокачественных новообразований

Table 2. Table 2. Literature sources that provide information on the expression of the sodium-dependent phosphate transporter *NaPi2b* gene in malignant cancer cells

Локализация опухоли Tumor location	Источники, предоставляющие сведения о содержании матричной РНК гена <i>NaPi2b</i> в клетках злокачественных новообразований Sources providing information of matrix RNA <i>NaPi2b</i> gene content in malignant neoplasm cells	Источники, предоставляющие сведения о содержании белка <i>NaPi2b</i> в клетках злокачественных новообразований Sources providing information of <i>NaPi2b</i> protein content in malignant neoplasm cells
Яичник Ovary	L.B.A. Rangel и соавт., 2003 [35]; M. Shyian и соавт., 2011 [37] L.B.A. Rangel et al., 2003 [35]; M. Shyian et al., 2011 [37]	V. Gryshkova и соавт., 2009 [36]; R. Kiyamova и соавт., 2011 [29]; I.C. Soares и соавт., 2012 [38] V. Gryshkova et al., 2009 [36]; R. Kiyamova et al., 2011 [29]; I.C. Soares et al., 2012 [38]
Легкое Lung	Y. Wang и соавт., 2015 [43]; R. Vlasenkova и соавт., 2021 [44] Y. Wang et al., 2015 [43]; R. Vlasenkova et al., 2021 [44]	Z. Zhang и соавт., 2017 [40]; S. Heynemann и соавт., 2022 [45] Z. Zhang et al., 2017 [40]; S. Heynemann et al., 2022 [45]
Молочная железа Breast	D.R. Chen и соавт., 2010 [41] D.R. Chen et al., 2010 [41]	R. Kiyamova и соавт., 2011 [29] R. Kiyamova et al., 2011 [29]
Щитовидная железа Thyroid	B. Jarzab и соавт., 2005 [46] B. Jarzab et al., 2005 [46]	S.A. Hakim и соавт., 2021 [47]; F. Huang и соавт., 2021 [48]; S. Hong и соавт., 2022 [49] S.A. Hakim et al., 2021 [47]; F. Huang et al., 2021 [48]; S. Hong et al., 2022 [49]
Толстый кишечник Colon	L. Liu и соавт., 2018 [50] L. Liu et al., 2018 [50]	L. Liu и соавт., 2018 [50] L. Liu et al., 2018 [50]
Мочевой пузырь Bladder	W. Ye и соавт., 2017 [51] W. Ye et al., 2017 [51]	W. Ye и соавт., 2017 [51] W. Ye et al., 2017 [51]
Печень Liver	Y. Li и соавт., 2016 [52] Y. Li et al., 2016 [52]	Y. Li и соавт., 2016 [52] Y. Li et al., 2016 [52]
Желудок Stomach	L. Zhang и соавт., 2018 [53] L. Zhang et al., 2018 [53]	L. Zhang и соавт., 2018 [53] L. Zhang et al., 2018 [53]
Почка Kidney	K.E. Fisher и соавт., 2014 [54] K.E. Fisher et al., 2014 [54]	—
Головной или спинной мозг Brain or spinal cord	Z. Bao и соавт., 2019 [55] Z. Bao et al., 2019 [55]	Z. Bao и соавт., 2019 [55] Z. Bao et al., 2019 [55]

терапии онкологических заболеваний различной этиологии.

Информацию об уровне экспрессии генов, включая ген транспортера *NaPi2b*, можно получить не только из работ разных авторов, но и из открытых баз данных, включая cBioPortal, где представлена информация проектов «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA) и AACR Project Genie, порталы Международного консорциума по изучению генома рака (The International Cancer Genome Consortium, ICGC), обеспечивающего международную координацию крупномасштабных исследований генома рака, и ArrayExpress, содержащего информацию об уровнях экспрессии различных генов в опухолевых образцах.

Согласно данным TCGA, уровень мРНК гена *SLC34A2* повышен в образцах опухолей желчевыводящих путей (холангиокарцинома), щитовидной железы,

почки (несветлоклеточный почечно-клеточный рак), пищевода и желудка, мочевого пузыря, кишечника и эндометрия (рис. 1). Пониженный уровень мРНК гена *SLC34A2* обнаружен в образцах опухолей печени и желчевыводящих путей, немелкоклеточной карциномы легкого, светлоклеточного почечно-клеточного рака, опухолей молочной железы, головы и шеи и предстательной железы (см. рис. 1).

Ранее нами было выполнено крупномасштабное *in silico* исследование экспрессии гена *SLC34A2* в опухолях разной локализации с использованием базы данных TCGA и исследования E-MTAB-3732 из базы ArrayExpress [44]. Все собранные образцы классифицированы по 27 локализациям опухолей: надпочечник, желчевыводящие пути, мочевой пузырь, кость, кишечник, молочная железа, центральная нервная система и головной мозг, шейка матки, пищевод и желудок,

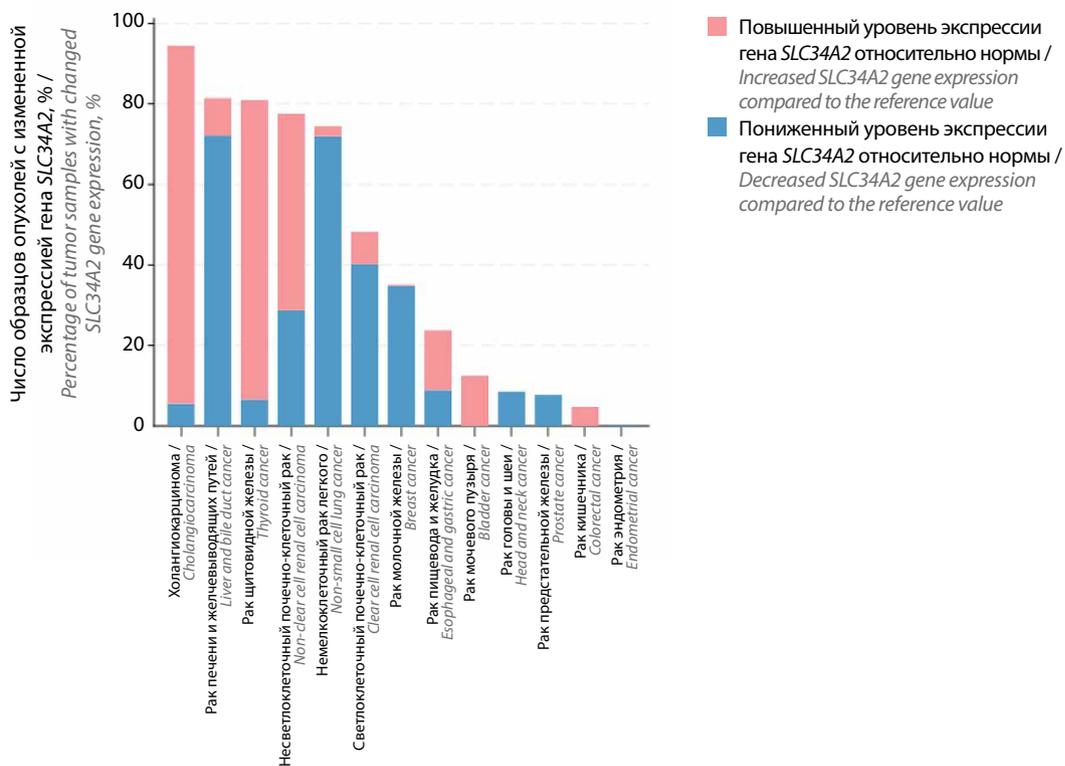


Рис. 1. Профиль измененной экспрессии гена *SLC34A2* в опухолях различной локализации согласно данным проекта «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA). Рисунок адаптирован из базы данных cBioPortal (<https://www.cbioportal.org>)
Fig. 1. Profile of altered expression of the *SLC34A2* gene in tumors of various localization according to the The Cancer Genome Atlas project (TCGA). The picture is adapted from the bioportal database (<https://www.cbioportal.org>)

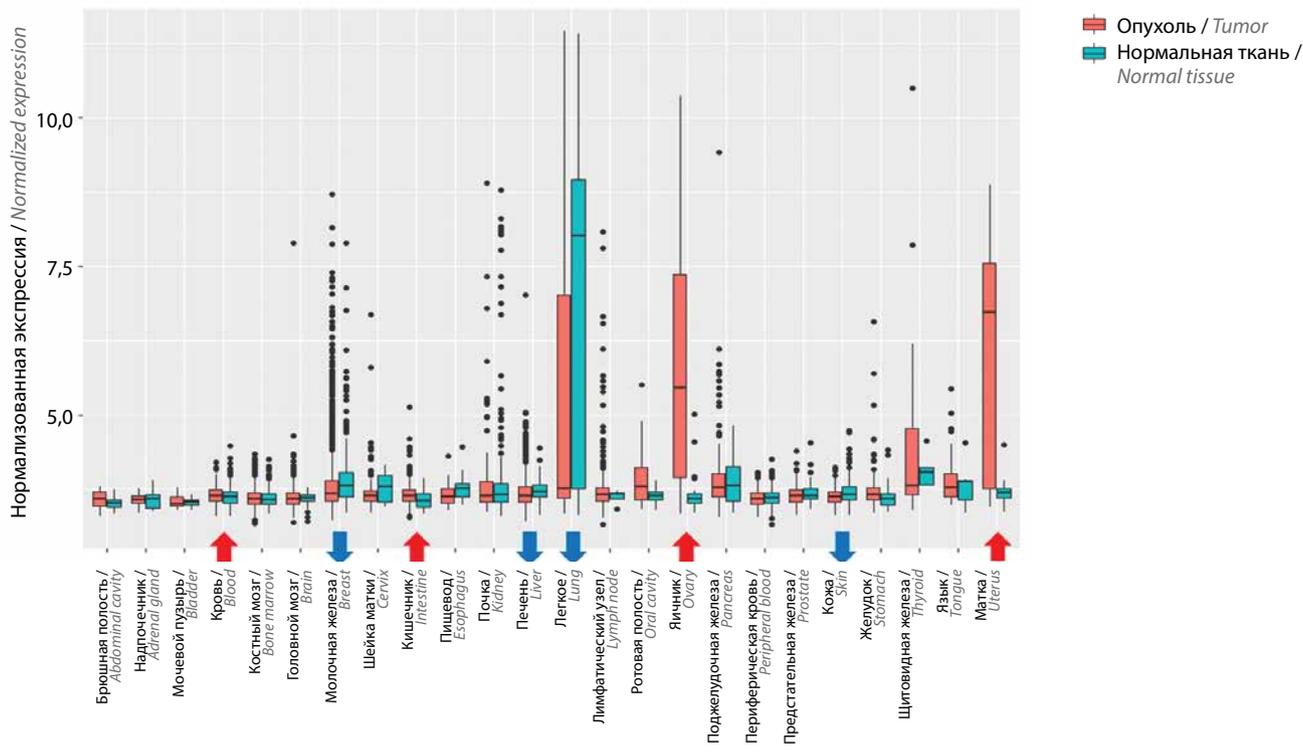


Рис. 2. Сравнительный анализ экспрессии гена *SLC34A2* в образцах злокачественных новообразований и нормальной ткани на основе данных исследования E-MTAB-3732 из базы ArrayExpress (адаптировано из [44])
Fig. 2. Comparative analysis of the expression level of the *SLC34A2* gene in tumor tissue samples compared with normal tissue samples based on data from the E-MTAB-3732 study from the ArrayExpress database (adapted from [44])

глаз, голова и шея, почка, печень, легкое, лимфатический узел, спинной мозг, яичник, поджелудочная железа, плевра, предстательная железа, кожа, мягкие ткани, семенник, вилочковая железа, щитовидная железа, матка и опухоли неизвестного происхождения. На основе результатов исследования E-MTAB-3732 мы сравнили уровни экспрессии *SLC34A2* в образцах нормальной ($n = 3638$) и опухолевой ($n = 9112$) тканей (рис. 2).

Для выявления статистической значимости применяли тест Уилкоксона с поправкой на множественность сравнений ($p < 0,05$).

Повышенный уровень экспрессии гена *SLC34A2* обнаружен в образцах опухолей спинного мозга, кишечника, яичника и матки, пониженный – в образцах опухолей молочной железы, печени, легких и кожи [44]. С помощью метода Каплана–Майера и многомерного анализа выживаемости обнаружено, что повышенная экспрессия гена *SLC34A2* коррелирует с плохим прогнозом выживаемости пациентов с опухолями головного мозга, яичника и поджелудочной железы [44].

Следует отметить, что в базе данных cBioPortal и согласно проведенному нами анализу результатов исследования из базы ArrayExpress повышенный уровень экспрессии гена *SLC34A2* отмечается в опухолях матки, а пониженный – в опухолях молочной железы, печени и легких. Таким образом, *in silico* анализ экспрессии гена транспортера NaPi2b показал, что уровень мРНК гена *SLC34A2* в опухолях разной локализации сильно варьирует, а ЗНО с повышенным уровнем экспрессии гена NaPi2b представляют особый интерес для дальнейшего изучения, поскольку являются потенциальными мишенями для противоопухолевой терапии, направленной против транспортера NaPi2b.

РОЛЬ НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b В ПАТОГЕНЕЗЕ РЯДА ЗАБОЛЕВАНИЙ

В настоящее время существуют заболевания человека, которые связаны с мутациями в гене *SLC34A2*, кодирующем фосфатный транспортер NaPi2b. Одной из таких патологий является легочный альвеолярный микролитиаз. Это наследственное орфанное заболевание, характеризующееся прогрессирующим отложением микрокристаллов фосфата кальция в альвеолярных воздушных пространствах легких [56, 57]. Впервые данную патологию стали ассоциировать с наличием мутаций в гене *SLC34A2* в 2006 г. [58]. А. Corut и соавт. идентифицировали 6 гомозиготных мутаций в экзонной области *SLC34A2* у всех исследуемых пациентов с легочным альвеолярным микролитиазом. Дополнительно авторы сообщили о возможной связи мутаций в этом гене с развитием тестикулярного микролитиаза, который характеризуется накоплением кристаллов фосфата кальция в семенниках человека. В настоящее время известно о 34 различных мутациях в гене *SLC34A2*, ассоциированных с альвеолярным микролитиазом, включая сдвиг рамки считывания, делеции

и миссенс-мутации, а также изменения в промоторной области и потенциальных сайтах сплайсинга этого гена [23, 59–61]. К сожалению, на данный момент методов лечения этой патологии не существует, назначается только симптоматическая терапия, однако ранняя генетическая диагностика и понимание молекулярных механизмов патофизиологии легочного альвеолярного микролитиаза могут помочь в будущем в разработке подходов для терапии этого заболевания [62].

Транспортер NaPi2b может быть перспективной мишенью для направленной терапии гиперфосфатемии, развивающейся на терминальных стадиях хронической болезни почек (ХБП) – заболевания с медленной прогрессией, которое отличается постепенным угасанием работы нефронов, что приводит к нарушению фильтрации метаболитических продуктов из крови. Данная патология характеризуется резким нарушением функционирования гормонов, регулирующих фосфатный обмен [60, 63]. Это касается паратиреоидного гормона (ПТГ) и фактора роста фибробластов 23 (FGF-23) [60], уровни которых растут на ранних стадиях развития ХБП. Это приводит к усилению выведения фосфатов почками для поддержания содержания фосфата в крови в пределах физиологических значений [64]. На терминальных стадиях ХБП, несмотря на неуклонный рост в плазме крови ПТГ и FGF-23, почки теряют способность экскретировать избыток фосфатов, всасываемых в кишечнике. Это приводит к развитию гиперфосфатемии [65], которая является основным фактором риска смертности у пациентов с ХБП [66], поэтому ее лечение имеет первостепенное значение [11]. Основные методы терапии данного заболевания связаны с ограничением потребления фосфатов путем добавления в пищу фосфат-связывающих препаратов, включая гидроксид алюминия, ацетат и карбонат кальция, лантанума карбонат, а также севеламера гидроксид [67, 68]. Перспективным методом лечения гиперфосфатемии может быть использование никотинамида – ингибитора NaPi2b [69], а также других таргетных препаратов, направленных против транспортера NaPi2b в кишечнике [11].

Интересно, что мутации в гене *SLC34A2*, включая p.T330V (замену остатка треонина на остаток валина в 330-м положении), выявлены в клеточных линиях РЯ; при этом мутантная форма транспортера с заменой p.T330V не распознается моноклональными антителами MX35 и L2(20/3) [70], которые послужили основой для создания терапевтических антител [3, 4, 11]. Это означает, что часть пациентов, в клетках карциномы яичника которых присутствует транспортер NaPi2b с мутацией p.T330V, не будут чувствительны к терапии антителами, направленными против эпитопа MX35. Однако распространенность данной мутации среди пациентов с карциномой яичника еще предстоит изучить.

Ранее нами был проведен анализ *in silico* мутаций в гене *SLC34A2* в образцах опухолей разной этиологии с использованием сведений, полученных в ходе реали-

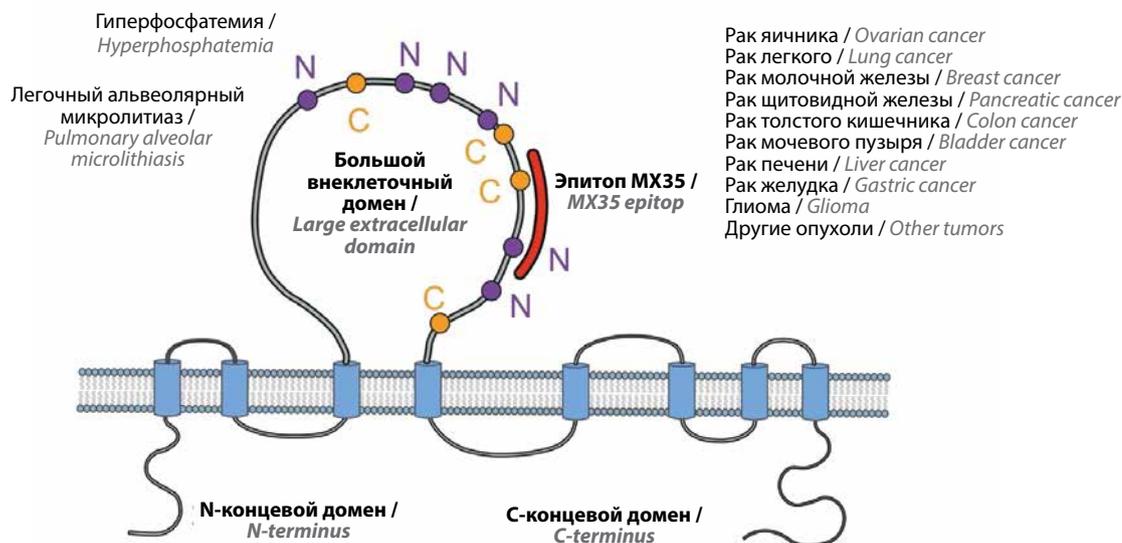


Рис. 3. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b как мишень для таргетной терапии некоторых патологий человека. N – остатки аспарагина большого внеклеточного домена транспортера NaPi2b; C – остатки цистеина большого внеклеточного домена транспортера NaPi2b
Fig. 3. Sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b as a target for targeted therapy of some human pathologies. N – asparagine residues of the large extracellular domain of the NaPi2b transporter; C – cysteine residues of the large extracellular domain of the NaPi2b transporter

зации проектов ICGC, Genie и TCGA [44]. Выявлено, что наиболее часто встречалась мутация, образующая гибридный ген *SLC34A2-ROS1*, а также замены p.T154A, p.G257A/E/R, S318W, p.A396T, p.P410L/S/H, p.S461C, p.A473T/V, p.Y503H/C/F и p.P506S/R/L. В небольшом проценте случаев немелкоклеточного рака легкого ген *ROS1* образует онкогенный химерный ген, в том числе с геном *SLC34A2* [71]. Самая высокая частота встречаемости мутаций в гене *SLC34A2* отмечается в ЗНО кожи, легких, кишечника и матки [44]. Более того, установлено, что у пациентов с ЗНО молочной железы и тимуса с наличием мутаций в этом гене показатели выживаемости ниже, чем у пациентов без мутаций [44].

Таким образом, мутации в гене транспортера NaPi2b, ассоциированные с накоплением фосфатов кальция в легких и семенниках человека, могут приводить к развитию микролитиаза, а гормональные нарушения – к повышенной работе транспортера NaPi2b, в результате чего развивается гиперфосфатемия. Мутации, найденные в гене транспортера NaPi2b в клетках клеточной линии карциномы яичника, предположительно могут влиять на распознавание NaPi2b моноклональными антителами, а значит, должны учитываться при разработке таргетных препаратов против NaPi2b. Дальнейшее изучение мутаций в гене транспортера NaPi2b и связанных с ними генетических и молекулярных особенностей развития ряда заболеваний должно привести к созданию таргетных препаратов, направленных против транспортера NaPi2b, которые будут использоваться для лечения патологий

человека, включая альвеолярный микролитиаз, гиперфосфатемия и онкологические заболевания.

На рис. 3 представлены предполагаемая (гипотетическая) модель натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с 8 трансмембранными доменами, большим внеклеточным доменом, а также N- и C-концевыми доменами, которые располагаются в цитоплазме клетки, и его связь с рядом патологий человека [21, 26]. Конформация большого внеклеточного домена зависит от посттрансляционных модификаций, а именно гликозилирования 6 остатков аспарагина и образования дисульфидных связей между 4 остатками цистеина [11]. В высокоиммуногенной области большого внеклеточного домена NaPi2b располагается эпитоп MX35, против которого на сегодняшний день получен ряд гуманизированных моноклональных антител [3, 4]. Данные, представленные на рис. 3, наглядно демонстрируют, с какими патологиями человека ассоциирован натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b, что может быть использовано для разработки подходов для диагностики и/или терапии, а также понимания молекулярных механизмов патогенеза этих заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ген *SLC34A2*, продуктом которого является натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b, экспрессируется в ряде тканей здоровых органов и принимает участие в поддержании фосфатного обмена в организме млекопитающих, в том числе человека. Локализация на мембране и высокое

содержание транспортера NaPi2b в клетках злокачественных опухолей легкого, яичника, желудка, щитовидной, молочной желез, мочевого пузыря, почки, печени, толстой кишки и глиомы позволяют рассматривать NaPi2b в качестве потенциальной мишени для прецизионной терапии. Мутации в гене транспортера NaPi2b, а также дисфункция транспортера в результате гормонального дисбаланса приводят к развитию

ряда заболеваний, включая легочный альвеолярный микролитиаз и гиперфосфатемия. Мутации и особенности экспрессии гена транспортера в норме и при патологиях показывают, что NaPi2b стоит рассматривать как перспективную мишень для разработки против него высокоселективных лекарственных препаратов для лечения онкологических заболеваний и метаболических нарушений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Forster I.C. The molecular mechanism of SLC34 proteins: insights from two decades of transport assays and structure-function studies. *Pflugers Arch* 2019;471(1):15–42. DOI: 10.1007/s00424-018-2207-z
- Murer H., Forster I., Biber J. The sodium phosphate cotransporter family SLC34. *Pflugers Arch* 2004;447(5):763–7. DOI: 10.1007/s00424-003-1072-5
- Bodyak N.D., Mosher R., Yurkovetskiy A.V. et al. The dolaflexin-based antibody-drug conjugate XMT-1536 targets the solid tumor lineage antigen SLC34A2/NaPi2b. *Mol Cancer Ther* 2021;20(5):896–905. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0183
- Lindegren S., Andrade L.N.S., Bäck T. et al. Binding affinity, specificity and comparative biodistribution of the parental murine monoclonal antibody MX35 (anti-NaPi2b) and its humanized version Rebmab200. *PLoS One* 2015;10(5):e0126298. DOI: 10.1371/journal.pone.0126298
- Rubin S.C., Kostakoglu L., Divgi C. et al. Biodistribution and intraoperative evaluation of radiolabeled monoclonal antibody MX 35 in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1993;51(1):61–6. DOI: 10.1006/gyno.1993.1247
- Wagner C.A. The basics of phosphate metabolism. *Nephrol Dial Transplant* 2023;39(2):190–201. DOI: 10.1093/ndt/gfad188
- Marks J. The role of SLC34A2 in intestinal phosphate absorption and phosphate homeostasis. *Pflugers Arch* 2019;471(1):165–73. DOI: 10.1007/s00424-018-2221-1
- Forster I.C., Loo D.D.F., Eskandari S. Stoichiometry and Na⁺ binding cooperativity of rat and flounder renal type II Na⁺-picotransporters. *Am J Physiol* 1999;276(4):F644–9. DOI: 10.1152/ajprenal.1999.276.4.F644
- Levi M., Gratton E., Forster I.C. et al. Mechanisms of phosphate transport. *Nat Rev Nephrol* 2019;15(8):482–500. DOI: 10.1038/s41581-019-0159-y
- Forster I.C., Hernando N., Biber J. et al. Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. *Mol Aspects Med* 2013;34(2–3):386–95. DOI: 10.1016/j.mam.2012.07.007
- Булатова Л.Ф. Влияние посттрансляционных модификаций на распознавание эпитопа MX35 натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань, 2022. 26 с. Bulatova L.F. The effect of posttranslational modifications on the recognition of the MX35 epitope of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies. Author's abstract. Diss. ... Cand. Biol. Sciences. Kazan, 2022. 26 p. (In Russ.).
- Radanovic T., Wagner C.A., Murer H. et al. Regulation of intestinal phosphate transport I. Segmental expression and adaptation to low-Pi diet of the type IIb Na⁺-Picotransporter in mouse small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288(3):G496–500. DOI: 10.1152/ajpgi.00167.2004
- Hernando N., Wagner C.A. Mechanisms and regulation of intestinal phosphate absorption. *Compr Physiol* 2018;8(3):1065–90. DOI: 10.1002/cphy.c170024
- Xu H., Inouye M., Missey T. et al. Functional characterization of the human intestinal NaPi-IIb cotransporter in hamster fibroblasts and *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 2002;1567(1–2):97–105. DOI: 10.1016/S0005-2736(02)00604-1
- Arima K., Hines E.R., Kiela P.R. et al. Glucocorticoid regulation and glycosylation of mouse intestinal type IIb Na-Pi cotransporter during ontogeny. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283(2):G426–34. DOI: 10.1152/ajpgi.00319.2001
- Xu H., Uno J.K., Inouye M. et al. Regulation of intestinal NaPi-IIb cotransporter gene expression by estrogen. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285(6):G1317–24. DOI: 10.1152/ajpgi.00172.2003
- Tang X., Liu X., Liu H. Mechanisms of epidermal growth factor effect on animal intestinal phosphate absorption: a review. *Front Vet Sci* 2021;8:670140. DOI: 10.3389/fvets.2021.670140
- Jennings M.L. Role of transporters in regulating mammalian intracellular inorganic phosphate. *Front Pharmacol* 2023;14:1163442. DOI: 10.3389/fphar.2023.1163442
- Hilfiker H., Hattenhauer O., Traebert M. et al. Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95(24):14564–9. DOI: 10.1073/pnas.95.24.14564
- Feild J.A., Zhang L., Brun K.A. et al. Cloning and functional characterization of a sodium-dependent phosphate transporter expressed in human lung and small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;258(3):578–82. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0666
- Yin B.W.T., Kiyamova R., Chua R. et al. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas. *Cancer Immun* 2008;8:3.
- Patti M., Fenollar-Ferrer C., Werner A. et al. Cation interactions and membrane potential induce conformational changes in NaPi-IIb. *Biophys J* 2016;111(5):973–88. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.07.025
- Jönsson Å.L.M., Bendstrup E., Mogensen S. et al. Eight novel variants in the SLC34A2 gene in pulmonary alveolar microlithiasis. *Eur Respir J* 2020;55(2):1900806. DOI: 10.1183/13993003.00806-2019
- Forster I.C., Hernando N., Biber J. et al. Phosphate transport kinetics and structure-function relationships of SLC34 and SLC20 proteins. *Curr Top Membr* 2012;70:313–56. DOI: 10.1016/B978-0-12-394316-3.00010-7
- Fenollar-Ferrer C., Patti M., Knöpfel T. et al. Structural fold and binding sites of the human Na⁺-phosphate cotransporter NaPi-II. *Biophys J* 2014;106(6):1268–79. DOI: 10.1016/j.bpj.2014.01.043
- Bulatova L., Savenkova D., Nurgalieva A. et al. Toward a topology-based therapeutic design of membrane proteins: validation of NaPi2b topology in live ovarian cancer cells. *Front Mol Biosci* 2022;9:895911. DOI: 10.3389/fmolb.2022.895911
- Коротаева А.В., Булатова Л.Ф., Власenkova Р.А. и др. Распознавание Na-зависимого фосфатного транспортера NAPI2B моноклональными антителами в клетках бактерий и эукариот. *Биотехнология* 2022;38(5):66–72. DOI: 10.56304/S023427582205009X
- Korotaeva A.V., Bulatova L.F., Vlasenkova R.A. et al. Recognition of the Na-dependent phosphate transporter NAPI2B by monoclonal

- antibodies in bacterial and eukaryotic cells. *Biotechnologiya = Biotechnology* 2022;38(5):66–72. (In Russ.). DOI: 10.56304/S023427582205009X
28. Nishimura M., Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 2008;23(1):22–44. DOI: 10.2133/dmpk.23.22
 29. Kiyamova R., Shyian M., Lyzogubov V.V. et al. Immunohistochemical analysis of NaPi2b protein (MX35 antigen) expression and subcellular localization in human normal and cancer tissues. *Exp Oncol* 2011;33(3):157–61.
 30. Xu Y., Yeung C.H., Setiawan I. Sodium-inorganic phosphate cotransporter NaPi-IIb in the epididymis and its potential role in male fertility studied in a transgenic mouse model. *Biol Reprod* 2003;69(4):1135–41. DOI: 10.1095/biolreprod.103.018028
 31. Frei P., Gao B., Hagenbuch B. et al. Identification and localization of sodium-phosphate cotransporters in hepatocytes and cholangiocytes of rat liver. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 2005;288(4):G771–8. DOI: 10.1152/ajpgi.00272.2004
 32. Huber K., Muscher A., Breves G. Sodium-dependent phosphate transport across the apical membrane of alveolar epithelium in caprine mammary gland. *Comp Biochem Physiology A Mol Integr Physiol* 2007;146(2):215–22. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.10.024
 33. Homann V., Rosin-Steiner S., Stratmann T. et al. Sodium-phosphate cotransporter in human salivary glands: Molecular evidence for the involvement of NPT2b in acinar phosphate secretion and ductal phosphate reabsorption. *Arch Oral Biol* 2005;50(9):759–68. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2005.01.009
 34. Ikegami M., Falcone A., Whittsett J.A. STAT-3 regulates surfactant phospholipid homeostasis in normal lung and during endotoxin-mediated lung injury. *J Appl Physiol* 2008;104(6):1753–60. DOI: 10.1152/jappphysiol.00875.2007
 35. Rangel L.B.A., Sherman-Baust C.A., Wernyj R.P. et al. Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression. *Oncogene* 2003;22(46):7225–32. DOI: 10.1038/sj.onc.1207008
 36. Gryshkova V., Goncharuk I., Gurtovyy V. et al. The study of phosphate transporter NAPI2B expression in different histological types of epithelial ovarian cancer. *Exp Oncol* 2009;31(1):37–42.
 37. Shyian M., Gryshkova V., Kostianets O. et al. Quantitative analysis of SLC34A2 expression in different types of ovarian tumors. *Exp Oncol* 2011;33(2):94–8.
 38. Soares I.C., Simões K., Souza J.E.S. de. et al. *In sulico* analysis and immunohistochemical characterization of NaPi2b protein expression in ovarian carcinoma with monoclonal antibody Mx35. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012;20(2):165–72. DOI: 10.1097/pai.0b013e318228e232
 39. Kopantzev E.P., Monastyrskaya G.S., Vinogradova T.V. et al. Differences in gene expression levels between early and later stages of human lung development are opposite to those between normal lung tissue and non-small lung cell carcinoma. *Lung Cancer* 2008;62(1):23–34. DOI: 10.1016/j.lungcan.2008.02.011
 40. Zhang Z., Ye S., Zhang M. et al. High expression of SLC34A2 is a favorable prognostic marker in lung adenocarcinoma patients. *Tumor Biol* 2017;39(7):1010428317720212. DOI: 10.1177/1010428317720212
 41. Chen D.R., Chien S.Y., Kuo S.J. et al. SLC34A2 as a novel marker for diagnosis and targeted therapy of breast cancer. *Anticancer Res* 2010;30(10):4135–40.
 42. Kim H.S., Kim D.H., Kim J.Y. et al. Microarray analysis of papillary thyroid cancers in Korean. *Korean J Intern Medicine* 2010;25(4):399–407. DOI: 10.3904/kjim.2010.25.4.399
 43. Wang Y., Yang W., Pu Q. et al. The effects and mechanisms of SLC34A2 in tumorigenesis and progression of human non-small cell lung cancer. *J Biomed Sci* 2015;22(1):52. DOI: 10.1186/s12929-015-0158-7
 44. Vlasenkova R., Nurgalieva A., Akberova N. et al. Characterization of SLC34A2 as a potential prognostic marker of oncological diseases. *Biomolecules* 2021;11(12):1878. DOI: 10.3390/biom11121878
 45. Heynemann S., Yu H., Churilov L. et al. NaPi2b expression in a large surgical non-small cell lung cancer (NSCLC) cohort. *Clin Lung Cancer* 2022;23(2):e90–8. DOI: 10.1016/j.clcc.2021.11.005
 46. Jarzab B., Wiench M., Fajewicz K. et al. Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. *Cancer Res* 2005;65(4):1587–97. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3078
 47. Hakim S.A., Atti R.M.A.E., Faheim R.M. et al. Evaluation of the prognostic value of solute carrier family 34 member 2 “SLC34A2” in papillary thyroid carcinoma: an immunohistochemical study. *Anal Cell Pathol* 2021;3198555. DOI: 10.1155/2021/3198555
 48. Huang F., Wang H., Xiao J. et al. SLC34A2 up-regulation and SLC4A4 down-regulation correlates with invasion, metastasis, and the MAPK signaling pathway in papillary thyroid carcinomas. *J Cancer* 2021;12(18):5439–53. DOI: 10.7150/jca.56730
 49. Hong S., Xie Y., Cheng Z. et al. Distinct molecular subtypes of papillary thyroid carcinoma and gene signature with diagnostic capability. *Oncogene* 2022;41(47):5121–32. DOI: 10.1038/s41388-022-02499-0
 50. Liu L., Yang Y., Zhou X. et al. Solute carrier family 34 member 2 overexpression contributes to tumor growth and poor patient survival in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother* 2018;99:645–54. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.124
 51. Ye W., Chen C., Gao Y. et al. Overexpression of SLC34A2 is an independent prognostic indicator in bladder cancer and its depletion suppresses tumor growth via decreasing c-Myc expression and transcriptional activity. *Cell Death Dis* 2017;8(2):e2581. DOI: 10.1038/cddis.2017.13
 52. Li Y., Chen X., Lu H. Knockdown of SLC34A2 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther* 2016;24(6):511–9. DOI: 10.3727/096504016X14719078133483
 53. Zhang L., Guo X., Zhang L. et al. SLC34A2 regulates miR-25-Gsk3 β signaling pathway to affect tumor progression in gastric cancer stem cell-like cells. *Mol Carcinog* 2018;57(3):440–50. DOI: 10.1002/mc.22768
 54. Fisher K.E., Yin-Goen Q., Alexis D. et al. Gene expression profiling of clear cell papillary renal cell carcinoma: comparison with clear cell renal cell carcinoma and papillary renal cell carcinoma. *Mod Pathol* 2014;27(2):222–30. DOI: 10.1038/modpathol.2013.140
 55. Bao Z., Chen L., Guo S. Knockdown of SLC34A2 inhibits cell proliferation, metastasis, and elevates chemosensitivity in glioma. *J Cell Biochem* 2019;120(6):10205–14. DOI: 10.1002/jcb.28305
 56. Enemark A., Jönsson Å.L.M., Kronborg-White S. et al. Pulmonary alveolar microlithiasis – a review. *Yale J Biol Med* 2021;94(4):637–44.
 57. Баранова А.Н., Абраменко А.В., Георгинова О.А. и др. Экстрапульмональные поражения у пациентов с орфанными заболеваниями легких. *Практическая пульмонология* 2023;2:45–55. DOI: 10.24412/24096636202312878
Baranova A.N., Abramenko A.V., Georginova O.A. et al. Extrapulmonary lesions in patients with orphan lung diseases. *Prakticheskaya pulmonologiya = Practical Pulmonology* 2023;2:45–55. (In Russ.). DOI: 10.24412/24096636202312878
 58. Corut A., Senyigit A., Ugur S.A. et al. Mutations in SLC34A2 cause pulmonary alveolar microlithiasis and are possibly associated with testicular microlithiasis. *Am J Hum Genet* 2006;79(4):650–6. DOI: 10.1086/508263
 59. Lituiev D.S., Kiyamova R.G. Mutations in the gene of human type IIb sodium-phosphate cotransporter SLC34A2. *Biopolymers Cell* 2010;26(1):13–22. DOI: 10.5167/uzh-44008
 60. Lederer E., Wagner C.A. Clinical aspects of the phosphate transporters NaPi-IIa and NaPi-IIb: mutations and disease associations. *Pflugers Arch* 2019;471(1):137–48. DOI: 10.1007/s00424-018-2246-5

61. Izumi H., Kurai J., Kodani M. et al. A novel SLC34A2 mutation in a patient with pulmonary alveolar microlithiasis. *Hum Genome Var* 2017;4(1):16047. DOI: 10.1038/hgv.2016.47
62. Jönsson Å.L.M., Hilberg O., Simonsen U. et al. New insights in the genetic variant spectrum of SLC34A2 in pulmonary alveolar microlithiasis; a systematic review. *Orphanet J Rare Dis* 2023;18(1):130. DOI: 10.1186/s13023-023-02712-7
63. Егшатын Л.В., Мокрышева Н.Г. Эктопическая кальцификация при хронической болезни почек. Ч. 1. Классификация и патогенез. *Нефрология* 2017;21(4):30–9. DOI: 10.24884/1561-6274-2017-21-4-30-39
Egshatyan L.V., Mokrysheva N.G. Ectopic calcification in chronic kidney disease. Part 1. Classification and pathogenesis. *Nefrologiya = Nephrology* 2017;21(4):30–9. (In Russ.). DOI: 10.24884/1561-6274-2017-21-4-30-39
64. Saki F., Kassaee S.R., Salehifar A. et al. Interaction between serum FGF-23 and PTH in renal phosphate excretion, a case-control study in hypoparathyroid patients. *BMC Nephrol* 2020;21(1):176. DOI: 10.1186/s12882-020-01826-5
65. Levin A., Bakris G.L., Molitch M. et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: Results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int* 2007;71(1):31–8. DOI: 10.1038/sj.ki.5002009
66. Kestenbaum B., Sampson J.N., Rudser K.D. et al. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(2):520–8. DOI: 10.1681/ASN.2004070602
67. Ritter C.S., Slatopolsky E. Phosphate toxicity in CKD: the killer among us. *Clin J Am Soc Nephro* 2016;11(6):1088–100. DOI: 10.2215/CJN.11901115
68. Волков М.М., Каюков И.Г., Смирнов А.В. Фосфорно-кальциевый обмен и его регуляция. *Нефрология* 2010;14(1):91–103. Volkov M.M., Kayukov I.G., Smirnov A.V. Phosphorus-calcium metabolism and its regulation. *Nefrologiya = Nephrology* 2010;14(1):91–103. (In Russ.).
69. Cozzolino M., Ketteler M., Wagner C.A. An expert update on novel therapeutic targets for hyperphosphatemia in chronic kidney disease: preclinical and clinical innovations. *Expert Opin Ther Targets* 2020;24(5):477–88. DOI: 10.1080/14728222.2020.1743680
70. Gryshkova V.S., Lituyev D.S., Filonenko V.V. et al. Creation of cellular models for the analysis of sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b, a potential marker for ovarian cancer. *Biopolymers Cell* 2009;25(2):95–100. DOI: 10.5167/uzh-30771
71. Шнейдер О.В., Камилова Т.А., Голота А.С. и др. Биомаркеры и таргетная терапия при раке легких. *Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация* 2021;3(1):74–94. DOI: 10.36425/rehab63268
Schneider O.V., Kamilova T.A., Golota A.S. et al. Biomarkers and targeted therapy for lung cancer. *Fizicheskaya i reabilitacionnaya meditsina, meditsinskaya reabilitaciya = Physical and Rehabilitation Medicine, Medical Rehabilitation* 2021;3(1):74–94. (In Russ.). DOI: 10.36425/rehab63268

Благодарность. Авторы благодарны за инфраструктурную поддержку Программе стратегического академического лидерства ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» («Приоритет-2030»).

Acknowledgement. The authors are grateful for the infrastructural support of the Kazan (Volga Region) Federal University Strategic Academic Leadership Program (“Priority-2030”).

Вклад авторов

Р.Г. Киямова, Л.Ф. Булатова: анализ данных, написание текста статьи, редактирование;

Р.А. Власенкова: анализ *in silico*.

Authors' contributions

R.G. Kiyamova, L.F. Bulatova: data analysis, article writing, editing;

R.A. Vlasenkova: *in silico* analysis.

ORCID авторов / ORCID authors

Р.Г. Киямова / R.G. Kiyamova: <https://orcid.org/0000-0002-2547-2843>

Р.А. Власенкова / R.A. Vlasenkova: <https://orcid.org/0000-0003-0082-6833>

Л.Ф. Булатова / L.F. Bulatova: <https://orcid.org/0000-0001-6696-8477>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (грант № 23-75-01100, <https://rscf.ru/project/23-75-01100/>).

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation grant (grant No. 23-75-01100, <https://rscf.ru/project/23-75-01100/>).

Статья поступила: 01.04.2024. **Принята к публикации:** 13.05.2024.

Article submitted: 01.04.2024. **Accepted for publication:** 13.05.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-85-96>

Гипометилирование *LINE-1* и гиперметилирование *HIST1H4F* как онкомаркеры в жидкостной биопсии колоректального рака

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

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

Контакты: Анатолий Владимирович Лихтенштейн alicht@mail.ru

Введение. Локальное гиперметилирование промоторов уникальных генов и глобальное гипометилирование генома – хорошо известные проявления ассоциированного с канцерогенезом aberrантного метилирования. Мы исследовали этот феномен в качестве возможного диагностического маркера для жидкостной биопсии колоректального рака, используя оригинальный метод количественного анализа плавления гибридов ДНК-зонд (quantitative DNA melting analysis with hybridization probes, qDMA-HP).

Цель исследования – количественная оценка метилирования гена *HIST1H4F* и транспозона *LINE-1* в циркулирующей ДНК плазмы крови больных колоректальным раком.

Материалы и методы. Проанализированы обработанные бисульфитом образцы ДНК, выделенные из плазмы крови здоровых доноров и онкологических больных. Метилирование *HIST1H4F* оценивали с помощью асимметричной полимеразной цепной реакции с гибридизуемым зондом и плавлением гибридов ампликон/зонд после завершения амплификации. Для тестирования многократно повторяющихся и характеризующихся выраженным полиморфизмом последовательностей *LINE-1* использовали асимметричную полимеразную цепную реакцию с гибридизуемым зондом и интеркалирующим красителем SYBR Green, после чего плавили гибриды и анализировали многокомпонентные профили плавления.

Результаты. Показана высокая диагностическая эффективность панели маркеров *LINE-1* и *HIST1H4F* в жидкостной биопсии колоректального рака: площадь под ROC-кривой 0,92; чувствительность 100 %; специфичность 84 %. Перекрестная валидизация подтверждает этот результат. Гиперметилирование *HIST1H4F* и гипометилирование *LINE-1* статистически значимо коррелируют (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,4$; $p = 0,01$).

Заключение. Метод qDMA-HP можно использовать для количественной оценки aberrантного метилирования клинически значимых генов.

Ключевые слова: опухолевый маркер, жидкостная биопсия, колоректальный рак, *HIST1H4F*, *LINE-1*, анализ плавления ДНК

Для цитирования: Кондратова В.Н., Ботезату И.В., Строганова А.М. и др. Гипометилирование *LINE-1* и гиперметилирование *HIST1H4F* как онкомаркеры в жидкостной биопсии колоректального рака. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):85–96.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-85-96>

LINE-1 hypomethylation and *HIST1H4F* hypermethylation as oncomarkers in liquid biopsy of colorectal cancer

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

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

Contacts: Anatoly Vladimirovitch Lichtenstein alicht@mail.ru

Introduction. Local hypermethylation of gene promoters and global genome hypomethylation are well-known manifestations of aberrant methylation associated with carcinogenesis. We investigated this phenomenon as a possible diagnostic marker for liquid biopsy of colorectal cancer using the original quantitative DNA melting analysis with hybridization probes (qDMA-HP) method.

Aim. To quantify the methylation of *HIST1H4F* promoter and *LINE-1* transposon in circulating blood plasma DNA of colorectal cancer patients.

Materials and methods. Bisulfite-treated DNA samples isolated from blood plasma of healthy donors and cancer patients were analyzed. *HIST1H4F* methylation was assessed by asymmetric polymerase chain reaction with hybridized probe and post-amplification melting of probe/amplicon hybrids. To test for repetitive and highly polymorphic *LINE-1* sequences, asymmetric polymerase chain reaction with hybridized probe and SYBR Green intercalating dye was used, followed by melting of hybrids and analysis of multicomponent melt curves.

Results. High diagnostic efficiency of *LINE-1* and *HIST1H4F* methylation markers in liquid biopsy of colorectal cancer was demonstrated with the area under the ROC curve = 0.92, sensitivity – 100 %, specificity – 84 %. Cross validation supports this result. Hypermethylation of *HIST1H4F* and hypomethylation of *LINE-1* are statistically significantly correlated (Spearman correlation coefficient $r = 0.4$; $p = 0.01$).

Conclusion. The qDMA-HP is suitable for quantitative assessment of aberrant methylation of various clinically significant genes.

Keywords: tumor marker, liquid biopsy, colorectal cancer, *HIST1H4F*, *LINE-1*, DNA melting analysis

For citation: Kondratova V.N., Botezatu I.V., Stroganova A.M. et al. *LINE-1* hypomethylation and *HIST1H4F* hypermethylation as oncomarkers in liquid biopsy of colorectal cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(2):85–96. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-85-96>

ВВЕДЕНИЕ

Аберрантное метилирование ДНК – один из эпигенетических механизмов канцерогенеза – включает 2 разнонаправленных процесса: локальное (опухолеспецифическое и тканеспецифическое [1, 2]) гиперметилирование CpG-островков в промоторах уникальных генов и глобальное гипометилирование генома [3–8]. Оба процесса имеют важные функциональные последствия: локальное гиперметилирование промотора подавляет активность прилежащего гена, тогда как глобальное гипометилирование генома активирует последовательности, до недавнего времени относимые к так называемой мусорной ДНК (junk DNA) [9], но играющие большую роль в биологической эволюции [10]: многократные повторы, транспозоны, некодирующие последовательности. В итоге аберрантное метилирование ДНК приводит к дестабилизации генома и нарушениям внутриклеточных сигнальных путей [6, 11–13].

Знания, полученные при исследовании феномена аберрантного метилирования ДНК, транслируются в клиническую медицину и способствуют появлению новых методов диагностики. В частности, растет число эпигенетических онкомаркеров, одни из которых (гиперметилированные CpG-островки) специфически ассоциированы с определенными видами рака [14–17], тогда как другие (гипометилированные многократные повторы *Alu*, *LINE-1*) присущи многим из них [6, 11, 18–21]. Сканирование аберрантно метилированных последовательностей ДНК широко применяется в жидкостной биопсии рака (имеется в виду анализ ДНК плазмы крови) для выявления остаточной болезни, прогноза онкологического заболевания, эволюции опухолевых клонов и мониторинга эффективности терапии [22–27].

В лабораторной практике обычно применяют метод метил-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (ПЦР-РВ) с приме-

нением обработанной бисульфитом ДНК [28–34]. Однако этот метод имеет существенные недостатки: он не учитывает вариабельности паттернов метилирования ДНК и поэтому может количественно преуменьшать данный феномен [35, 36], кроме того, он предполагает проведение трудоемкой процедуры нормализации данных с использованием генов-калибраторов [37, 38].

Разработанный нами метод количественного анализа метилирования ДНК, включающий асимметричную ПЦР с метил-независимыми праймерами, гибридуемые зонды (известные как зонды TaqMan) и постамплификационное плавление гибридов зонд/ампликон [39, 40], лишен указанных недостатков. В рекомендациях Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE) зонды TaqMan именуются гидролизуемыми [41], но в предлагаемом методе они выполняют функцию гибридуемых зондов и обозначаются поэтому соответственно. Ранее мы применяли мультиплексный метод qDMA-HP для анализа аберрантного метилирования двух генов (*SEPT9* и *HIST1H4F*) в жидкостной биопсии колоректального рака. Продемонстрирована высокая диагностическая эффективность предложенного подхода [42, 43].

Цель исследования – оценить на той же когорте больных и тем же методом диагностический потенциал панели, состоящей из принципиально разных маркеров: промотора гена *HIST1H4F*, одного из генов гистонового кластера, универсально гиперметилированного в опухолях разного происхождения [44], и многократно повторяющегося транспозона *LINE-1*, отражающего глобальное гипометилирование генома [6, 11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические образцы. В ретроспективное исследование включены 38 больных колоректальным раком (16 мужчин и 22 женщины), получавших лечение

в клинике Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина, и 18 доноров (10 мужчин и 8 женщин) без выявленной онкологической патологии. Медиана возраста пациентов составила 58 (31–84) лет.

Клиническая характеристика больных колоректальным раком представлена в табл. 1.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов с колоректальным раком, вошедших в исследование

Table 1. Clinical characteristics of patients with colorectal cancer included in the study

Показатель Parameter	Число пациентов, n Number of patients, n
Стадия по классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TNM): Tumor, Nodus and Metastasis (TNM) stage:	
TisN0M0	1
T3N0M0	4
T3N1M1	3
T3N2M0	5
T3N2M1	2
T3NxM0	3
T3NxM1	5
T4N0M1	1
T4N1M0	3
T4N1M1	2
T4N2M0	2
T4N2M1	4
T4NxM1	1
TxNxM1	2
Локализация: Location:	
слепая кишка caecum	1
ободочная кишка colon	23
прямая кишка rectum	14

Для получения плазмы из образцов крови (2–4 мл) использовали метод двойного центрифугирования при комнатной температуре (по 10 мин при 1000g и 16000g); аликвоты плазмы хранили при –60 °C до использования. Ранее на этой когорте больных проведен анализ метилирования коррелирующих маркеров *SEPT9* и *HIST1H4F* [43]. Полученные результаты стимулировали дополнительное, представленное в настоящей работе, исследование контрастирующих маркеров *HIST1H4F* и *LINE-1*.

Выделение ДНК. ДНК выделяли из плазмы крови методом фенол-хлороформной депротеинизации [39] и подвергали бисульфитной конверсии, как описано ранее [42]. Для серийных разведений использовали коммерческий набор метилированной и неметилированной ДНК (EpiTect PCR Human control DNA set, Qiagen, Германия).

Асимметричная полимеразная цепная реакция с гибризируемым зондом и плавление ДНК. Последовательность CpG-островка гена *HIST1H4F* (GenBank Accession number NC_000006) амплифицировали посредством асимметричной ПЦР с гибризируемым зондом (последовательности праймеров и зондов представлены в табл. 2). Зонд HIST1-ROX (24 основания) взаимодействовал с тремя CpG-динуклеотидами (chr6:26240752–26240763, human hg19). Асимметричную ПЦР проводили в 96-луночных планшетах на приборах CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) и QuantStudio 5 (Applied Biosystems, Life Technologies, США). Инкубационная смесь (25 мкл) содержала 50 мМ Трис-НCl; pH 8,8; 50 мМ KCl; 4 мМ MgCl₂; 0,25 мМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата (дНТФ); 0,2 мкМ зонда HIST1-ROX; 0,04 мкМ праймера HIST1-sense; 0,4 мкМ праймера HIST1-antisense; 2,5 ед. Hot-rescue Taq-полимеразы («Синтол», Россия); 3 мкл раствора ДНК. Условия ПЦР: начальная денатурация – 5 мин при 95 °C; 55 циклов по 13 с при 95 °C, 40 с при 58 °C, 30 с при 72 °C (с регистрацией флуоресценции). Плавление гибридов зонд/ампликон: денатурация – 1 мин при 95 °C, ренатурация – 2 мин при 52 °C, плавление – от 35 до 75 °C (инкремент 0,4 °C, выдержка 6 с, скорость нагревания 3,3 °C/с).

Ампликон *LINE-1* (GenBank Accession number X52235) амплифицировали с помощью асимметричной ПЦР с зондом LINE-1-ROX (27 оснований; табл. 2), взаимодействующим с тремя CpG-динуклеотидами. Инкубационная смесь (25 мкл) содержала 50 мМ Трис-НCl; pH 8,8; 50 мМ KCl; 4 мМ MgCl₂; 0,25 мМ каждого дНТФ; 0,1 мкМ зонда LINE-1-ROX; SYBR Green I (1:20000); 0,04 мкМ праймера LINE-1-sense; 0,8 мкМ праймера LINE-1-antisense; 1 ед. Hot-rescue Taq-полимеразы («Синтол», Россия); 3 мкл раствора ДНК. Условия ПЦР: начальная денатурация – 10 мин при 95 °C; 40 циклов по 20 с при 95 °C, 20 с при 54 °C, 20 с при 72 °C (с регистрацией флуоресценции). Плавление дуплексов зонд/ампликон: денатурация – 1 мин при 95 °C, ренатурация – 2 мин при 40 °C, плавление – от до 95 °C (инкремент 0,3 °C, выдержка 20 с).

Для построения графиков и количественных расчетов отрицательные первые производные кривых плавления ($-d(RFU)/dt$) экспортировали в Excel. Для аппроксимации экспериментальной кривой гауссовыми пиками и определения их площадей использовали программу PeakFit (v.4.12.00; SeaSolve Software Inc., США), как описано ранее [39, 40].

Статистический анализ. Анализ проводили с помощью GraphPad Prism 9.3.0 (GraphPad Software, США), онлайн-серверов CombiROC [45] и Cutoff Finder [46]. Для сравнения уровня метилирования *HIST1H4F* и *LINE-1* в ДНК плазмы крови здоровых доноров и больных колоректальным раком применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для оценки корреляции между феноменами гиперметилирования *HIST1H4F* и гипометилирования *LINE-1* определяли

коэффициент Спирмена. Все статистические тесты двусторонние; различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 2. Последовательности праймеров и зондов

Table 2. Sequences of primers and probes

Праймер/зонд Primer/probe	Последовательность Sequence
Ампликон HIST1H4F (105 bp) <i>Amplicon HIST1H4F (105 bp)</i>	
Праймер HIST1-sense Primer HIST1-sense	5'-AAAGTGTGAGTG ATAATATATAGGG
Праймер HIST1-antisense Primer HIST1-antisense	5'-AATCTCCTCATAA ATAAAACCC
Зонд HIST1-ROX ^a (sense) Probe HIST1-ROX ^a (sense)	5'-ROX- AAGTTTGTATTGTTGTT TGGTT-BHQ2
Ампликон LINE-1 (100 bp) <i>Amplicon LINE-1 (100 bp)</i>	
Праймер LINE-1-sense Primer LINE-1-sense	5'-TGTTAGATAGTGGG CGTAGGTT
Праймер LINE-1-antisense Primer LINE-1-antisense	5'-ACTCCCTAACCCCTAC
Зонд LINE-1-ROX ^b (sense) Probe LINE-1-ROX ^b (sense)	5'-ROX- CGAGTCGAAGTAGGGC GAGGTATTGTT-BHQ2

^aПоследовательность зонда комплементарна конвертированной (обработанной бисульфитом) неметилированной ДНК.

^bПоследовательность зонда комплементарна конвертированной метилированной ДНК.

^aThe probe sequence is complementary to the converted (bisulfite-treated) unmethylated DNA.

^bThe sequence of the probe is complementary to the converted methylated DNA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Метод количественного анализа плавления гибридов ДНК-зонд [39, 40, 47] основан на том же принципе, что и широко известный метод анализа кривых плавления высокого разрешения (high resolution melting analysis, HRMA) [48–51], а именно на анализе тепловой денатурации двуниевой ДНК как способе выявления дефектов вторичной структуры. Достоинство обоих методов заключается в том, что они реализуются в закрытом формате (т. е. без дополнительных процедур). Это сокращает затраты времени и труда и минимизирует риск взаимного загрязнения клинических образцов. Однако методы HRMA и qDMA-HP различаются. В первом случае для мониторинга плавления ДНК используются интеркалирующие красители (SYBR Green, EvaGreen и др.), а во втором – гибризируемые зонды (олигонуклеотиды с флуорофором и гасителем на концах). Это различие определяет

ключевые особенности данных методов, их достоинства и недостатки. Так, в HRMA флуоресцирующий краситель интеркалирует между основаниями двуникового ампликона, что многократно усиливает его свечение (при плавлении дуплекса флуоресценция возвращается к исходному уровню). Таким образом, большой ампликон, иногда содержащий десятки CpG-динуклеотидов, тестируется целиком, но с относительно невысоким разрешением из-за присутствия неспецифических продуктов амплификации, побочного формирования множества гетеродуплексов, а также слабой выраженности температурных сдвигов, индуцированных в длинных дуплексах одиночными неспаренными основаниями. В свою очередь, qDMA-HP способен зондировать лишь короткие последовательности (20–30 пар оснований), но с высоким разрешением, обусловленным сильным эффектом неспаренных оснований в коротких дуплексах. Этот подход предполагает асимметричный вариант ПЦР для формирования избытка одной из двух нитей ампликона как мишени гибридизационного зондирования. Целью включения в реакционную среду ПЦР наряду с флуоресцентным зондом интеркалирующего красителя SYBR Green был мониторинг амплификации в реальном времени. В предыдущей работе установлено, что даже очень короткий участок aberrантного метилирования (1–4 CpG-динуклеотида) может быть эффективным диагностическим маркером [42, 43]. В данной работе этот подход применен к существенно различающимся объектам: гиперметилированному уникальному гену *HIST1H4F* [44] и гипометилированному многократно повторяющемуся транспозону *LINE-1* [6, 12, 13, 18].

Анализ метилирования *HIST1H4F*. Различия в степени метилирования промотора *HIST1H4F* в циркулирующих ДНК (цДНК) здоровых доноров и больных колоректальным раком (3 образца из каждой группы) представлены на рис. 1. Пики метилированной (ДНК-М+) и неметилированной (ДНК-М-) ДНК характеризуются существенным различием температур плавления (из-за присутствия в ДНК-М+ неспаренных оснований) и хорошо разделены на температурной шкале. Серийные разведения ДНК-М+ в ДНК-М- демонстрируют линейную зависимость измеренной по площади соответствующего пика концентрации метилированного *HIST1H4F* от фактически присутствующей в исследуемом образце (полученное соотношение использовано для коррекции экспериментальных данных) (см. рис. 2). Предел количественного измерения (limit of quantitation), т. е. минимальная концентрация, при которой анализируемое вещество может быть не только обнаружено, но и надежно измерено, составил 12 % метилированного *HIST1H4F* (это наименьшая концентрация, определяемая при коэффициенте вариации (coefficient of variance) менее 20 % [52]).

Метилированный *HIST1H4F* в качестве онкомаркера при колоректальном раке оценивали с помощью

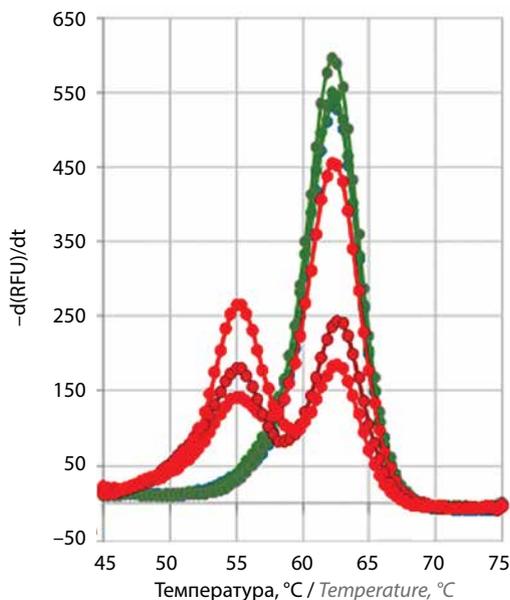


Рис. 1. Пики плавления маркера *HIST1H4F* в обработанной бисульфитом ДНК плазмы крови здоровых доноров (3 образца; отмечены зеленым цветом) и больных колоректальным раком (3 образца; отмечены красным цветом). $-d(RFU)/dt$ — отрицательные первые производные кривых плавления

Fig. 1. Melt peaks of the *HIST1H4F* marker in bisulfite-treated DNA from blood plasma of healthy donors (3 samples in green) and colorectal cancer patients (3 samples in red). $-d(RFU)/dt$ — negative first derivatives of melting curves

предлагаемого нами метода. Различия в уровне метилирования *HIST1H4F* в ДНК плазмы крови здоровых доноров (среднее значение — 8,5 %; стандартное отклонение (standard deviation, SD) — 1,7 %) и онкологических больных (среднее значение — 26,8 %, SD — 20,2 %) статистически значимы ($p = 0,0002$) (рис. 3, а). Результаты ROC-анализа свидетельствуют о диагностической эффективности данного теста: площадь под ROC-кривой (area under ROC curve, AUC) оказалась равна 0,8; диагностические чувствительность и специфичность при избранном пороге метилирования составили соответственно 63 и 100 % (рис. 3, б). Каскадная диаграмма визуализирует правильную и неправильную классификации здоровых доноров и больных колоректальным раком в исследованной когорте (рис. 3, в).

Анализ метилирования *LINE-1* методом qDMA-HP.

Данный анализ сильно осложнен наличием множества повторяющихся последовательностей, составляющих примерно 20 % генома человека [50], и неизбежным присутствием в них полиморфизмов [18]. Последние проявляются неспаренными основаниями в дуплексах зонд/ампликон и формируют при плавлении гетерогенный профиль (рис. 4), скрывающий до некоторой степени искомый эффект метилирования (см. рис. 1). Кроме того, согласно данным литературы, величина ассоциированного с канцерогенезом эффекта

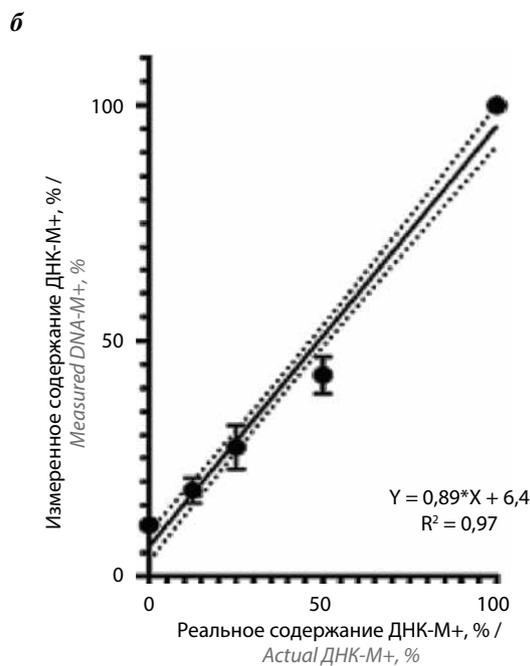
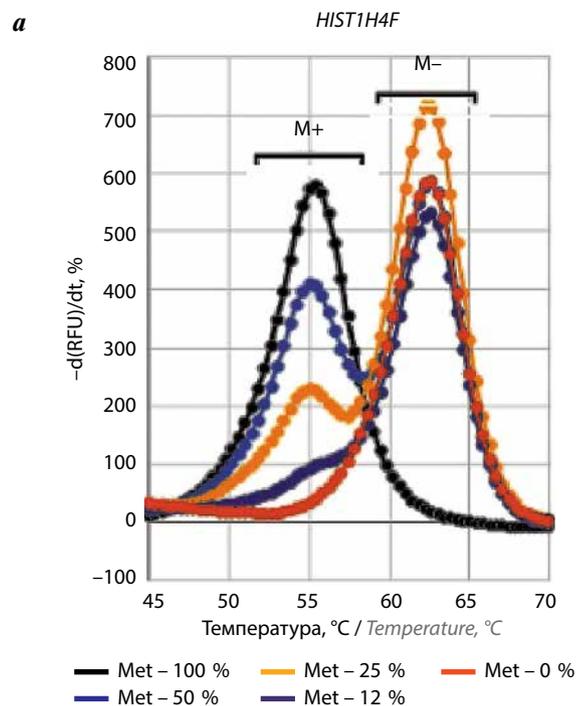


Рис. 2. Серийные разведения ДНК-М+ (конечные концентрации 100; 50; 25; 12,5; 0 %) в ДНК-М-: а — пики плавления ДНК-М+ и ДНК-М-. Графики плавления, отражающие разные концентрации метилированной ДНК (Met %), обозначены линиями разного цвета; б — линейная регрессия фактической и измеренной концентраций ДНК-М+. Планки погрешностей — средние значения с 95 % доверительными интервалами

Fig. 2. Serial dilutions of DNA-M+ (final concentrations 100; 50; 25; 12.5; 0 %) in DNA-M-: а — melt peaks of DNA-M+ and DNA-M-. Melt curves showing different concentrations of methylated DNA (Met %) are indicated by lines of different colors; б — linear regression of actual and measured DNA-M+ concentrations. Error bars are means with 95 % confidence intervals

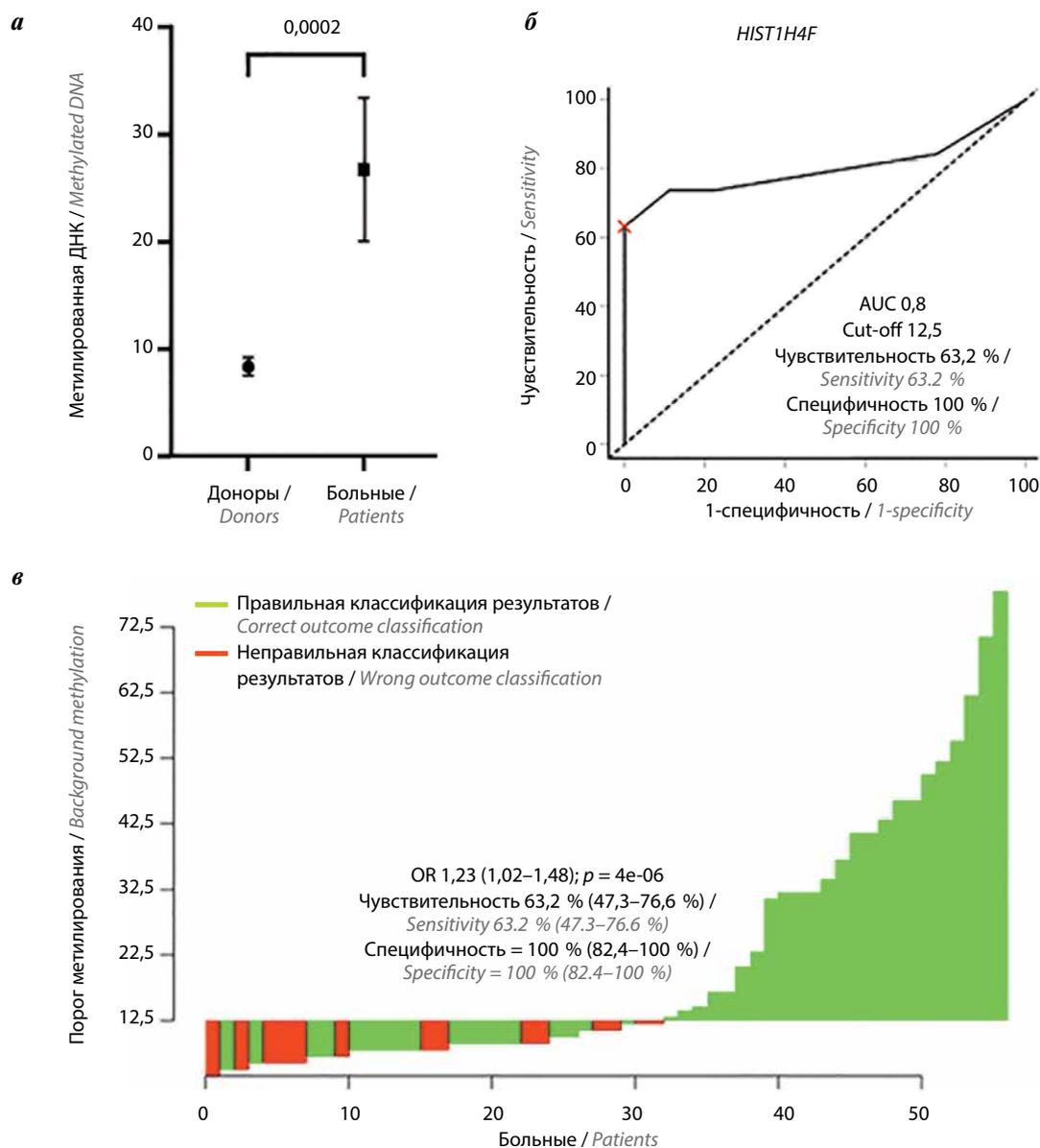


Рис. 3. Диагностическая эффективность *HIST1H4F* в жидкостной биопсии колоректального рака: *а* – сравнение уровней метилирования *HIST1H4F* в циркулирующих ДНК здоровых доноров и пациентов с колоректальным раком (непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни, планки погрешностей – средние значения с 95 % доверительным интервалом); *б* – результаты ROC-анализа; *в* – каскадная диаграмма, иллюстрирующая правильную и неправильную классификации здоровых доноров и пациентов с колоректальным раком в исследованной когорте. AUC – площадь под ROC-кривой; cut-off – порог метилирования; OR – отношение шансов

Fig. 3. Diagnostic performance of *HIST1H4F* in liquid biopsy of colorectal cancer: *a* – comparison of *HIST1H4F* methylation levels in circulating DNA of healthy donors and colorectal cancer patients (nonparametric Mann–Whitney *U* test; error bars are mean with 95 % confidence interval); *b* – ROC analysis results; *c* – waterfall chart illustrating correct and incorrect outcome classification of healthy donors and colorectal cancer patients in the studied cohort. AUC – area under ROC curve; cut-off – background methylation; OR – odds ratio

деметилирования генома относительно невелика: примерно 6 % при суммарном сравнении нормальных и опухолевых тканей [11] и примерно 20 % в случае колоректального рака (от 76 % метилирования в нормальной слизистой до 56 % – в опухолевой) [53]. Тем не менее предварительное сопоставление кривых плавления *LINE-1* в плазме крови здоровых доноров и онкологических больных (3 образца из каждой группы) показало увеличение фракции неметилированной ДНК у пациентов с колоректальным раком (рис. 5) и стимулировало дальнейшее сравнительное исследование.

Применение qDMA-HP для оценки серийных разведений ДНК-М+ в ДНК-М– демонстрирует линейную зависимость измеренной концентрации ДНК-М– от концентрации, фактически присутствующей в исследуемом образце (рис. 6). Степень деметилирования *LINE-1* в цДНК больных колоректальным раком оценивали с помощью определения процентного содержания фракции ДНК-М– в температурном интервале 46–58 °С. Обнаружено, что уровень неметилированных последовательностей *LINE-1* в цДНК статистически значимо ($p < 0,0001$) выше у онкологических больных (среднее

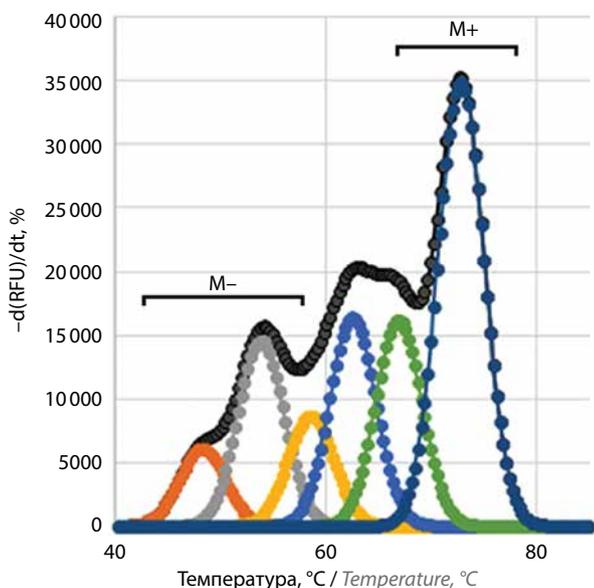


Рис. 4. Пики плавления маркера LINE-1 в обработанной бисульфитом ДНК плазмы крови здорового донора. Экспериментальная кривая аппроксимирована 6 гауссовыми пиками. Позиции метилированных (M+) и неметилированных (M-) LINE-1 обозначены на рисунке скобками. Промежуточные пики предположительно обусловлены однонуклеотидными полиморфизмами в многократно повторяющихся последовательностях

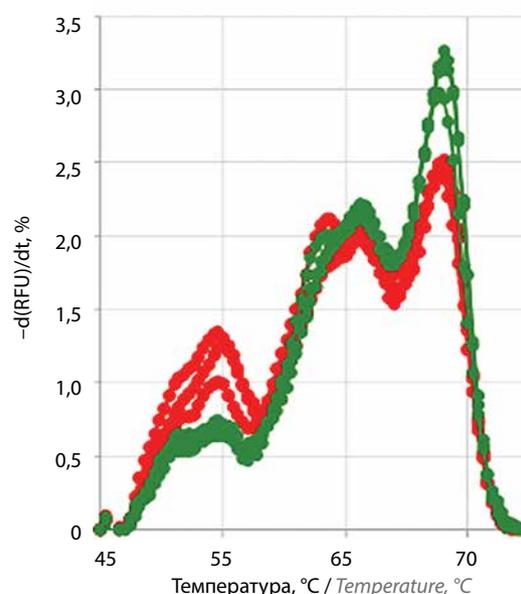


Рис. 5. Пики плавления маркера LINE-1 в обработанной бисульфитом ДНК плазмы крови здоровых доноров (3 образца; помечены зеленым цветом) и больных колоректальным раком (3 образца; помечены красным цветом)

Fig. 5. Melt peaks of the LINE-1 marker in bisulfite-treated DNA from blood plasma of healthy donors (3 samples in green) and colorectal cancer patients (3 samples in red)

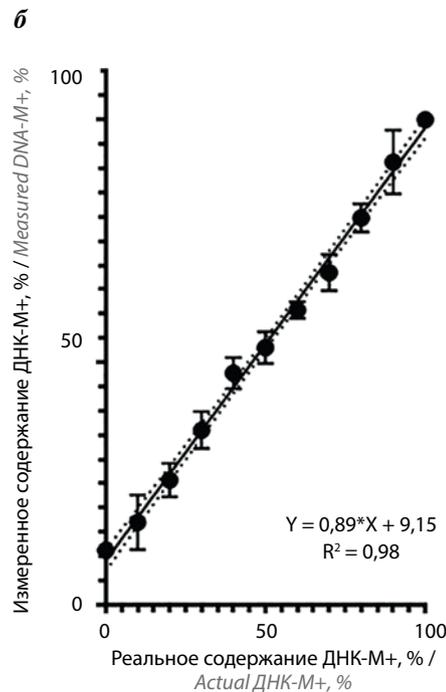
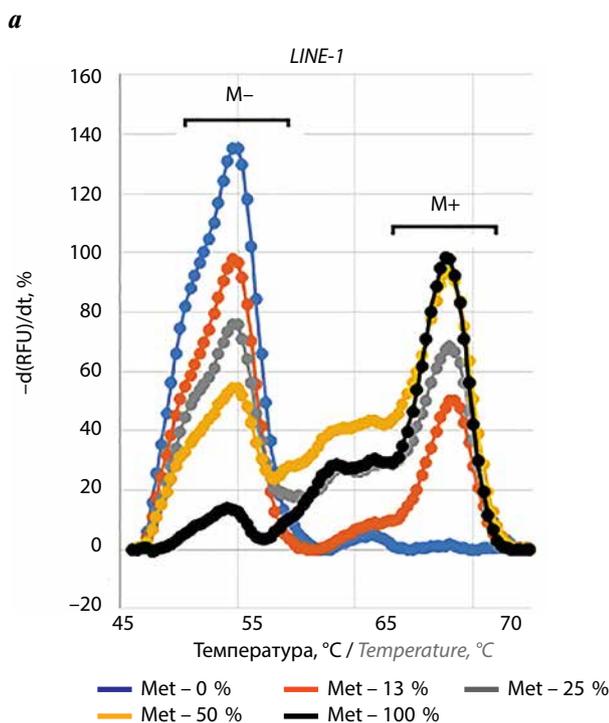


Рис. 6. Серийные разведения ДНК-M+ (конечные концентрации 100; 50; 25; 12,5; 0 %) в ДНК-M-: а – пики плавления ДНК-M+ и ДНК-M-. Графики плавления, отражающие разные концентрации метилированной ДНК (Met %), обозначены линиями разного цвета; б – линейная регрессия фактической и измеренной концентраций ДНК-M+. Планки погрешностей – средние значения с 95 % доверительными интервалами

Fig. 6. Serial dilutions of DNA-M+ (final concentrations 100; 50; 25; 12.5; 0 %) in DNA-M-: а – melt peaks of DNA-M+ and DNA-M-; melt curves showing different concentrations of methylated DNA (Met %) are indicated by lines of different colors; б – linear regression of actual and measured DNA-M+ concentrations. Error bars are means with 95 % confidence intervals

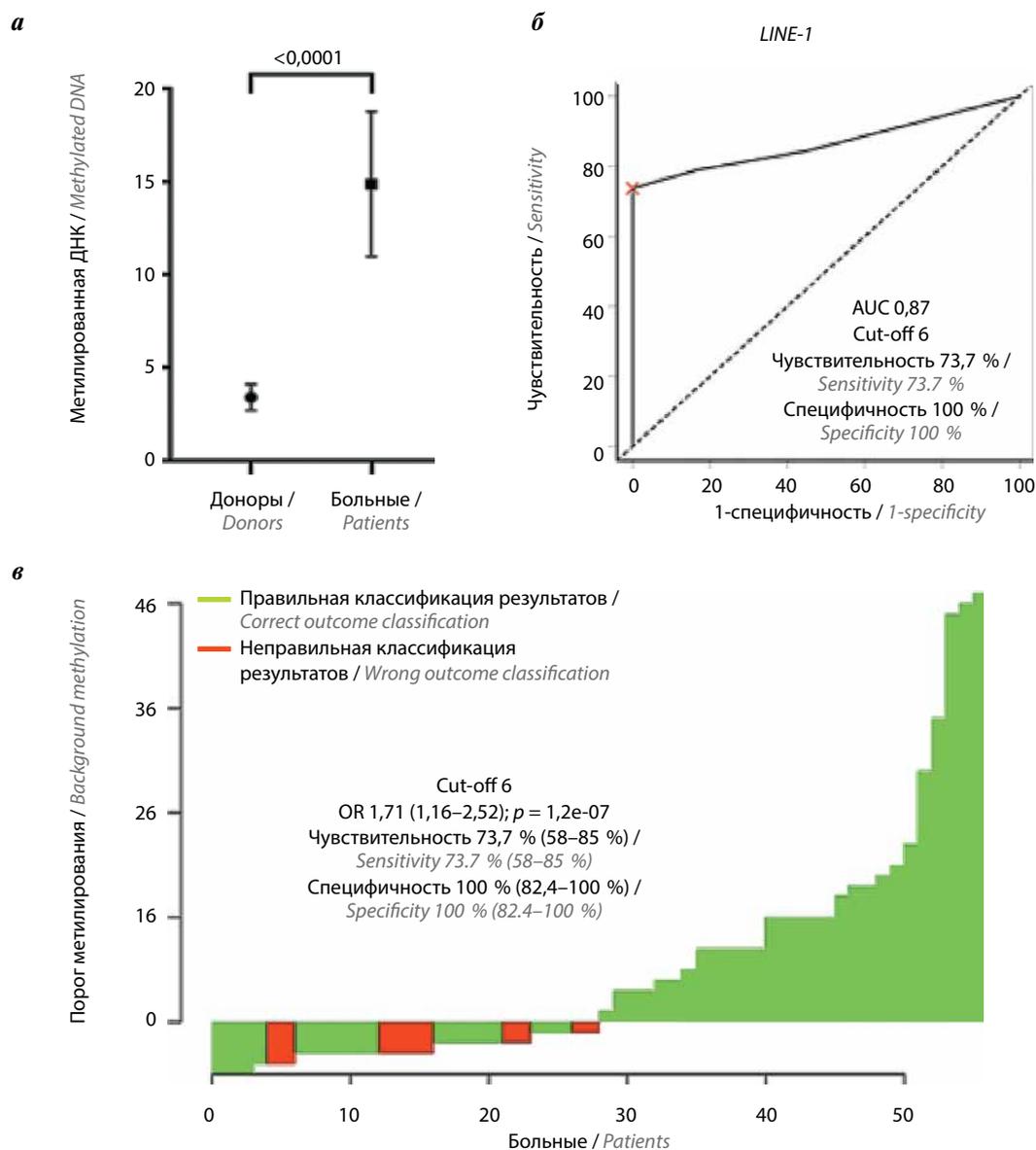


Рис. 7. Диагностическая эффективность *LINE-1* в жидкостной биопсии колоректального рака: *а* – сравнение уровней метилирования *LINE-1* в циркулирующих ДНК здоровых доноров и пациентов с колоректальным раком (непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни, планки погрешностей – средние значения с 95 % доверительным интервалом); *б* – ROC-анализ (площадь под ROC-кривой (AUC) 0,87; чувствительность 74 %; специфичность 100 %); *в* – каскадная диаграмма, иллюстрирующая правильную и неправильную классификации здоровых доноров и больных в исследованной когорте. Cut-off – порог метилирования; OR – отношение шансов

Fig. 7. Diagnostic performance of *LINE-1* in liquid biopsy of colorectal cancer: *a* – comparison of *LINE-1* methylation levels in circulating DNA of healthy donors and colorectal cancer patients (nonparametric Mann–Whitney *U* test; error bars are mean with 95 % confidence interval); *b* – ROC analysis (area under ROC curve (AUC) 0.87; sensitivity 74 %; specificity 100 %); *v* – waterfall chart illustrating correct and incorrect outcome classification of healthy donors and patients in the studied cohort. Cut-off – background methylation; OR – odds ratio

значение – 14,9 %, SD – 11,9 %), чем у здоровых доноров (среднее значение – 3,4 %, SD – 1,5 %) (рис. 7, *а*). Результаты ROC-анализа (AUC = 0,87; чувствительность – 74 %; специфичность – 100 %) (рис. 7, *б*, *в*), согласуются с предположением о диагностической значимости феномена деметилирования *LINE-1* у больных колоректальным раком [12, 21, 54–56].

Оценка панели маркеров *HIST1H4F* и *LINE-1*. Между феноменами гиперметилирования *HIST1H4F* и гипометилирования *LINE-1* в ДНК колоректального рака обнаружена статистически значимая корреляция (коэф-

фициент Спирмена $r = 0,4$; $p = 0,01$) (рис. 8), что соответствует данным литературы [23, 57–60].

Исходя из того, что панель нескольких маркеров эффективнее одиночных [26], полученные данные подвергли CombiROC-анализу, позволяющему оценить оптимальную комбинацию [45]. На рис. 9 и в табл. 3 представлены результаты, свидетельствующие о высокой диагностической эффективности исследуемой панели как изначально, так и после 10-кратной перекрестной валидации (AUC >0,9; чувствительность 100 %; специфичность 84 %).

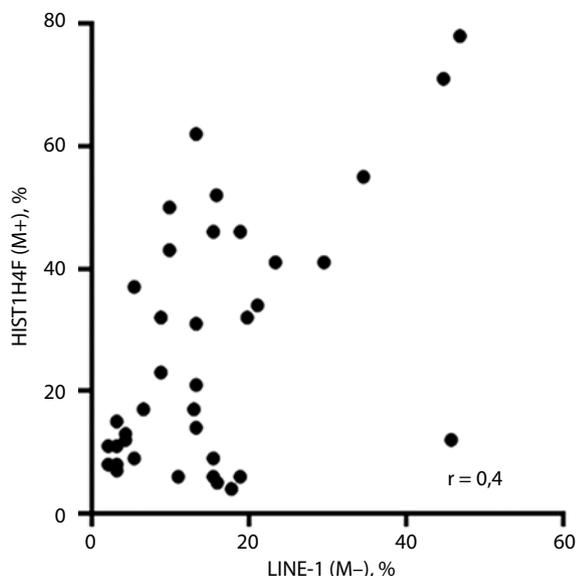


Рис. 8. Корреляция между гиперметилированием *HIST1H4F* (M+) и гипометилированием *LINE-1* (M-) в циркулирующей ДНК плазмы крови больных колоректальным раком (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,4$)

Fig. 8. Correlation between hypermethylation of *HIST1H4F* (M+) and hypomethylation of *LINE-1* (M-) in circulating DNA of colorectal cancer patients (Spearman rank correlation coefficient $r = 0.4$)

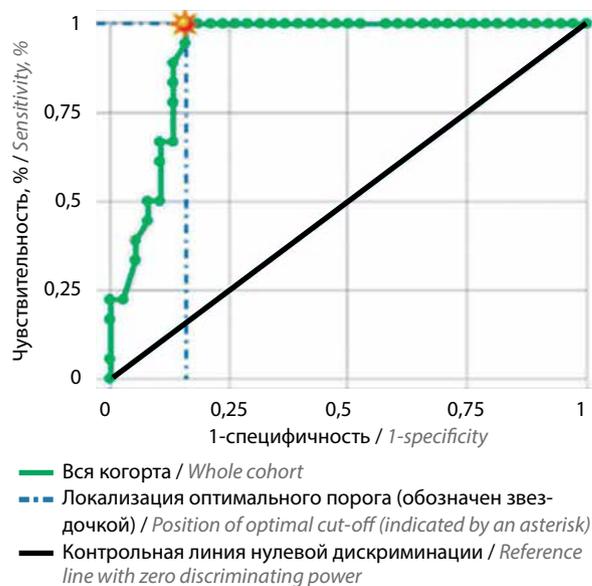


Рис. 9. Диагностическая эффективность метода количественного анализа плавления гибридов ДНК-зонд с использованием панели *HIST1H4F* и *LINE-1*. Результаты CombiROC-анализа

Fig. 9. Diagnostic performance of quantitative DNA melting analysis with hybridization probes using *HIST1H4F* and *LINE-1* panel. The results of CombiROC analysis

Таблица 3. CombiROC-анализ диагностической эффективности панели *HIST1H4F* и *LINE-1* в жидкостной биопсии колоректального рака

Table 3. Combi ROC-analysis of the diagnostic effectiveness of *HIST1H4F* and *LINE-1* panels in liquid biopsy of colorectal cancer

Показатель Parameter	Вся когорта Whole cohort	Десятикратная перекрестная валидизация 10-fold cross-validation
Площадь под ROC-кривой Area under ROC curve	0,921	0,904
Чувствительность, % Sensitivity, %	100	100
Специфичность, % Specificity, %	84,2	84,2

ОБСУЖДЕНИЕ

Многokrратно повторяющиеся диспергированные короткие элементы *Alu* (размер 282 п. о.) и длинные элементы *LINE-1* (размер до 6000 п. о.) составляют значительную часть гаплоидного генома человека (~1 млн копий, ~10 % генома и ~0,5 млн копий, ~20 % генома соответственно) [18] и содержат CpG-динуклеотиды, которые в нормальных соматических клетках метилированы на 80–90 % [61]. В опухолевых тканях повторы *LINE-1* часто деметилированы (в среднем на ~6,5 %, хотя этот показатель варьирует в зависимости от типа опухоли) [62]. Метилирование *Alu* и *LINE-1* коррелирует

с глобальным метилированием генома и может служить суррогатным маркером этого феномена [6, 18, 62].

Исследование многократных повторов методом qDMA-HP осложнено присутствием в них полиморфизмов, имитирующих феномен метилирования CpG-динуклеотидов. По этой причине наша попытка использовать в качестве суррогатного маркера геномного гипометилирования повторы *Alu* оказалась безуспешной (здесь не представлено). В меньшей степени полиморфизмы препятствовали анализу повторов *LINE-1*. Это позволило обнаружить у больных колоректальным раком статистически значимое увеличение их неметилированной фракции, что согласуется с результатами других исследований [2, 21, 26]. Обнаружена невысокая корреляция гипометилирования *LINE-1* с гиперметилированием *HIST1H4F*. Однако с учетом того, что значительный, если не основной, вклад в цДНК плазмы крови вносят нормальные клетки, истинная корреляция этих феноменов (т. е. в самой опухолевой ткани) может быть значительно выше.

Таким образом, предлагаемый метод сканирования aberrантного метилирования клинически значимых генов может быть использован в практической медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективное применение qDMA-HP в жидкостной биопсии колоректального рака свидетельствует о возможности внедрения этого простого мультиплексного, не требующего нормализации и реализуемого в закрытом формате метода в клиническую практику.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Costello J.F., Fruhwald M.C., Smiraglia D.J. et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000;24(2):132–8. DOI: 10.1038/72785
- Chalitchagorn K., Shuangshoti S., Hourpai N. et al. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene* 2004;23(54):8841–6. DOI: 10.1038/sj.onc.1208137
- Лихтенштейн А.В., Киселева Н.П. Метилирование ДНК и канцерогенез. *Биохимия* 2001;66(3):235–55. DOI: 10.1023/a:1010249510906
Lichtenstein A.V., Kiseljova N.P. DNA methylation and carcinogenesis. *Biokhimiya = Biochemistry* 2001;66(3):235–55. (In Russ.). DOI: 10.1023/a:1010249510906
- Залетаев Д.В., Немцова М.В., Бочков Н.П. Метилирование ДНК как этиологический фактор канцерогенеза. *Вестник Российской академии медицинских наук* 2002;6–11. Zaletaev D.V., Nemtsova M.V., Bochkov N.P. DNA methylation as an etiologic factor in carcinogenesis. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences* 2002;6–11. (In Russ.).
- Robertson K.D. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005;6(8):597–610. DOI: 10.1038/nrg1655
- Ross J.P., Rand K.N., Molloy P.L. Hypomethylation of repeated DNA sequences in cancer. *Epigenomics* 2010;2(2):245–69. DOI: 10.2217/epi.10.2
- Немцова М.В., Михайленко Д.С., Кузнецова Е.Б. и др. Инактивация эпигенетических регуляторов вследствие мутаций в солидных опухолях. *Биохимия* 2020;85(7):735–48. DOI: 10.1134/S0006297920070020
Nemtsova M.V., Mikhaylenko D.S., Kuznetsova E.B. et al. Inactivation of epigenetic regulators due to mutations in solid tumors. *Biochemistry (Mosc)* 2020;85(7):735–48. (In Russ.). DOI: 10.1134/S0006297920070020
- Estecio M.R., Gharibyan V., Shen L. et al. LINE-1 hypomethylation in cancer is highly variable and inversely correlated with microsatellite instability. *PLoS One* 2007;2(5):e399. DOI: 10.1371/journal.pone.0000399
- Ohno S. So much “junk” DNA in our genome. *Brookhaven Symp Biol* 1972;23:366–70.
- Fedoroff N.V. Transposable elements, epigenetics, and genome evolution. *Science* 2012;338(6108):758–67. DOI: 10.1126/science.338.6108.758
- Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Gervas P.A. et al. Aberrant methylation of LINE-1 transposable elements: a search for cancer biomarkers. *Cells* 2020;9(9):2017. DOI: 10.3390/cells9092017
- Cajuso T., Sulo P., Tanskanen T. et al. Retrotransposon insertions can initiate colorectal cancer and are associated with poor survival. *Nat Commun* 2019;10:4022. DOI: 10.1038/s41467-019-11770-0
- Rodriguez-Martin B., Alvarez E.G., Baez-Ortega A. et al. Pan-cancer analysis of whole genomes identifies driver rearrangements promoted by LINE-1 retrotransposition. *Nat Genet* 2020;52(3):306–19. DOI: 10.1038/s41588-019-0562-0
- Bouras E., Karakioulaki M., Bougioukas K.I. et al. Gene promoter methylation and cancer: an umbrella review. *Gene* 2019;710:333–40. DOI: 10.1016/j.gene.2019.06.023
- Markou A., Londra D., Tserpeli V. et al. DNA methylation analysis of tumor suppressor genes in liquid biopsy components of early stage NSCLC: a promising tool for early detection. *Clin Epigenetics* 2022;14(1):61. DOI: 10.1186/s13148-022-01283-x
- Yang J., Wang Q., Zhang Z.Y. et al. DNA methylation-based epigenetic signatures predict somatic genomic alterations in gliomas. *Nat Commun* 2022;13:4410. DOI: 10.1038/s41467-022-31827-x
- Yang X., Wen X., Guo Q. et al. Predicting disease-free survival in colorectal cancer by circulating tumor DNA methylation markers. *Clin Epigenetics* 2022;14:160. DOI: 10.1186/s13148-022-01383-8
- Weisenberger D.J., Campan M., Long T.I. et al. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res* 2005;33(21):6823–36. DOI: 10.1093/nar/gki987
- Piskareva O., Lackington W., Lemass D. et al. The human L1 element: a potential biomarker in cancer prognosis, current status and future directions. *Curr Mol Med* 2011;11(4):286–303. DOI: 10.2174/156652411795677954
- Kitkumthorn N., Mutirangura A. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. *Clin Epigenetics* 2011;2(2):315–30. DOI: 10.1007/s13148-011-0032-8
- Nagai Y., Sunami E., Yamamoto Y. et al. LINE-1 hypomethylation status of circulating cell-free DNA in plasma as a biomarker for colorectal cancer. *Oncotarget* 2017;8(7):11906–16. DOI: 10.18632/oncotarget.14439
- Gainetdinov I.V., Kapitskaya K.Y., Rykova E.Y. et al. Hypomethylation of human-specific family of LINE-1 retrotransposons in circulating DNA of lung cancer patients. *Lung Cancer* 2016;99:127–30. DOI: 10.1016/j.lungcan.2016.07.005
- Liu Z.J., Huang Y., Wei L. et al. Combination of LINE-1 hypomethylation and RASSF1A promoter hypermethylation in serum DNA is a non-invasion prognostic biomarker for early recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Neoplasma* 2017;64(5):795–802. DOI: 10.4149/neo_2017_519
- Serrano M.J., Garrido-Navas M.C., Diaz Mochon J.J. et al. Precision prevention and cancer interception: the new challenges of liquid biopsy. *Cancer Discov* 2020;10(11):1635. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-0466
- Cescon D.W., Bratman S.V., Chan S.M. et al. Circulating tumor DNA and liquid biopsy in oncology. *Nat Cancer* 2020;1(3):276–90. DOI: 10.1038/s43018-020-0043-5
- Nassar F.J., Msheik Z.S., Nasr R.R. et al. Methylated circulating tumor DNA as a biomarker for colorectal cancer diagnosis, prognosis, and prediction. *Clin Epigenetics* 2021;13(1):111. DOI: 10.1186/s13148-021-01095-5
- Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Azhikina T.L. et al. Long interspersed nuclear element-1 methylation status in the circulating DNA from blood of patients with malignant and chronic inflammatory lung diseases. *Eur J Cancer Prev* 2021;30(2):127–31. DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000601
- Quillien V., Lavenu A., Karayan-Tapon L. et al. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer* 2012;118(17):4201–11. DOI: 10.1002/ncr.27392
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 2001;25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- de Vos L., Gevensleben H., Schrock A. et al. Comparison of quantification algorithms for circulating cell-free DNA methylation biomarkers in blood plasma from cancer patients. *Clin Epigenetics* 2017;9:125. DOI: 10.1186/s13148-017-0425-4
- Dietrich D., Hasinger O., Liebenberg V. et al. DNA methylation of the homeobox genes PITX2 and SHOX2 predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients. *Diagn Mol Pathol* 2012;21(2):93–104. DOI: 10.1097/PDM.0b013e318240503b
- Dietrich D., Hasinger O., Banez L.L. et al. Development and clinical validation of a real-time PCR assay for PITX2 DNA methylation to predict prostate-specific antigen recurrence

- in prostate cancer patients following radical prostatectomy. *J Mol Diagn* 2013;15(2):270–9. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2012.11.002
33. Dietrich D., Jung M., Puetzer S. et al. Diagnostic and prognostic value of SHOX2 and SEPT9 DNA methylation and cytology in benign, paramalignant and malignant pleural effusions. *PLoS One* 2013;8(12):e84225. DOI: 10.1371/journal.pone.0084225
 34. Grutzmann R., Molnar B., Pilarsky C. et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS One* 2008;3(11):e3759. DOI: 10.1371/journal.pone.0003759
 35. Warnecke P.M., Stirzaker C., Melki J.R. et al. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res* 1997;25(21):4422–6. DOI: 10.1093/nar/25.21.4422
 36. Korshunova Y., Maloney R.K., Lakey N. et al. Massively parallel bisulphite pyrosequencing reveals the molecular complexity of breast cancer-associated cytosine-methylation patterns obtained from tissue and serum DNA. *Genome Res* 2008;18(1):19–29. DOI: 10.1101/gr.6883307
 37. Egger G., Wielscher M., Pulverer W. et al. DNA methylation testing and marker validation using PCR: diagnostic applications. *Exp Rev Mol Diagn* 2012;12(1):75–92. DOI: 10.1586/erm.11.90
 38. Pharo H.D., Andresen K., Berg K.C.G. et al. A robust internal control for high-precision DNA methylation analyses by droplet digital PCR. *Clin Epigenetics* 2018;10:24. DOI: 10.1186/s13148-018-0456-5
 39. Botezatu I.V., Kondratova V.N., Shelepov V.P. et al. Asymmetric mutant-enriched polymerase chain reaction and quantitative DNA melting analysis of KRAS mutation in colorectal cancer. *Anal Biochem* 2020;590:1–9. DOI: 10.1016/j.ab.2019.113517
 40. Kondratova V.N., Botezatu I.V., Shelepov V.P. et al. SLAM-MS: mutation scanning of stem-loop amplicons with TaqMan probes by quantitative DNA melting analysis. *Sci Rep* 2020;10(1):5476. DOI: 10.1038/s41598-020-62173-x
 41. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55(4):611–22. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797
 42. Ботезату И.В., Кондратова В.Н., Строганова А.М. и др. Жидкостная биопсия колоректального рака: новый подход к оценке aberrантного метилирования гена *SEPT9*. *Успехи молекулярной онкологии* 2021;8(4):53–60. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-53-60
 - Botezatu I.V., Kondratova V.N., Stroganova A.M. et al. Liquid biopsy of colorectal cancer: a new approach to evaluation of aberrant methylation of the *SEPT9* gene. *Uspekhii molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2021;8(4):53–60. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-53-60
 43. Botezatu I.V., Kondratova V.N., Stroganova A.M. et al. Aberrant methylation scanning by quantitative DNA melting analysis with hybridization probes as exemplified by liquid biopsy of SEPT9 and HIST1H4F in colorectal cancer. *Clinica Chimica Acta* 2023;551:117591. DOI: 10.1016/j.cca.2023.117591
 44. Dong S.H., Li W., Wang L. et al. Histone-related genes are hypermethylated in lung cancer and hypermethylated HIST1H4F could serve as a pan-cancer biomarker. *Cancer Res* 2019;79(24):6101–12. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1019
 45. Mazzara S., Rossi R.L., Grifantini R. et al. CombiROC: an interactive web tool for selecting accurate marker combinations of omics data. *Sci Rep* 2017;7:45477. DOI: 10.1038/srep45477
 46. Budczies J., Klauschen F., Sinn B.V. et al. Cutoff finder: a comprehensive and straightforward web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* 2012;7(12):e51862. DOI: 10.1371/journal.pone.0051862
 47. Huang Q., Liu Z., Liao Y. et al. Multiplex fluorescence melting curve analysis for mutation detection with dual-labeled, self-quenched probes. *PLoS One* 2011;6(4):e19206. DOI: 10.1371/journal.pone.0019206
 48. Wittwer C.T. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat* 2009;30(6):857–9. DOI: 10.1002/humu.20951
 49. Erali M., Wittwer C.T. High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods* 2010;50(4):250–61. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.01.013
 50. Tse M.Y., Ashbury J.E., Zwingerman N. et al. A refined, rapid and reproducible high resolution melt (HRM)-based method suitable for quantification of global LINE-1 repetitive element methylation. *BMC Res Notes* 2011;4:565. DOI: 10.1186/1756-0500-4-565
 51. Stanzer S., Balic M., Strutz J. et al. Rapid and reliable detection of LINE-1 hypomethylation using high-resolution melting analysis. *Clin Biochem* 2010;43(18):1443–8. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2010.09.013
 52. Armbruster D.A., Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev* 2008;29(Suppl. 1):S49–52.
 53. Antelo M., Balaguer F., Shia J. et al. A high degree of LINE-1 hypomethylation is a unique feature of early-onset colorectal cancer. *PLoS One* 2012;7(9):e45357. DOI: 10.1371/journal.pone.0045357
 54. Akimoto N., Zhao M., Ugai T. et al. Tumor long interspersed nucleotide element-1 (LINE-1) hypomethylation in relation to age of colorectal cancer diagnosis and prognosis. *Cancers* 2021;13(9):2016. DOI: 10.3390/cancers13092016
 55. Debernardi C., Libera L., Berrino E. et al. Evaluation of global and intragenic hypomethylation in colorectal adenomas improves patient stratification and colorectal cancer risk prediction. *Clin Epigenetics* 2021;13(1):154. DOI: 10.1186/s13148-021-01135-0
 56. Iacopetta B., Grieco F.F., Phillips M.F. et al. Methylation levels of LINE-1 repeats and CpG island loci are inversely related in normal colonic mucosa. *Cancer Sci* 2007;98(9):1454–60. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00548.x
 57. Ren J., Cui J.P., Luo M. et al. The prevalence and persistence of aberrant promoter DNA methylation in benzene-exposed Chinese workers. *PLoS One* 2019;14(8):e0220500. DOI: 10.1371/journal.pone.0220500
 58. Sahnane N., Magnoli F., Bernasconi B. et al. Aberrant DNA methylation profiles of inherited and sporadic colorectal cancer. *Clin Epigenetics* 2015;7:131. DOI: 10.1186/s13148-015-0165-2
 59. Stefanoli M., La R.S., Sahnane N. et al. Prognostic relevance of aberrant DNA methylation in g1 and g2 pancreatic neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology* 2014;100(1):26–34. DOI: 10.1159/000365449
 60. Ogino S., Kawasaki T., Nosho K. et al. LINE-1 hypomethylation is inversely associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2008;122(12):2767–73. DOI: 10.1002/ijc.23470
 61. Yang A.S., Estéicio M.R.H., Doshi K. et al. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 2004;32(3):e38–8. DOI: 10.1093/nar/gnh032
 62. Barchitta M., Quattrocchi A., Maugeri A. et al. LINE-1 hypomethylation in blood and tissue samples as an epigenetic marker for cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014;9(10):e109478. DOI: 10.1371/journal.pone.0109478

Вклад авторов

В.Н. Кондратова, И.В. Ботезату: разработка дизайна исследования, проведение экспериментов;
А.М. Строганова, С.Л. Дранко: получение и характеристика клинических образцов;
А.В. Лихтенштейн: разработка концепции исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions

V.N. Kondratova, I.V. Botezatu: research design development, conducting experiments;
A.M. Stroganova, S.L. Dranko: obtaining and characterization of clinical samples;
A.V. Lichtenstein: research concept, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование финансируется в рамках государственной темы (регистрационный № 122022100090-1).

Funding. The research is funded within the framework of the state budget theme (No. 122022100090-1).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

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

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.

Статья поступила: 29.12.2023. **Принята к публикации:** 18.03.2024.

Article submitted: 29.12.2023. **Accepted for publication:** 18.03.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-97-105>

Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на формирование фенотипа опухолевых стволовых клеток рака легкого и толстой кишки человека

М.В. Васильева¹, Н.В. Хромова¹, С.В. Бойчук²⁻⁴, П.Б. Копнин¹

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

²ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 49;

³Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18;

⁴ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Контакты: Павел Борисович Копнин pbkopnin@mail.ru

Введение. Рак легкого и колоректальный рак являются одними из самых распространенных типов злокачественных новообразований, характеризующихся неблагоприятным прогнозом. Опухолевая прогрессия обусловливается aberrантной активностью межклеточных сигнальных путей, которая может возникать за счет мутаций в генах, кодирующих их компоненты. В частности, онкогенная роль рецептора NOTCH1 сигнального пути Notch доказана для различных типов рака, включая рак легкого и колоректальный рак. В рамках настоящего исследования мы изучали важность продукции рецептора NOTCH1 для прогрессии данных типов злокачественных новообразований.

Цель исследования – изучение роли экспрессии *NOTCH1* в поддержании пула и фенотипа опухолевых стволовых клеток (ОСК) карцином легкого и толстой кишки человека.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на полученных ранее клеточных линиях карцином легкого A549 и толстой кишки HCT116 человека с подавленной экспрессией *NOTCH1*. В первую очередь было изучено влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на способность к метастазированию клеток A549 и туморогенность клеток A549 и HCT116 при их введении иммунодефицитным бестимусным мышам линии BALB/c nu/nu. Далее были проведены тесты *in vitro* по определению пула и фенотипа ОСК в культуре опухолевых клеток: цитофлуориметрический анализ активности ABC-транспортёров (выявление способности к выведению красителя во внешнюю среду) и анализ колониеобразования в полужидкой среде. В заключение определены доля клеток в культуре, продуцирующих маркер ОСК (CD133), методом проточной цитофлуориметрии и уровень экспрессии некоторых генов, продукты которых ассоциированы с фенотипом ОСК (*NANOG*, *POU5F1*, *SOX2*), с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к снижению числа экспериментальных животных с метастазами и количества сформированных метастатических очагов, а также к увеличению минимальной прививочной дозы. Активность ABC-транспортёров, способность к неприкрепленному росту, доля CD133-положительных клеток в культуре и экспрессия генов, продукты которых связаны с поддержанием пула и фенотипа ОСК, снижались при подавлении экспрессии *NOTCH1* в обеих клеточных линиях.

Заключение. Экспрессия гена, кодирующего рецептор NOTCH1, важна для поддержания пула и фенотипа ОСК карцином легкого и толстой кишки человека. Полученные данные могут представлять ценность при разработке противоопухолевых терапевтических стратегий.

Ключевые слова: рак легкого, колоректальный рак, сигнальный путь Notch, опухолевая прогрессия, метастазирование, опухолевые стволовые клетки

Для цитирования: Васильева М.В., Хромова Н.В., Бойчук С.В., Копнин П.Б. Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на формирование фенотипа опухолевых стволовых клеток рака легкого и толстой кишки человека. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):97–105.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-97-105>

The effect of *NOTCH1* knockdown on the phenotype of human lung and colon cancer stem cells

M.V. Vasileva¹, N.V. Khromova¹, S.V. Boichuk²⁻⁴, P.B. Kopnin¹

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

²Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 49 Butlerova St., Kazan 420012, Russia;

³Biomarker Research Laboratory, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University; 18 Kremlevskaya St., Kazan 420008, Russia;

⁴Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 Barrikadnaya St., Moscow 125993, Russia

Contacts: Pavel Borisovich Kopnin pbkopnin@mail.ru

Introduction. Lung and colorectal cancers are the most common cancer types, characterized by a poor prognosis. Tumor progression is also caused by the aberrant activity of intercellular signaling pathways, which can arise due to mutations in genes encoding their components. In particular, the oncogenic role of NOTCH1 receptor of Notch signaling pathway has been proven for various cancer types, including lung and colorectal cancers. In this research, we delved deeper into the importance of NOTCH1 receptor expression for the progression of these malignancies.

Aim. To investigate the importance of *NOTCH1* expression in maintaining the cancer stem cell (CSC) pool and phenotype of human lung and colon cancers.

Materials and methods. Experiments were performed on previously obtained *NOTCH1* knockdown cell lines of human lung A549 and colon HCT116 carcinomas. First of all, we studied the effect of *NOTCH1* knockdown on the metastatic ability of A549 cells and the tumorigenicity of A549 and HCT116 cells when injected to immunodeficient BALB/c nu/nu mice. Next, we carried out *in vitro* tests to determine CSC pool and phenotype in tumor cell culture: cytofluorimetric analysis of ABC-transporters activity to exclude dye to the external environment and analysis of colony formation in a semi-liquid medium. In conclusion, we assessed the proportion of cells in the culture producing the CSC marker – CD133 using flow cytometry and the expression level of some genes associated with CSC phenotype (*NANOG*, *POU5F1*, *SOX2*) using real-time polymerase chain reaction.

Results. *NOTCH1* knockdown decreased the number of experimental animals with metastases, the number of formed metastatic foci and increased in the minimum cell inoculation dose. The activity of ABC-transporters, the ability for unattached growth, the proportion of CD133-positive cells in culture, and the expression of genes associated with maintaining of CSC pool and phenotype decreased under *NOTCH1* knockdown in both cell lines.

Conclusion. *NOTCH1* expression is important for maintaining CSC pool and phenotype of human lung and colon carcinomas. The obtained data may be valuable in the development of anticancer therapies.

Keywords: lung cancer, colorectal cancer, Notch signaling pathway, tumor progression, metastasis, cancer stem cells

For citation: Vasileva M.V., Khromova N.V., Boichuk S.V., Kopnin P.B. The effect of *NOTCH1* knockdown on the phenotype of human lung and colon cancer stem cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(2):97–105. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-97-105>

ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого и колоректальный рак являются одними из самых распространенных типов злокачественных новообразований (ЗНО), характеризующихся неблагоприятным прогнозом. По данным Национального института онкологии США (National Cancer Institute, NCI), в 2023 г. на рак легкого и бронхов приходилось 12,2 % всех диагностированных случаев онкологических заболеваний и 20,8 % случаев летальных исходов от данной патологии, а на колоректальный рак – 7,8 и 8,6 % случаев соответственно [1, 2].

Опухолевая прогрессия обуславливается aberrантной активностью межклеточных сигнальных путей, которая может возникать за счет мутаций генов, кодирующих их компоненты. В частности, онкогенная роль рецептора NOTCH1 – сигнального пути Notch – дока-

зана для многих типов рака. По данным о геномных исследованиях портала Национального института онкологии США «Общедоступные сведения о геномных данных» «Атласа ракового генома» (Genomic Data Commons, The Cancer Genomic Atlas, GDC TCGA) [3, 4], соматические мутации и увеличение числа копий *NOTCH1* часто встречаются при аденокарциноме легкого и толстой кишки (рис. 1, а). На основании статистического анализа, выполненного с помощью онлайн-инструмента по исследованию функциональной геномики (Xena Functional Genomics Explorer, Калифорнийский университет, Санта-Круз; <https://xenabrowser.net/>), соответствующих выборок GDC TCGA, можно заключить, что количество матричной РНК (мРНК) *NOTCH1* достоверно повышено в первичных опухолевых очагах данных типов рака (рис. 1, б).

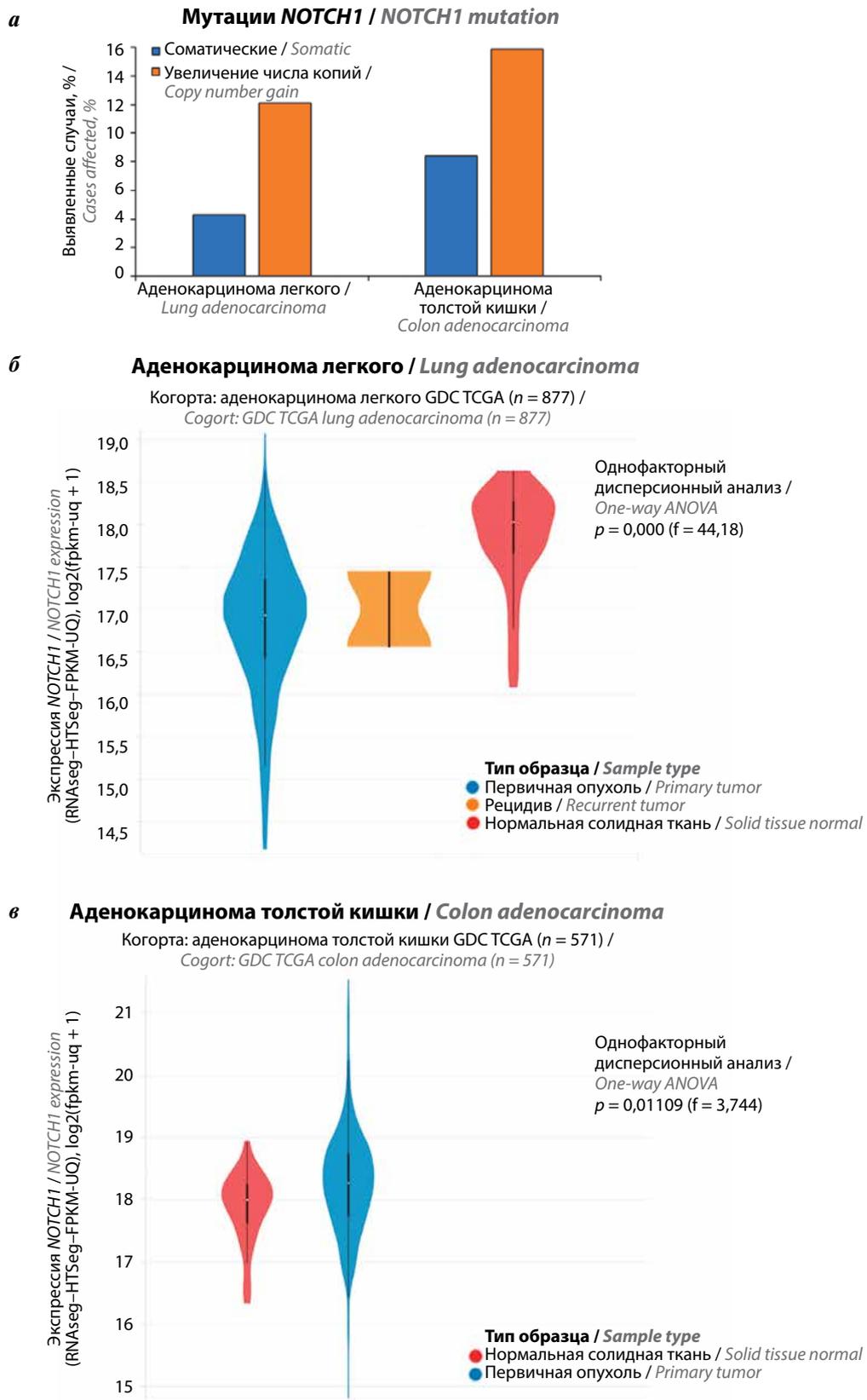


Рис. 1. Частота обнаружения мутаций NOTCH1 (а) и однофакторный дисперсионный анализ экспрессии NOTCH1 в образцах аденокарциномы легкого (б) и толстой кишки (в). GDC TCGA – портал «Общедоступные сведения о геномных данных» «Атласа ракового генома»
Fig. 1. NOTCH1 mutation rate (а) and one-way Anova of NOTCH1 expression (б) in lung and colon adenocarcinoma samples. GDC TCGA – Genomic Data Commons, The Cancer Genomic Atlas

Ранее методом РНК-интерференции нами были получены клетки линий карциномы легкого A549 и толстой кишки HCT116 человека с подавленной экспрессией *NOTCH1*. Мы изучили, как ее подавление влияет на их основные биологические характеристики *in vitro* и *in vivo*: морфологию, скорость пролиферации, способность к колониеобразованию в адгезивных условиях, миграционную активность и динамику роста подкожных ксенографтов. В результате было выявлено, что подавление экспрессии *NOTCH1* приводит к снижению злокачественных характеристик клеток обеих линий [5].

Исследование роли сигнального пути Notch и его компонентов в опухолевой прогрессии не теряет свою актуальность, поскольку для разработки высокоэффективных терапевтических стратегий требуется детальное изучение причин изменения характеристик опухолевых клеток. Популяция опухоль-иницирующих клеток была выявлена при изучении гетерогенной культуры клеток острого миелоидного лейкоза около 30 лет назад. Впоследствии клетки, обладающие способностью формировать опухоли *in vivo* и схожие по характеристикам со стволовыми клетками (СК) соответствующего гистогенетического происхождения, были обнаружены в подавляющем большинстве ЗНО. Они получили название опухолевых стволовых клеток (ОСК). На сегодняшний день доказано, что именно формирование и поддержание пула опухолевых клеток с фенотипом ОСК в значительной степени обеспечивают ключевые этапы опухолевой прогрессии: метастазирование, рецидивирование, формирование лекарственной устойчивости и пр. [6].

Таким образом, **цель исследования** – изучение влияния подавления экспрессии *NOTCH1* на способность к поддержанию пула и фенотипа ОСК карцином легкого и толстой кишки человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. В работе использованы полученные ранее методом РНК-интерференции клеточные линии карцином легкого A549 (ATCC® CCL-185™) и толстой кишки HCT116 (ATCC® CCL-247™) человека с подавленной экспрессией *NOTCH1* (shNotch1) или *GFP* (shGFP, контроль) [5]. Клетки выращивали в среде для культивирования эукариотических клеток HyClone DMEM high glucose (Cytiva, США), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки HyClone Defined Fetal Bovine Serum (Cytiva, США) и 20 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия), в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С.

Эксперименты с участием лабораторных животных. Исследования проводили на самках иммунодефицитных бестимусных мышей линии BALB/c nu/nu в возрасте 7–8 нед, массой тела 15–20 г. Количество животных в каждой группе составляло 10 особей. По окончании экспериментов проводили эвтаназию животных

с последующим извлечением необходимого биологического материала.

Для анализа способности к метастазированию клеток линии A549 животным вводили в одну из долей легкого суспензию 10⁶ клеток в стерильном физиологическом растворе. Введение осуществляли поперек грудной клетки с правой стороны выше реберной дуги в верхней точке реберно-ключичной перпендикулярной линии. Длительность эксперимента составляла 28 сут. Образцы ткани легких, содержащие первичную опухоль и метастазы, подвергали иммуногистохимическому анализу. Анализ срезов проводили с помощью микроскопа Axioplan 2 с использованием объектива 100×/1,30 (Carl Zeiss, Германия). Количество метастатических очагов подсчитывали вручную.

Для определения минимальной прививочной дозы (анализ туморогенности) клеток линий A549 или HCT116 животным подкожно вводили суспензии, содержащие концентрации клеток в диапазоне 0,125–2 × 10⁶, в стерильном физиологическом растворе. На 7-е сутки после введения пальпацией определяли наличие сформированного ксенографта.

Цитофлуориметрический анализ. Для анализа способности к исключению клетками красителя использовали родамин 123 (R8004, Sigma-Aldrich, США) и пропидий йодид (P4170, Sigma-Aldrich, США). Сигнал детектировали на проточном цитометре BD FACSCanto II (BD Biosciences, США) [7].

Для анализа доли CD133-положительных клеток в культуре клетки фиксировали 2 % раствором параформальдегида, затем холодным (–20 °С) чистым метанолом. Клетки инкубировали с первичными антителами к CD133 (ab19898, Abcam, США), затем со вторичными антителами Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur™ с использованием программного обеспечения Cell Quest software (BD Biosciences, США).

Анализ способности к колониеобразованию в полужидкой среде. Клетки высевали в количестве 200 шт. на 10-сантиметровую чашку Петри с неадгезивным для эукариотических клеток покрытием дна, инкубировали 14 сут в полужидкой среде (2,6 % раствор метилцеллюлозы и среда HyClone DMEM, содержащая 20 % эмбриональной телячьей сыворотки, в пропорции 1:1), окрашивали водным раствором кристаллического фиолетового («ПанЭко», Россия) и охлаждали до 4 °С в течение 10 ч. Количество и размер колоний рассчитывали с помощью программы Total Lab версии 2.0, используя модуль Colony Counter (Nonlinear Dynamics, США).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Реакцию проводили на амплификаторе для полимеразной цепной реакции (ПЦР) Bio-Rad CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США) с использованием реагента SYBR Green I («Евроген», Россия). С помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, США) получены значения Ct для целевых и референсного (*TUBA1A*) генов. Относительные уровни

Таблица 1. Праймеры и размеры соответствующих продуктов полимеразной цепной реакции

Table 1. Primers and the size of the corresponding polymerase chain reaction products

Ген Gene	Последовательности праймеров (5'→3') Primer sequences (5'→3')	Размер продукта, п.о. Product size, b.p.
<i>NANOG</i>	F-AAGGTCCCGTCAAGAAACAG R-CTTCTGCGTCACACCATTGC	237
<i>POU5F1</i>	F-GTGTTTCAGCCAAAAGACCATCT R-GGCCTGCATGAGGGTTTCT	156
<i>SOX2</i>	F-TGGACAGTTACGCGCACAT R-CGAGTAGGACATGCTGTAGGT	215
<i>TUBA1A</i>	F-GTTGGTCTGGAATTCTGTCCAG R-AAGAAGTCCAAGCTGGAGTTC	288

Примечание. F – последовательность прямого праймера; R – последовательность обратного праймера.
Note. F – forward primer sequence; R – reverse primer sequence.

экспрессии вычислены с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Экспрессию каждого гена нормировали относительно его экспрессии в клетках shGFP соответствующей линии, которую принимали за единицу. Используемые в работе пары праймеров («Евроген», Россия) и размеры получаемых продуктов представлены в табл. 1.

Статистический анализ. Данные на диаграммах и графиках представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего по результатам минимум трех независимых экспериментов. Статистическую обработку первичных данных проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA версии 13.3. Для оценки различий между группами shGFP и shNotch1 применяли U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В первую очередь мы изучили, может ли подавление экспрессии *NOTCH1* влиять на способность опухолевых клеток к метастазированию. Проведен эксперимент по ортотопическому введению ранее полученных клеток карциномы легкого человека A549 с подавленной экспрессией *NOTCH1* бестимусным иммунодефицитным мышам линии BALB/c nu/nu. В качестве контроля использовали клетки A549 с подавленной экспрессией *GFP*. Экспериментальным животным вводили клетки в одну из долей легкого и спустя время анализировали наличие метастазов в других его долях. Подавление экспрессии *NOTCH1* снизило частоту случаев метастазирования и количество метастатических очагов (рис. 2).

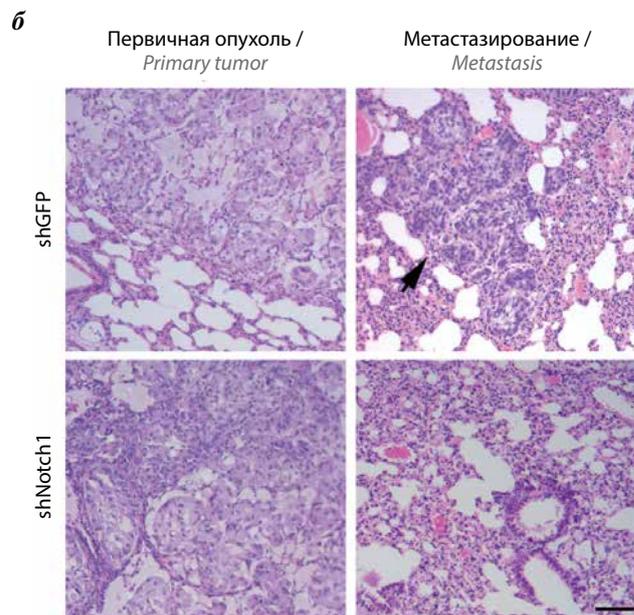
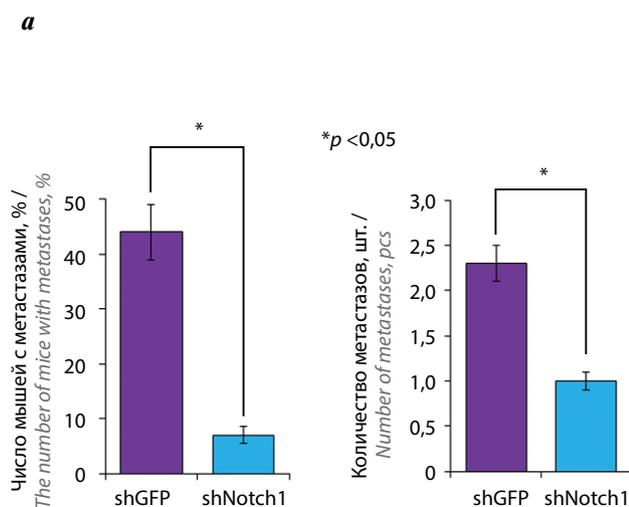


Рис. 2. Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на способность клеток A549 к метастазированию. Статистический (а) и иммуногистохимический (б) анализы первичной опухоли в одной из долей легкого и метастазов в других. На рис. б стрелкой обозначен метастаз, масштаб 100 мкм
Fig. 2. The effect of *NOTCH1* knockdown on the ability of A549 cells to metastasize. Statistical (a) and immunohistochemical (b) analyses of the primary tumor located in one of the lung lobes and metastases in the others. In fig. б the arrow indicates metastasis, scale 100 μ m

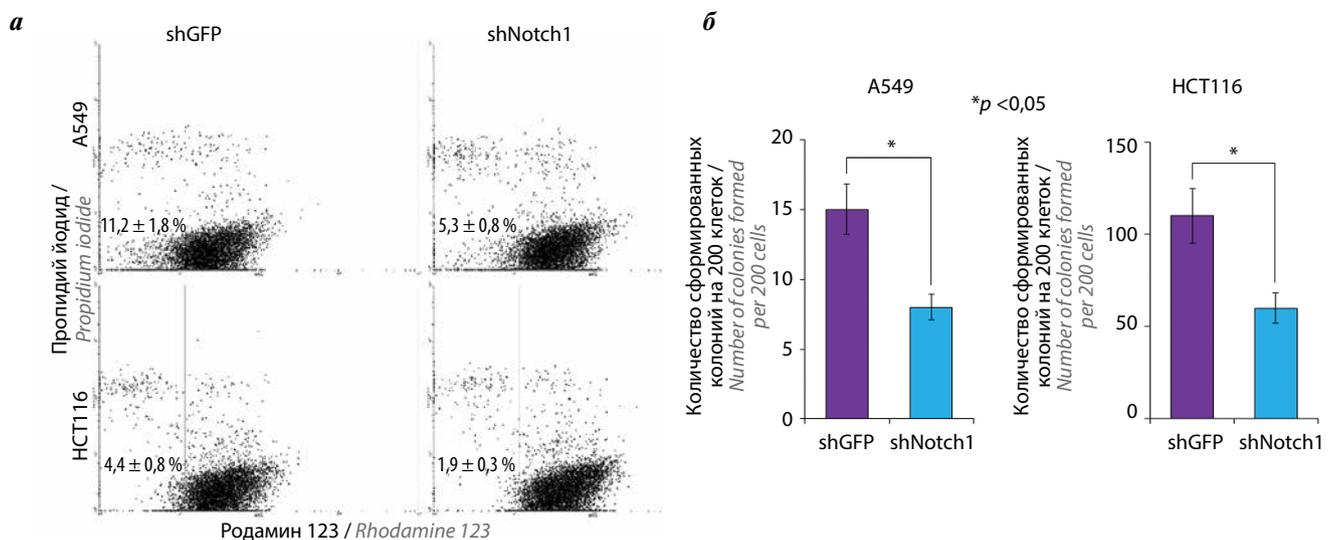
Таблица 2. Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на туморогенность клеток A549 и HCT116**Table 2.** The effect of *NOTCH1* knockdown on tumorigenicity of A549 and HCT116 cells

Количество клеток в прививочной дозе, шт. The number of cells in inoculation dose, pcs	Число мышей со сформированными опухолями/число мышей в группе, шт. Number of mice with formed tumors/number of mice in the group, pcs	
	shGFP	shNotch1
Клеточная линия A549 <i>A549 cell line</i>		
1×10^6	10/10	10/10
$0,5 \times 10^6$	10/10	10/10
$0,25 \times 10^6$	8/10	5/10
$0,125 \times 10^6$	6/10	0/10
Клеточная линия HCT116 <i>HCT116 cell line</i>		
2×10^6	10/10	8/10
1×10^6	10/10	5/10
$0,5 \times 10^6$	6/10	1/10
$0,25 \times 10^6$	2/10	0/10

Способность опухолевых клеток к метастазированию может обуславливаться пулом клеток с фенотипом ОСК, поэтому мы провели анализ туморогенности (определение минимальной прививочной дозы) ранее полученных клеток карциномы легкого A549 и толстой кишки HCT116 человека с подавленной экспрессией *NOTCH1*. В качестве контроля использовали клетки соответствующей линии с подавленной экспрессией *GFP*. Подавление экспрессии *NOTCH1* привело к увеличению минимальной прививочной дозы клеток, т. е. к снижению их туморогенного потенциала, для обеих линий (табл. 2). Прививаемость клеток представлена как отношение числа мышей со сфор-

мированными ксенографтами к общему числу животных в группе.

Поскольку полученные данные свидетельствуют о потенциальной вовлеченности *NOTCH1* в поддержание пула клеток с фенотипом ОСК, мы провели стандартные тесты *in vitro* по определению таких клеток в культуре. Цитофлуориметрический анализ активности ABC-транспортеров выявил снижение доли клеток, способных к исключению красителя родамин 123, при подавлении экспрессии *NOTCH1* в обеих линиях (рис. 3, а). Эффективность колониеобразования в полужидкой среде клеток с подавленной экспрессией *NOTCH1* также уменьшилась в обеих линиях (рис. 3, б).

**Рис. 3.** Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на способность к поддержанию пула и фенотипа опухолевых стволовых клеток A549 и HCT116. Цитофлуориметрический анализ активности ABC-транспортеров на способность к исключению красителя родамин 123 (а) и анализ колониеобразования в полужидкой среде (б)**Fig. 3.** The effect of *NOTCH1* knockdown on the ability to maintain cancer stem cells pool and phenotype of A549 and HCT116 cells. Cytofluorimetric analysis of the activity of ABC-transporters for the ability to exclude the rhodamine 123 dye (a) and the ability of colony forming in a semi-liquid medium (b)

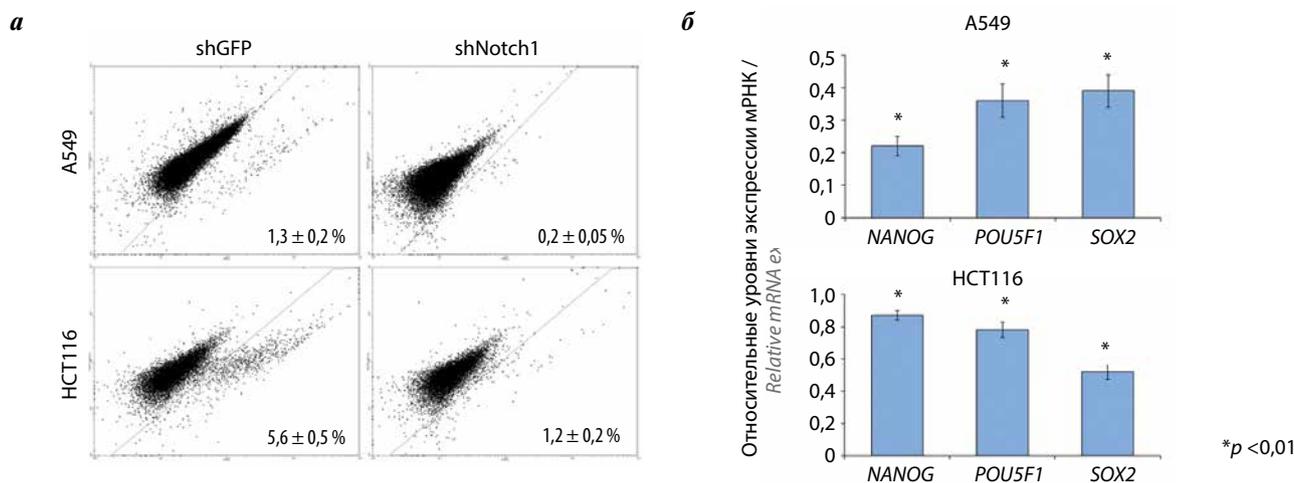


Рис. 4. Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* в клетках *A549* и *HCT116* на продукцию маркера опухолевых стволовых клеток *CD133* (а) и экспрессию некоторых генов, продукты которых вовлечены в поддержание данного фенотипа (б). мРНК - матричная РНК
Fig. 4. The effect of *NOTCH1* knockdown in *A549* and *HCT116* cells on the production of cancer stem cell marker *CD133* (a) and the expression of some genes involved in maintaining of this phenotype (b). mRNA - matrix RNA

Современные методы детекции доли клеток в культуре с фенотипом ОСК часто основаны на анализе маркеров клеточной поверхности. Цитофлуориметрический анализ количества клеток, продуцирующих маркер ОСК *CD133*, выявил его уменьшение при подавлении экспрессии *NOTCH1* в обеих линиях (рис. 4, а). Увеличение уровня экспрессии генов, продукты которых вовлечены в поддержание стволовости, может также свидетельствовать о наличии пула клеток с фенотипом ОСК. По данным ПЦР в реальном времени подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к снижению экспрессии некоторых генов, вовлеченных в поддержание стволовости (*NANOG*, *POU5F1*, *SOX2*), в клетках обеих линий (рис. 4, б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами были получены данные, свидетельствующие о снижении злокачественных характеристик клеток карцином легкого и толстой кишки человека при подавлении экспрессии *NOTCH1* [5]. С учетом того, что сигнальный путь Notch вовлечен в поддержание пула и фенотипа СК как при эмбриональном развитии, так и во взрослом организме, он также может принимать участие в поддержании пула и фенотипа ОСК при ЗНО. Активирующие мутации *NOTCH1* и *NOTCH3* выявлены у пациентов с аденокарциномой легкого. Данные мутации могут быть ассоциированы с потерей экспрессии гена *NUMB*, белковый продукт которого задействован в определении клеточной судьбы [8, 9]. На мышинной модели показано, что гиперпродукция функционального Notch1 способна вызывать образование аденокарциномы легкого и благоприятствует опухолевой прогрессии, в том числе метастазированию [10]. *NOTCH3* при *KRAS*-ассоциированной аденокарциноме легкого является ключевым акти-

ватором комплекса *PKC α -ELF3-NOTCH3*, который задействован в асимметричном делении опухолевых иницирующих клеток, что обеспечивает их самообновление, клональную экспансию и опухолевую прогрессию [11].

В физиологии нормального желудочно-кишечного тракта активность сигнального пути Notch необходима для поддержания гомеостаза эпителия кишечника, в частности для регулирования дифференцировки бокаловидных и СК кишечных крипт толстой кишки. При колоректальном раке часто обнаруживаются значительное превышение продукции всех лигандов сигнального пути Notch и aberrantная активация рецептора *NOTCH1* [12]. Гиперактивность Notch при колоректальном раке способствует инвазии и метастазированию, например через активацию белкового комплекса *NOTCH-DAB1-ABL-RHOGEF* (индуцирует активацию тирозинкиназ *ABL* и фосфорилирование *RHOGEF*) [13].

Способность опухолевых клеток к метастазированию крайне важна для прогрессии, поэтому мы в первую очередь изучили, может ли подавление экспрессии *NOTCH1* повлиять на нее. В клетках линии карциномы легкого человека *A549* подавление экспрессии *NOTCH1* действительно приводило к снижению частоты случаев метастазирования и количества метастазов при ортотопическом введении. К сожалению, данный эксперимент не удалось провести на клетках карциномы толстой кишки человека *HCT116*, однако все дальнейшие исследования выполнялись на обеих клеточных моделях.

Способность опухолевых клеток к метастазированию обусловлена пулом клеток с фенотипом ОСК. Анализ способности этих клеток формировать опухоли при их введении иммунодефицитным лабора-

торным животным признан «золотым стандартом» верификации ОСК в культуре [13]. В качестве объекта в данном эксперименте часто используют тип иммунодефицитных мышей nude («голый»), характеризующийся отсутствием волосяного покрова и тимуса, а наиболее предпочтительным способом введения считается ортотопическая трансплантация [14, 15]. Однако технически она далеко не всегда возможна, как и в нашем случае с клетками НСТ116, поэтому мы использовали подкожный способ введения опухолевых клеток, и этого оказалось достаточно для получения достоверных и воспроизводимых результатов. Подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к увеличению минимальной прививочной дозы клеток обеих линий, т. е. к снижению их туморогенного потенциала.

Кроме экспериментов *in vivo* есть и тесты *in vitro* по определению пула и фенотипа ОСК в культуре, наиболее часто применяемыми из которых являются анализ активности ABC-транспортёров и субстрат-независимое колониобразование. Первый тест основан на способности как нормальных СК, так и ОСК с помощью трансмембранных белков семейства ABC-транспортёров удалять из клетки мелкие эндогенные молекулы, включая цитотоксичные вещества. Однако ОСК также могут использовать ABC-транспортёры для поддержания лекарственной устойчивости [16, 17]. Цитофлуориметрический анализ активности ABC-транспортёров проведен с использованием двойного окрашивания на пропидий йодид для исключения мертвых клеток и родамин 123. Подавление экспрессии *NOTCH1* снизило долю клеток, способных к исключению красителя, т. е. активность ABC-транспортёров, в обеих линиях. Второй тест основан на способности ОСК гораздо более эффективно формировать колонии из одиночных клеток и расти в виде сфероидов в неадгезивных условиях по сравнению с опухолевыми клетками [18]. Анализ колониобразования в полужидкой среде выявил уменьшение количества колоний, сформированных клетками А549 и НСТ116 при подавлении экспрессии *NOTCH1*.

Современные методы детекции пула клеток с фенотипом ОСК часто основаны на анализе маркеров клеточной поверхности, а также экспрессии генов, продукты которых вовлечены в поддержание стволовости. CD133 (проминин-1) является трансмембранным гликопротеином, продуцируемым эмбриональными эпителиальными и гемопоэтическими СК [19]. CD133-положительные опухолевые клетки обнаружены в образцах ЗНО различной этиологии. Такие клетки, выделенные с помощью проточной цитофлуориметрии, способны формировать опухоли у иммунодефицитных мышей, оставаться в недифференцированном состоянии при культивировании на бессывороточной среде и характеризуются более злокачественным фенотипом [20–22]. По результатам анализа базы данных молекулярных путей KEGG PATHWAY Database [23] также были выбраны несколько целевых генов сигнального пути Notch, продукты которых играют значительную роль в эмбриогенезе и поддержании фенотипа СК, а следовательно, и ОСК: *NANOG*, *POU5F1* (*OCT4*) и *SOX2* [6]. Подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к снижению доли CD133-положительных клеток и экспрессии вышеперечисленных генов в клетках А549 и НСТ116.

Исследования последних лет все больше говорят о нерациональности глобального ингибирования сигнального пути Notch при противоопухолевой терапии. Таким образом, возможно, более целесообразным представляется смещение вектора разработок в сторону нацеливания на подавление экспрессии Notch-зависимых генов, продукты которых вовлечены в поддержание пула и фенотипа ОСК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспрессия гена, кодирующего рецептор NOTCH1, важна для поддержания пула и фенотипа ОСК карцином легкого и толстой кишки человека. Изучение вовлеченности сигнальных путей и их компонентов в поддержание пула клеток с фенотипом ОСК лежит в основе разработки высокоэффективных терапевтических стратегий, нацеленных на элиминацию ОСК.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. National Cancer Institute. Cancer stat facts: lung and bronchus cancer. Available at: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>.
2. National Cancer Institute. Cancer stat facts: colorectal cancer. Available at: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>.
3. Genomic Data Commons, The Cancer Genomic Atlas. TCGA-LUAD. Available at: <https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-LUAD>.
4. Genomic Data Commons, The Cancer Genomic Atlas. TCGA-COAD. Available at: <https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-COAD>.
5. Васильева М.В., Хромова Н.В., Копнин Б.П. и др. Значимость экспрессии рецептора NOTCH1 для прогрессии карцином легкого и толстой кишки человека. Биохимия 2022;87(10):1505–13. DOI: 10.31857/S0320972522100153
Vasileva M.V., Khromova N.V., Kopnin B.P. et al. Significance of NOTCH1 expression in the progression of human lung and colorectal cancers. Biochemistry (Mosc.) 2022;87(10):1199–05. DOI: 10.1134/S0006297922100133
6. Batlle E., Clevers H. Cancer stem cells revisited. Nat Med 2017;23(10):1124–34. DOI: 10.1038/nm.4409
7. Фармаковская М.Д., Хромова Н.В., Копнин Б.П., Копнин П.Б. Повышение туморогенного потенциала клеток рака ободочной кишки человека линии НСТ116 за счет увеличения содержания раковых стволовых клеток при подавлении экспрессии E-кадгерина. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(3):6–14. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-06-14
Farmakovskaya M.D., Khromova N.V., Kopnin B.P., Kopnin P.B. Increasing the tumorigenic potential of human colon cancer cells of the HST116 line by increasing the content of cancer stem cells while suppressing the expression of E-cadherin. Rossiyskiy

- bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal 2016;15(3):6–14. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-06-14
8. Yuan X., Wu H., Xu H. et al. Meta-analysis reveals the correlation of Notch signaling with non-small cell lung cancer progression and prognosis. *Sci Rep* 2015;5:10338. DOI: 10.1038/srep10338
 9. Liu L., Tao T., Liu S. et al. An RFC4/Notch1 signaling feedback loop promotes NSCLC metastasis and stemness. *Nat Comm* 2021;12(1):2693. DOI: 10.1038/s41467-021-22971-x
 10. Allen T.D., Rodriguez E.M., Jones K.D. et al. Activated Notch1 induces lung adenomas in mice and cooperates with Myc in the generation of lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2011;71(18):6010–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0595
 11. Ali S.A., Justilien V., Jamieson L. et al. Protein kinase C α drives a NOTCH3-dependent stem-like phenotype in mutant KRAS lung adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2016;29(3):367–78. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.02.012
 12. Tyagi A., Sharma A.K., Damodaran C. A review on Notch signaling and colorectal cancer. *Cells* 2020;9(6):1549. DOI: 10.3390/cells9061549
 13. Sonoshita M., Itatani Y., Kakizaki F. et al. Promotion of colorectal cancer invasion and metastasis through activation of NOTCH-DAB1-ABL-RHOGEF protein TRIO. *Cancer Discov* 2015;5(2):198–11. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0595
 14. O'Brien C.A., Kreso A., Jamieson C.H.M. Cancer stem cells and self-renewal. *Clin Cancer Res* 2010;16(12):3113–20. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2824
 15. Flanagan S.P. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res* 1966;8(3):295–309. DOI: 10.1017/s0016672300010168
 16. Ozvegy-Laczka C., Cserepes J., Elkind N.B. et al. Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. *Drug Resist* 2005;8(1):15–26. DOI: 10.1016/j.drug.2005.02.002
 17. Wu C., Wei Q., Utomo V. et al. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential. *Cancer Res* 2007;67(17):8216–22. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0999
 18. Franken N.A., Rodermond H.M., Stap J. et al. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat Protoc* 2006;1(5):2315–9. DOI: 10.1038/nprot.2006.339
 19. Yin A.H., Miraglia S., Zanjani E.D. et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90(12):5002–12. DOI: 10.1182/blood.V90.12.5002
 20. Tirino V., Camerlingo R., Franco R. et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2009;36(3):446–53. DOI: 10.1016/j.ejcts.2009.03.063
 21. Vermeulen L., Todaro M., Mello F.D. et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multilineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad USA* 2008;105(36):13427–32. DOI: 10.1073/pnas.0805706105
 22. Fujimoto K., Beauchamp R.D., Whitehead R.H. Identification and isolation of candidate human colonic clonogenic cells based on cell surface integrin expression. *Gastroenterology* 2002;123(6):1941–8. DOI: 10.1053/gast.2002.37065
 23. KEGG PATHWAY Database is a platform that provides wiring diagrams of molecular interactions, reactions and relations. Available at: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.

Вклад авторов

М.В. Васильева: эксперименты *in vitro*, подготовка иллюстративного материала;
 Н.В. Хромова: работа с лабораторными животными и биологическим материалом;
 С.В. Бойчук: работа с базами данных, статистическая обработка данных;
 П.Б. Копнин: дизайн и организация исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions

M.V. Vasileva: *in vitro* experiments, preparation of illustrative material;
 N.V. Khromova: work with laboratory animals and biological material;
 S.V. Boichuk: work with databases, statistical data processing;
 P.B. Kopnin: design and organization of the research, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.В. Васильева / M.V. Vasileva: <https://orcid.org/0000-0002-1974-3790>
 Н.В. Хромова / N.V. Khromova: <https://orcid.org/0000-0001-8348-6760>
 С.В. Бойчук / S.V. Boichuk: <https://orcid.org/0000-0003-2415-1084>
 П.Б. Копнин / P.B. Kopnin: <https://orcid.org/0000-0002-2078-4274>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (грант № 23-15-00433, <https://rscf.ru/project/23-15-00433>).

Funding. This research was funded by the Russian Scientific Foundation (grant No. 23-15-00433, <https://rscf.ru/en/project/23-15-00433>).

Соблюдение правил биоэтики

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

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance of bioethics rules

The research protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

The research was performed in accordance with all ethical standards for the animal treatment adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes.

Статья поступила: 01.03.2024. **Принята к публикации:** 13.05.2024.

Article submitted: 01.03.2024. **Accepted for publication:** 13.05.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-106-115>

Молекулярно-генетические особенности нейробластомы у пациентов подросткового возраста

Н.А. Андреева, Т.В. Шаманская, Д.Ю. Качанов, Р.Х. Абасов, Н.В. Гегелия, А.Е. Друй

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117198 Москва, ул. Саморы Машела, 1

Контакты: Наталья Александровна Андреева andreeva793@bk.ru

Введение. У подростков и молодых взрослых нейробластома развивается крайне редко, характеризуется индолентным течением, очень плохим отдаленным прогнозом и имеет молекулярно-генетические особенности.

Цель исследования – клиническая и молекулярно-генетическая характеристика нейробластомы в когорте пациентов старше 10 лет.

Материалы и методы. Ретроспективно отобраны пациенты с гистологически верифицированным диагнозом «нейробластома/ганглионейробластома», установленным в возрасте старше 10 лет. Для выявления генетических аберраций в клетках опухоли применялись флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH), мультиплексная лигазозависимая амплификация (multiplex ligation-dependent amplification, MLPA) и таргетное высокопроизводительное секвенирование ДНК. В описываемую когорту вошли 11 больных подросткового возраста с медианой возраста на момент постановки диагноза 160 мес (124–173 мес) и 1 больной в возрасте 41 года (клинические данные отсутствуют). Все пациенты подросткового возраста получали лечение в соответствии с протоколом NB-2004. Медиана времени наблюдения за этими больными ($n = 11$) составила 32 мес (8–68 мес).

Результаты. С помощью FISH амплификация гена *MYCN* обнаружена в 17 % случаев, делеции 1p и 11q – в 20 и 22,2 % случаев соответственно. Методом MLPA в опухоли 9 пациентов наиболее часто определялись делеции 1p и 3p (по 80 % случаев), 11q (67 % случаев), 4p (56 % случаев), а также увеличение числа копий 17q (62,5 % случаев). Дефекты в гене *ATRX* обнаружены у 11 (91,6 %) из 12 пациентов. В 90 % случаев (у 10 из 11 больных) выявлены делеции гена *ATRX* различной протяженности. У 3/11 (27,3 %) пациентов обнаружены 2 миссенс-мутации (p.V1678F, p.N2125I) и нонсенс-мутация p.S213*. При этом у 2 больных выявлены онкогенные нуклеотидные замены, сочетающиеся с делецией всего гена *ATRX* и моносомией X. Онкогенные генетические варианты в компонентах путей RAS-RAF-MEK (*BRAF*, *NRAS*, *ALK*) и p53 (*ATM*, *TP53*) определены в 58 % (7/12) случаев. При добавлении к терапии ALK-ингибиторов в 1-й линии при наличии соответствующих активирующих миссенс-мутаций неблагоприятные события не наблюдались.

Заключение. Биологические особенности и клиническая агрессивность нейробластомы у подростков/взрослых могут быть объяснены репликативной иммортализацией клеток за счет альтернативного пути поддержания длины теломера. Для лечения пациентов данной возрастной группы должны быть разработаны специальные терапевтические рекомендации; особое внимание необходимо уделить применению молекулярно-направленной терапии.

Ключевые слова: нейробластома, подростки, *ATRX*, *ALK*

Для цитирования: Андреева Н.А., Шаманская Т.В., Качанов Д.Ю. и др. Молекулярно-генетические особенности нейробластомы у пациентов подросткового возраста. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):106–115.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-106-115>

Molecular genetic features of neuroblastoma in adolescent

N.A. Andreeva, T.V. Shamanskaya, D. Yu. Kachanov, R. Kh. Abasov, N.V. Gegeliya, A.E. Druy

Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia; 1 Samora Mashela St., Moscow 117198, Russia

Contacts: Nataliya Alexandrovna Andreeva andreeva793@bk.ru

Introduction. Neuroblastoma extremely rarely occurs in adolescents and young adults and presents with slowly progressing clinical course with a very poor long-term outcome. Adolescent neuroblastoma are characterized by unique molecular phenotype.

Aim. To determine the clinical and biological features of neuroblastoma in patients over 10 years old.

Materials and methods. Patients with a histologically verified diagnosis of neuroblastoma/ganglioneuroblastoma established over the age of 10 years were retrospectively selected. Molecular genetic tests included fluorescence *in situ* hybridization (FISH), multiplex ligation-dependent amplification (MLPA) and targeted next generation sequencing of tumor-derived DNA. The described cohort included 11 adolescents with histologically verified neuroblastoma/ganglioneuroblastoma with a median age of 160 months (124–173 months) at diagnosis and 1 patient aged 41 years (clinical data is missing). All adolescents were treated according to the neuroblastoma treatment protocol NB-2004. The median follow-up time for patients ($n = 11$) was 32 months (8–68 months).

Results. *MYCN* gene amplification was detected by FISH in 17 %; deletion of 1p and 11q – in 20 and 22.2 % of cases, respectively. Deletions of 1p and 3p (80 % cases each), 11q (67 % cases), 4p (56 % cases), and gain 17q (62.5 % cases) were frequently detected in tumors ($n = 9$) by MLPA. *ATRX* gene aberrations were found in 91.6 % (11/12). In the most cases (10/11; 90 %), *ATRX* gene deletions of varying length were detected. Missense substitutions p.V1678F, p.N2125I and nonsense mutation p.S213* were detected in 3/11 (27.3 %) patients. Moreover, in 2 patients, oncogenic nucleotide substitutions were identified in combination with *ATRX* gene deletion entire and monosomy X. Oncogenic genetic variants in components of the RAS-RAF-MEK (*BRAF*, *NRAS*, *ALK*) and p53 (*ATM*, *TP53*) pathways were detected in 58 % (7/12) of cases. No adverse events were observed when *ALK* inhibitors were added to first-line therapy in neuroblastomas harboring activating *ALK* mutations.

Conclusion. The clinical aggressiveness of adolescent/adult NB may be explained by the replicative immortalization of cells through alternative lengthening of telomeres, which is highlighted by *ATRX* aberrations. Special therapeutic recommendations should be elaborated for the treatment of patients in this age group, where special attention should be paid to the use of molecularly targeted therapy.

Keywords: neuroblastoma, adolescents, *ATRX*, *ALK*

For citation: Andreeva N.A., Shamanskaya T.V., Kachanov D.Yu. et al. Molecular genetic features of neuroblastoma in adolescent. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(2):106–15. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-106-115>

ВВЕДЕНИЕ

Нейробластома (НБ) – самая распространенная экстракраниальная солидная злокачественная опухоль у детей, которая в основном развивается в возрасте до 5 лет (более 90 % всех случаев) [1]. В 30 % случаев данная патология возникает у детей 1-го года жизни. У пациентов подросткового возраста и взрослых пациентов развитие НБ – редкое событие, наблюдаемое с частотой 0,2 случая на 1 млн человек [2]. По данным Программы регистрации статистических данных по онкологической заболеваемости и смертности (Surveillance Epidemiology and End Results, SEER) Национального института рака США (National Cancer Institute, NCI), развитие НБ в возрасте старше 20 лет наблюдалось в 6,1 % случаев, а в возрасте старше 60 лет – в 0,9 % [2].

Нейробластома, развивающаяся в подростковом и более старшем возрасте, имеет особенности клинического течения. Как правило, у подростков и молодых пациентов заболевание протекает индолентно, медленно, но неуклонно прогрессирует, несмотря на проведение терапии. Имеются несколько сообщений о худшем ответе НБ на химио- и лучевую терапию больных старше 10 лет, что приводит к развитию локального или системного рецидива [3, 4]. Пятилетняя общая выживаемость пациентов старше 20 лет, по данным SEER, и пациентов 10–19 лет, по данным Международной группы по изучению факторов риска при нейробластоме (International Neuroblastoma Risk Group, INRG), не превышают 36,3 и 46,2 % соответственно [2, 5].

При этом биологическая агрессивность НБ у подростков не может быть объяснена наличием стандартных цитогенетических aberrаций, используемых для стратификации пациентов на группы риска [6]. Амплификация гена *MYCN* у больных данной возрастной группы встречается лишь в 9 % случаев, тогда как в общей когорте – в 20–25 % [5]. Напротив, сообщается о более частой встречаемости делеции 11q и увеличении числа копий 17q у пациентов с НБ подросткового возраста [7].

В связи с немногочисленностью пациентов с НБ старше 10 лет в большинстве работ описываются единичные наблюдения или небольшие когорты больных, у которых не во всех случаях оценивали молекулярно-генетический профиль опухоли. В зарубежной литературе есть всего несколько публикаций, подчеркивающих наличие молекулярно-генетических особенностей НБ, развивающейся у подростков и взрослых. Так, выявлены соматические генетические aberrации в гене *ATRX*, приводящие к потере функции белка (делеции, нонсенс-мутации, инделы со сдвигом рамки считывания белка). У пациентов с НБ старше 18 лет соматические мутации или делеции *ATRX* обнаружены в 58 % случаев, соматические мутации в гене *ALK* – в 42 %, что значительно больше, чем в общей популяции больных НБ [8]. N.K. Cheung и соавт. показали зависимость частоты выявления мутаций в гене *ATRX* от возраста больных: у пациентов в возрасте до 18 мес ($n = 18$) aberrации не выявлены ни в одном случае, в возрасте 18 мес – 12 лет мутации *ATRX* определены в 17 % (9/54) случаев, а в возрасте старше 12 лет –

в 44 % (14/32). При этом у всех взрослых больных с метастатической формой заболевания обнаружены мутации в этом гене [9]. Таким образом, отмечены рекуррентные молекулярно-генетические изменения у пациентов с НБ, заболевших в возрасте старше 10 лет. В отечественной литературе на данный момент имеется лишь 1 публикация, в которой описана серия клинических случаев [10].

Цель исследования — клиническая и молекулярно-генетическая характеристика НБ в когорте пациентов старше 10 лет.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период с 2019 по 2023 г. в лаборатории молекулярной онкологии Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева пациентам с морфологически верифицированным диагнозом «нейробластома/ганглионейробластома» в дебюте заболевания проведены 162 молекулярно-генетических исследования методом таргетного высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing, NGS). Ретроспективно из данной группы выбраны больные старше 10 лет на момент установления диагноза, данные которых проанализированы в рамках настоящего исследования. У всех пациентов определено наличие несбалансированных хромосомных аберраций с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) и мультиплексной лигазозависимой амплификации (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA).

Методом FISH на ткани первичной опухоли выявлялись изменения количества копий гена *MYCN*, делеции короткого плеча хромосомы 1 (1p36) и длинного плеча хромосомы 11 (11q23). Интерпретация результатов исследования осуществлялась согласно протоколу немецкой группы по изучению нейробластом NB2004. Сегментарные и количественные хромосомные аберрации в ткани опухоли выявляли методом MLPA с использованием наборов SALSA P251, P252, P253 (MRC Holland, Нидерланды), содержащих олигонуклеотидные зонды, специфичные к различным регионам хромосом 1–4, 7, 9, 11, 12, 14, 17. Детекцию результатов проводили с помощью капиллярного электрофореза с применением генетического анализатора SeqStudio (Thermo Fischer Scientific, США). Обработку и анализ полученных результатов проводили с использованием программы Coffalyser.Net (MRC Holland, Нидерланды). Результаты интерпретировали в соответствии с критериями Европейской группы по оптимизации терапии нейробластомы Международного общества детских онкологов (International Society of Paediatric Oncology Europe Neuroblastoma, SIOPEN) [11].

Таргетное высокопроизводительное секвенирование ДНК, выделенной из ткани опухоли, проводили с использованием кастомизированной панели QIASeq (Qiagen, Германия), включающей гены, значимые в этио-

патогенезе детских солидных опухолей, в том числе все экзоны гена *ATRX*. Секвенирование выполняли путем парно-концевого прочтения на приборе MiSeq с помощью набора реагентов Kit MiSeq Reagent Kit, v2 (300 циклов) (Illumina, США) со средней глубиной прочтения региона интереса более 500×. Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы специализированные базы данных соматических (VarSome, COSMIC, OncoKB) и герминальных (VarSome, HGMD, OMIM) мутаций, а также данные литературы. Сведения о числе копий отдельных экзонов отсековенных генов получены с помощью сервиса QIAGEN GeneGlobe (Qiagen, Германия).

В описываемую когорту вошли 12 пациентов, из них 11 подросткового возраста (диапазон возраста на момент постановки диагноза 124–173 мес, медиана возраста 160 мес). Также в исследование включен 1 пациент 41 года, который получал консультативную помощь в Национальном медицинском исследовательском центре детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева. Этот случай представлял интерес в связи с немногочисленностью взрослых больных НБ и схожестью биологии опухоли во взрослом и подростковом возрасте. Все педиатрические пациенты получали лечение по протоколу НБ NB2004. В качестве интенсификации терапии при выявлении активирующих мутаций в гене *ALK* применяли соответствующие ингибиторы (церитиниб, лорлатиниб): в 2 случаях в 1-й линии терапии, в 1 — при прогрессировании заболевания.

Для анализа качественных характеристик применяли критерий χ^2 . Выживаемость пациентов оценивали с помощью метода Каплана–Майера по состоянию на 01.09.2023. Медиана времени наблюдения за больными ($n = 11$) составила 32 мес (диапазон 8–68 мес). Взрослый пациент выбыл из-под наблюдения. Медиана времени до развития неблагоприятного события или последнего наблюдения составила 17 мес (диапазон 4–38 мес).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди 12 больных, вошедших в исследование, в 9 (75 %) случаях опухоль представлена низкодифференцированной НБ, в 2 (16,7 %) — недифференцированной НБ, в 1 (8,3 %) — смешанной ганглионейробластомой. В анализируемой когорте превалировали пациенты с заболеванием 4-й стадии (63,6 %; 7/11) и пациенты группы высокого риска (72,7 %; 8/11). Статус гена *MYCN* проанализирован у всех 12 больных (у взрослого пациента применен метод MLPA); амплификация данного гена обнаружена в 2 (17 %) случаях. Делеция 1p выявлена у 2 (20 %) из 10 пациентов, делеция 11q — у 2 (22,2 %) из 9 пациентов.

Исследование методом MLPA, выполненное 9 пациентам, позволило во всех случаях обнаружить геномный профиль неблагоприятной НБ, характеризующийся значительным количеством сегментарных

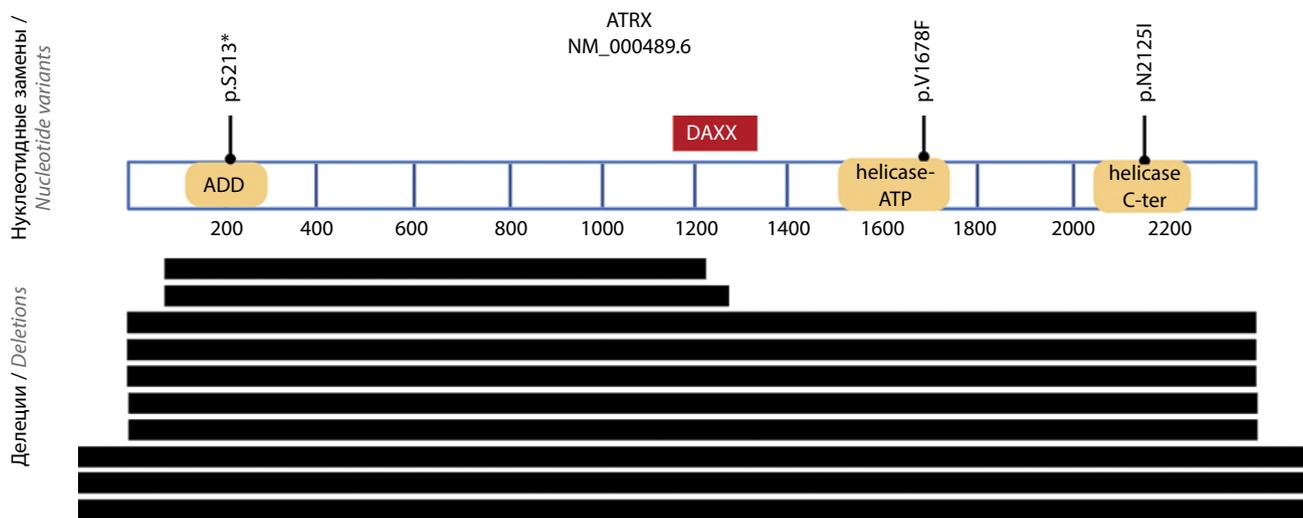
хромосомных aberrаций и отсутствием количественных изменений хромосом. Количество сегментарных aberrаций в опухолевом геноме варьировало от 2 до 5 (медиана составила 4 aberrации). Наиболее часто определялись делеции 1p (80 % случаев), 3p (80 % случаев), 11q (67 % случаев), 4p (56 % случаев), а также увеличение числа копий 17q (62,5 % случаев). В единичных случаях выявлены делеции 2q, 7q, изохромосома 11 и увеличение числа копий генов *MYCN* и *ALK*, не достигающие порога амплификации. Материал только 1 пациента с наличием амплификации гена *MYCN* по данным FISH был доступен для исследования методом MLPA. Наличие амплификации региона 2p23.4 (включающего гены *MYCN*, *DDX1*, *NBAS*) подтверждено двумя независимыми методами. Делеции 1p и 11q выявлены с помощью MLPA в значительно большем числе случаев, чем в ходе FISH (см. таблицу).

Исследование методом NGS с оценкой нуклеотидных вариантов и аномалий числа копий анализируемых генов позволило обнаружить дефекты в гене *ATRX* у 11 (91,6 %) из 12 пациентов. В большинстве случаев (10/11; 90 %) выявлены делеции гена *ATRX* в виде утраты экзонов 4–10, 4–12 или полной кодирующей последовательности гена (см. рисунок). У 3 (30 %) из 10 пациентов женского пола утрата всей кодирующей последовательности гена *ATRX* была связана с моносомией X, обнаруженной по снижению копийности генов, картированных как на длинном, так и на коротком плече хромосомы X. В 3 (30 %) из 10 случаев делеция гена *ATRX* или экзонов 4–12 (в 1 случае) носила субклональный характер. У 3 (27,3 %) из 11 пациентов выявлены нуклеотидные миссенс-мутации p.V1678F и p.N2125I ($n = 2$) и нонсенс-мутация p.S213* ($n = 1$). Причем у 2 больных обнаружены онкогенные нуклеотидные замены, сочетающиеся с делецией всего гена *ATRX* и моносомией X.

Молекулярно-генетические изменения в опухоли у пациентов не ограничивались aberrациями в гене *ATRX* (см. таблицу). В 58 % (7/12) случаев выявлены дефекты в генах, кодирующих компоненты сигнальных путей RAS-RAF-MEK и p53 (*BRAF*, *ATM*, *NRAS*, *TP53*), включая активирующие миссенс-варианты в гене *ALK*, обнаруженные у 3 больных и послужившие основанием для назначения таргетной терапии. В остальных случаях обнаружены патогенные варианты в генах *ATP7B* и *FANCD2*. Лишь у 1 пациента в ткани опухоли не выявлено онкогенных вариантов.

Примечательно, что у 2 пациентов наблюдались патогенетически взаимоисключающие события: амплификация гена *MYCN* и делеция гена *ATRX*. Как уже отмечалось выше, у 1 из данных больных амплификация гена *MYCN* подтверждена двумя различными методами.

При анализе выживаемости пациентов ($n = 11$) прослеживается индолентное течение НБ, характеризующееся медленным, но неуклонным прогрессированием. Так, 3-летняя бессобытийная выживаемость составила 43,1 % (95 % доверительный интервал 16,5–100), 3-летняя ОВ – 88,9 % (95 % доверительный интервал 70,6–100). У 5 (45 %) из 11 пациентов выявлены неблагоприятные события. Медиана количества таких событий, связанных с заболеванием, у 1 пациента составила 2 (диапазон 2–4). Живы без событий 6 больных. Однако стоит отметить небольшой срок наблюдения за пациентами, который составил 32 мес (диапазон 8–68 мес). Один взрослый больной выбыл из-под наблюдения. Наличие мутаций в компонентах путей RAS-RAF-MEK и p53 в дополнение к выявляемым в большинстве случаев дефектам в гене *ATRX* обнаружено у 7 пациентов и было сопряжено с повышенной частотой прогрессирования опухоли: у 4 (66,7 %) из 6 больных терапия оказалась неудачной, 1 больной



Результаты секвенирования гена *ATRX*. Черными линиями указана протяженность делеций в этом гене. Наиболее протяженные линии соответствуют моносомии X-хромосомы. Helicase-ATP – хеликазный АТФ-связывающий домен; helicase C-ter – хеликазный C-концевой домен *ATRX* gene sequencing results. Black lines indicate the extent of deletions in this gene. The longest lines correspond to monosomy of the X chromosome. Helicase-ATP – helicase ATP-binding domain; helicase C-ter – helicase C-terminal domain

Характеристика пациентов с нейробластомой (НБ) старше 10 лет
 Characteristics of patients with neuroblastoma (NB) older than 10 years

Пациент Patient	Пол Gender	Возраст на момент диагноза, лет Diagnosis age, years	Локализация первичного очага Primary tumor location	Стадия по INSS stage	Группа риска по протоко- лу NB2004 Risk group according to the NB2004 protocol	Статус MYCN (FISH) (FISH) status (FISH)	Статус 1p 1p status	Статус 11q 11q status	Неблагопри- ятное событие Adverse event	Исход Out- come	Дефекты в гене <i>ATRX</i> ** <i>ATRX</i> gene defects**	Нуклеотидные варианты в других генах** Nucleotide variants in the other genes**
1 [§]	Ж F	41,1	Н/д N/d	Н/д N/d	Н/д N/d	N [#]	Делеция [#] Deletion [#]	Делеция [#] Deletion [#]	Н/д N/d	Н/д N/d	<i>ATRX</i> p.V1678F (32 %)	<i>ATM</i> p.E1822* (36 %)
2	М M	14,4	Забрюшинное пространство Retroperitoneal	4	ВР HR	N	N	N	Нет No	Жив Alive	Делеция экзонов 4–12 (субклональный вариант) Exons 4–12 delation (subclonal variant)	<i>ALK</i> p.F1174I (14 %)
3	Ж F	10,4	Забрюшинное пространство Retroperitoneal	4	ВР HR	N	Н/д N/d	N	Нет No	Жив Alive	Делеция гена (моносомия X) Gene delation (monosomy X)	<i>ALK</i> p.F1174L (16 %)
4	М M	13,5	Надпочечник Adrenal gland	4	ВР HR	Ампли- фикация Amplifi- cation	Делеция Deletion	N	Системный рецидив Systemic relapse	Умер Died	Делеция гена Gene delation	Нет No
5	М M	12,2	Забрюшинное пространство Retroperitoneal	4	ВР HR	N	N	Н/д N/d	Системная прогрессия Systemic progression	Жив Alive	Делеция экзонов 4–10 Exons 4–10 delation	<i>ALK</i> p.R1275Q (23 %)
6	М M	13,7	Забрюшинное пространство Retroperitoneal	4	ВР HR	N	N	N	Нет No	Жив Alive	Делеция гена Gene delation	Нет No
7	М M	13,4	Надпочечник Adrenal gland	3	ПР IR	N	N	N	Системный рецидив Systemic relapse	Жив Alive	<i>ATRX</i> p.S213* (67 %), делеция гена (субкло- нальный вариант) <i>ATRX</i> p.S213* (67 %), gene delation (subclonal variant)	<i>BRAF</i> p.K601E (23 %)

Окончание таблицы
The end of table

Пациент Patient	Пол Gender	Возраст на момент диагноза, лет Diagnosis age, years	Локализация первичного очага Primary tumor location	Стадия по INSS INSS stage	Группа риска по протоко- лу NB2004 Risk group according to the NB2004 protocol	Статус MYCN (FISH) MYCN status (FISH)	Статус 1p 1p status	Статус 11q 11q status	Неблагопри- ятное событие Adverse event	Исход Out- come	Дефекты в гене <i>ATRX</i> ** <i>ATRX</i> gene defects**	Нуклеотидные варианты в других генах** Nucleotide variants in the other genes**
8	Ж F	11,0	Мультифо- кальная НБ Multifocal NB	4	ВР HR	N	N	Делеция Deletion	Нет No	Жив Alive	<i>ATRX</i> p.N21251 (51 %), делеция гена (моносомия X) <i>ATRX</i> p.N21251 (51 %), gene delation (monosomy X)	<i>ATP7B</i> p.A1133Qfs*13 (32 %)
9	Ж F	12,5	Надпочечник Adrenal gland	1	ВР HR	Ампли- фикация Amplific- ation	N	N	Нет No	Жив Alive	Делеция гена Gene delation	Нет No
10*	Ж F	10,4	Надпочечник Adrenal gland	4	ВР HR	N	N	Делеция Deletion	Нет No	Жив Alive	Нет No	Нет No
11	М M	13,3	Средостение Posterior mediastinum	2	НР LR	N	N	Н/д N/d	Системная прогрессия Systemic progression	Жив Alive	Делеция гена (субкло- нальный вариант) Gene delation (subclonal variant)	<i>FANCD2</i> p.G333* (11 %), <i>FANCD2</i> p.W364* (24 %), <i>FANCD2</i> c.696-1G>A (19 %), <i>NRAS</i> p.Q61L (29 %)
12	Ж F	14,3	Забрюшинное пространство Retroperitoneal	2	НР LR	N	N	N	Системная прогрессия Systemic progression	Жив Alive	Делеция гена (моносомия X) Gene delation (monosomy X)	<i>TP53</i> p.S127_Q128insP (56 %)

* Гистологический тип — смешанная ганглионеуробластома. ** Для нуклеотидных вариантов указана доля альтернативного аллеля (%). § Единственный взрослый пациент (старше 18 лет) в исследуемой группе выбыл из-под наблюдения. * Результаты мультиплексной лигазозависимой амплификации (multiplex ligation-dependent amplification, MLLPA).

Примечание. Ж — женский пол; М — мужской пол; Н/д — нет данных; N — норма; ВР — группа высокого риска; ПР — группа промежуточного риска; НР — группа низкого риска (наблюдения); INSS — International Neuroblastoma Staging System, Международная система оценки стадии при нейробластоме.

* Histological type — mixed ganglioneuroblastoma. ** The proportion of the alternative allele is indicated for nucleotide variants (%). § The only adult patient (over 18 years old) in the study group, lost to follow-up.

* Multiplex ligation-dependent amplification (MLLPA) results.

Note. F — female; M — male; N/d — no data; N — normal; HR — high risk; IR — intermediate risk; LR — low risk (observation); INSS — International Neuroblastoma Staging.

выбыл из-под наблюдения. Напротив, отсутствие нуклеотидных вариантов в компонентах патогенетически значимых путей RAS-RAF-МЕК и p53 связано с меньшей вероятностью прогрессирования заболевания (1/5; 20 %), однако различия не были статистически значимыми ($p = 0,12$).

Интересным представляется отсутствие неблагоприятных событий у 2 пациентов с заболеванием IV стадии с делециями гена *ATRX* и миссенс-мутациями в тирозинкиназном домене *ALK*, получавших *ALK*-ингибиторы в 1-й линии терапии. Период наблюдения составил 32 и 34 мес.

ОБСУЖДЕНИЕ

Подростковая/взрослая НБ по своим клиническим и биологическим характеристикам значительно отличается от опухолей, возникающих в раннем возрасте, в той же мере, в которой различаются НБ у детей младше и старше 18 мес. При этом возрастной порог смены биологии НБ в детском возрасте определен довольно однозначно. Молекулярно-генетическими маркерами опухолей данных типов являются хромосомные aberrации — количественные, характерные для благоприятных НБ, и сегментарные — характерные для агрессивных. Единого мнения о втором возрастном пороге, после которого биология НБ вновь кардинально меняется, нет. В исследовании V.F. Lasorsa и соавт. показано, что профиль сегментарных хромосомных aberrаций в опухолях, манифестировавших до и после 6 лет, значительно различается [12]. Однако при изучении выживаемости пациентов введение возрастного порога в 6 лет не позволяло разделить больных, прогноз у которых был различен [13]. На данный момент согласно периодизации возраста Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), большинство исследователей определяют НБ подросткового возраста при манифестации заболевания в 10–18 лет и НБ взрослых — при дебюте заболевания в возрасте старше 18 лет.

Стандартное лечение с использованием цитостатических препаратов подростковой НБ обычно неэффективно. Течение заболевания носит прогрессивный характер, часто возникают последовательные эпизоды прогрессии опухоли. В то же время события могут развиваться через длительный промежуток времени, который иногда занимает годы. Бурная опухольная прогрессия не характерна для НБ подросткового возраста. Клиническое поведение НБ у пациентов старше 10 лет отличается неблагоприятным течением как при локализованных, так и при метастатических формах заболевания. Феномен спонтанной регрессии или созревания НБ в данной возрастной группе не описан, поэтому наличие резидуальной опухоли (в том числе микроскопической) после хирургического лечения является фактором риска развития рецидива заболевания [14]. Амплификация гена *MYCN* в клетках подростковой НБ встречается редко (до 9 %

случаев) и не может объяснить агрессивное течение заболевания [5, 15]. В нашем исследовании встречаемость амплификации гена *MYCN* оказалась больше, чем в других исследованиях, — в 2 (17 %) случаях, что связано с немногочисленностью и селективностью выборки. У всех больных опухоль имела значительное количество сегментарных хромосомных aberrаций. Наиболее часто встречались делеции 1p (80 % случаев), 11q (67 % случаев), 3p (80 % случаев) и 4p (56 % случаев) и увеличение числа копий 17q (62,5 % случаев). Более частое выявление делеции 11q и увеличения числа копий 17q в группе больных НБ старше 10 лет, описанное в литературе, подтверждено с помощью MLPA.

В литературе, посвященной генетическому профилю подростковой НБ, сообщалось о значительном превалировании дефектов в генах *ATRX* и *ALK* [8, 9, 15]. В нашей когорте aberrации гена *ATRX* выявлены в 92 % случаев. С учетом значительно более редкой встречаемости аномалий *ATRX* у больных НБ младшего возраста и патогенетического значения этих нарушений наличие инактивирующих молекулярно-генетических событий в данном гене может рассматриваться как маркер специфического клинико-биологического феномена — подростковой НБ. На наш взгляд, именно дефекты *ATRX* могут стать «водоразделом», позволяющим осуществлять дифференциальную диагностику типичных и подростковых опухолей, аналогично тому, как несбалансированные хромосомные aberrации дают возможность разделить благоприятные и неблагоприятные НБ у пациентов младшего возраста.

Ген *ATRX* локализуется в локусе 21.1q на X-хромосоме и состоит из 35 экзонов. Белок, кодируемый этим геном, содержит домен АТФазы/хеликазы и принадлежит к семейству факторов ремоделирования хроматина. Герминальные мутации в этом гене связаны с X-сцепленным синдромом, проявляющимся когнитивными нарушениями, а также альфа-талассемией. Патогенные варианты в гене *ATRX* вызывают разнообразные изменения в характере метилирования ДНК, что может объяснить патогенетическую связь между ремоделированием хроматина, метилированием ДНК и экспрессией генов в процессе развития [16].

Согласно данным базы Genomic Data Commons (GDC) Национального института рака США (National Cancer Institute, NCI) (по состоянию на 8 октября 2023 г.), ген *ATRX* входит в 20 генов, в которых наиболее часто возникают соматические мутации при различных видах злокачественных опухолей. Онкогенные соматические варианты в этом гене встречаются при гистогенетически различных опухолях, в том числе при глиомах низкой и высокой степеней злокачественности, остеосаркомах, НБ и нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы. Мутации в гене *ATRX* включают точечные мутации в кодирующих областях и делеции/инсерции со сдвигом рамки считывания, которые приводят к функциональной потере

белка [17]. Помимо обнаруженных точечных мутаций и инделов в гене *ATRX* описаны крупные делеции, приводящие к выпадению нескольких экзонов, не сопровождающиеся сдвигом рамки считывания белка. В дефектных белках отсутствуют несколько важных доменов взаимодействия с хроматином, что способствует развитию агрессивной НБ за счет aberrантной реорганизации хроматина и нарушений регуляции транскрипции [16].

Показано, что делеции и мутации в гене *ATRX* являются отличительными чертами 90 % клеточных линий, иммортализованных за счет активации альтернативных механизмов поддержания длины теломер (alternative lengthening of telomeres, ALT) [18]. Более того, обнаружено, что мутации в гене *ATRX* являются взаимоисключающими с перестройками в промоторе гена каталитической субъединицы теломеразы (*TERT*), которые увеличивают экспрессию теломеразы и запускают классический путь удлинения теломерных повторов [19, 20]. Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что ген *ATRX* является супрессором ALT и играет большую роль в онкогенезе. При этом исследования *in vitro* продемонстрировали, что выключения функции белка *ATR*X недостаточно для запуска ALT, однако наличие дефекта гена *ATR*X является обязательным условием ALT [21].

Кроме того, одной из функций белка *ATR*X является обеспечение стабильности генома за счет предотвращения образования вторичных структур ДНК (R-петель и G4-квадруплексов), поддержания гетерохроматина теломерных и центромерных локусов, мобильных элементов генома и других регионов «проблемных» для репликации и склонных к образованию вторичных структур. Напротив, *ATR*X поддерживает состояние эухроматина сайтов связывания Zn^{2+} транскрипционных факторов и GC-богатых генов, тем самым он обеспечивает экспрессию последних. Таким образом, *ATR*X-опосредованное поддержание состояний эухроматина или гетерохроматина зависит от геномного контекста. Поддержание повторяющихся областей в гетерохроматическом состоянии имеет решающее значение для предотвращения aberrантной транскрипции, которая чревата развитием репликативного стресса (остановки репликационной вилки) и может угрожать целостности генома [21].

Одной из важнейших функций *ATR*X также является защита клеток от репликационного стресса, опосредованного формированием вторичных структур ДНК, который может блокировать репликацию или транскрипцию, что приводит к коллапсу репликационной вилки. Мутации в гене *ATR*X при НБ увеличивают репликативный стресс и вызывают повреждения ДНК. В свою очередь, повышение уровня белка N-тус вызывает метаболическое перепрограммирование, митохондриальную дисфункцию, выработку активных форм кислорода, которые также способствуют репликативному стрессу и повреждению ДНК. В условиях

модельного эксперимента показано, что стресс репликации ДНК, вызванный инактивацией *ATR*X и амплификацией *MYCN*, несовместим с жизнью клетки (синтетическая летальность). Это редкий случай, когда инактивация гена-супрессора опухоли и активация онкогена несовместимы [16].

Тем не менее в нашей когорте выявлены 2 случая сочетания амплификации гена *MYCN* и делеции гена *ATR*X. Согласно данным литературы, синтетическая летальность может быть преодолена за счет активации генов, снижающих окислительный стресс (*CUX2*), и фармакологических агентов, индуцирующих дифференцировку (ретиноевая кислота) или снижающих уровень продукции активных форм кислорода (N-ацетилцистеин) [22]. Кроме того, два опухолевых субклона с разными генетическими дефектами могут сосуществовать в одной опухоли в рамках внутриопухолевой гетерогенности.

Предложенная S. Ackermann и соавт. патогенетическая классификация НБ предполагает относить к группе высокого риска пациентов, у которых опухолевые клетки приобретают репликативную иммортализацию за счет канонического или альтернативного пути удлинения теломер. Дополнительное выявление мутаций в генах, кодирующих компоненты сигнальных путей RAS-RAF-MEK и p53, определяет крайне неблагоприятный прогноз и фенотип НБ ультравысокого риска [23]. Сочетание aberrаций в гене *ATR*X с генетическими нарушениями, приводящими к дисфункции указанных выше сигнальных путей, в нашем исследовании также было сопряжено с наивысшим риском развития неблагоприятного события. С учетом большой частоты выявления активирующих мутаций в гене *ALK* среди подростков с НБ интенсификация терапии за счет применения ингибиторов *ALK* представляется оправданной: у 2 пациентов, получавших молекулярно-направленную терапию, не выявлены признаки прогрессирования заболевания при сроке наблюдения, превышающем медиану времени до прогрессирования в нашей когорте больных.

Белок *ATR*X принимает участие в репарации двуниевых разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации. Инактивация гена *ATR*X в клетках опухоли может приводить к развитию феномена, схожего с дефицитом гомологичной рекомбинации, который можно использовать терапевтически [20]. На данный момент нет клинических исследований, подтверждающих результативность молекулярно-направленной терапии опухолей с дефектами *ATR*X. В доклинических исследованиях показана эффективность применения PARP-ингибиторов, особенно в сочетании с ионизирующим излучением, алкилирующими агентами или ингибиторами топоизомеразы [21, 24]. Обсуждается потенциальная роль препаратов, используемых в настоящее время в клинической практике: ингибиторов HDAC, киназы *Aurora* и ингибиторов *EZH2* [24]. Однако механизм их действия при *ATR*X-дефицитных опухолях

носит опосредованный характер; эффективность данных препаратов в клинических исследованиях подтверждена не была. Перспективным представляется применение ингибиторов АТМ для воздействия на опухоль с дефектом *ATRX*. В условиях дефицита гомологичной рекомбинации ответ на двунитевые повреждения ДНК осуществляется за счет оси АТМ—СНК2-p53. Блокирование данного пути может привести к переключению процесса репарации ДНК на негомологичное объединение концов (nonhomologous end joining), нарастанию геномной нестабильности и синтетической летальности [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клиническое поведение НБ в детском и более старшем возрасте значительно различаются. Для НБ, возникшей в более старшем возрасте, характерно индолентное течение со склонностью к прогрессированию. Биологические особенности и клиническая агрессивность подростковой/взрослой НБ могут быть объяснены репликативной иммортализацией клеток за счет альтернативного пути поддержания длины теломера. Маркером и важным условием реализации данного феномена являются инактивирующие аберрации

в гене *ATRX* (делеции или нуклеотидные варианты), сопровождающиеся экспрессионным репрограммированием, блоком дифференцировки и нарастающей геномной нестабильностью. Дефекты гена *ATRX* могут стать маркером, обеспечивающим объективизацию смены биологии опухоли при переходе от классической НБ раннего возраста к подростковой НБ и важным дифференциально-диагностическим критерием.

Очевидно, что существующие подходы к стратификации пациентов с НБ на группы риска, хорошо зарекомендовавшие себя у больных раннего возраста, неприменимы в возрастной группе старше 10 лет и нуждаются в новой молекулярно-биологической классификации с учетом изменений в гене *ATRX*. Для лечения пациентов старше 10 лет необходимо разработать терапевтические рекомендации, при этом особое внимание должно быть уделено не только интенсификации стандартного лечения, но и применению молекулярно-направленной терапии. В настоящий момент при выявлении соответствующей молекулярно-генетической мишени единственным способом интенсификации классической терапии является применение ингибиторов ALK, эффективность и безопасность которых подтверждена клиническими исследованиями.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- London W.B., Castleberry R.P., Matthay K.K. et al. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2005;23(27):6459–65. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.571
- Esiashvili N., Goodman M., Ward K. et al. Neuroblastoma in adults: Incidence and survival analysis based on SEER data. *Pediatr Blood Cancer* 2007;49(1):41–6. DOI: 10.1002/pbc.20859
- Rogowitz E., Babiker H.M., Kanaan M. et al. Neuroblastoma of the elderly, an oncologist's nightmare: case presentation, literature review and SEER database analysis. *Exp Hematol Oncol* 2014;3:20. DOI: 10.1186/2162-3619-3-20
- Allan S.G., Cornbleet M.A., Carmichael J. et al. Adult neuroblastoma. Report of three cases and review of the literature. *Cancer* 1986;57(12):2419–21. DOI: 10.1002/1097-0142(19860615)57:12<2419::aid-cnrcr2820571228>3.0.co;2-v
- Mosse Y.P., Deyell R.J., Berthold F. et al. Neuroblastoma in older children, adolescents and young adults: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61(4):627–35. DOI: 10.1002/pbc.24777
- Друй А.Е., Цаур Г.А., Шориков Е.В. и др. Прогностическое значение амплификации гена *MYCN*, делеции короткого плеча хромосомы 1 и делеции длинного плеча хромосомы 11 у пациентов с нейробластомой. *Педиатр* 2013;4(1):41–8.
- Друй А.Е., Тсаур Г.А., Шориков Е.В. et al. Prognostic impact of *MYCN* amplification, 1p deletion and 11q deletion in neuroblastoma patients. *Pediatr = Pediatrician* 2013;4(1):41–8. (In Russ.).
- Berbegall A.P., Villamón E., Tadeo I. et al. Neuroblastoma after childhood: prognostic relevance of segmental chromosome aberrations, *ATRX* protein status, and immune cell infiltration. *Neoplasia* 2014;16(6):471–80. DOI: 10.1016/j.neo.2014.05.012
- Suzuki M., Kushner B.H., Kramer K. et al. Treatment and outcome of adult-onset neuroblastoma. *Int J Cancer* 2018;143(5):1249–58. DOI: 10.1002/ijc.31399
- Cheung N.K., Zhang J., Lu C. et al. Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA* 2012;307(10):1062–71. DOI: 10.1001/jama.2012.228
- Казанцев И.В., Геворгян А.Г., Юхта Т.В. и др. Особенности клинического течения и биологических характеристик нейробластомы у подростков и молодых взрослых. Описание серии клинических случаев и обзор литературы. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2020;7(3):13–21. Kazantsev I.V., Gevorgyan A.G., Yukhta T.V. et al. Clinical and biological characteristics of neuroblastoma in adolescents and young adults. Case study and literature review. *Rossiiskij zhurnal detskoi gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2020;7(3):13–21. (In Russ.).
- Ambros I.M., Brunner B., Aigner G. et al. A multilocus technique for risk evaluation of patients with neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2011;17(4):792–804. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0830
- Lasorsa V.A., Cimmino F., Ognibene M. et al. 19p loss is significantly enriched in older age neuroblastoma patients and correlates with poor prognosis. *NPJ Genom Med* 2020;5:18. DOI: 10.1038/s41525-020-0125-4
- Conte M., Parodi S., De Bernardi B. et al. Neuroblastoma in adolescents: the Italian experience. *Cancer* 2006;106(6):1409–17. DOI: 10.1002/cncr.21751
- Ryan A.L., Akinkuotu A., Pierro A. et al. The role of surgery in high-risk neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2020;42(1):1–7. DOI: 10.1097/MPH.0000000000001607
- Mazzocco K., Defferrari R., Sementa A.R. et al. Genetic abnormalities in adolescents and young adults with neuroblastoma: a report from the Italian Neuroblastoma group. *Pediatr Blood Cancer* 2015;62(10):1725–32. DOI: 10.1002/pbc.25552
- Pang Y., Chen X., Ji T. et al. The chromatin remodeler *ATRX*: role and mechanism in biology and cancer. *Cancers* 2023;15(8):2228. DOI: 10.3390/cancers15082228

17. Wiestler B., Capper D., Holland-Letz T. et al. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathol* 2013;126(3):443–51. DOI: 10.1007/s00401-013-1156-z
18. Lovejoy C.A., Li W., Reisenweber S. et al. Loss of ATRX, genome instability, and an altered DNA damage response are hallmarks of the alternative lengthening of telomeres pathway. *PLoS Genet* 2012;8:e1002772. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002772
19. Killela P.J., Reitman Z.J., Jiao Y. et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(15):6021–6. DOI: 10.1073/pnas.1303607110
20. Peifer M., Hertwig F., Roels F. et al. Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature* 2015;526(7575):700–4. DOI: 10.1038/nature14980
21. Aguilera P., López-Contreras A.J. ATRX, a guardian of chromatin. *Trends Genet* 2023;39(6):505–19. DOI: 10.1016/j.tig.2023.02.009
22. Zeineldin M., Federico S., Chen X. et al. MYCN amplification and ATRX mutations are incompatible in neuroblastoma. *Nat Commun* 2020;11(1):913. DOI: 10.1038/s41467-020-14682-6
23. Ackermann S., Cartolano M., Hero B. et al. A mechanistic classification of clinical phenotypes in neuroblastoma. *Science* 2018;362(6419):1165–70. DOI: 10.1126/science.aat6768
24. George S.L., Lorenzi F., King D. et al. Therapeutic vulnerabilities in the DNA damage response for the treatment of ATRX mutant neuroblastoma. *EBioMedicine* 2020;59:102971. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102971
25. Qin T., Mullan B., Ravindran R. et al. ATRX loss in glioma results in dysregulation of cell-cycle phase transition and ATM inhibitor radio-sensitization. *Cell Rep* 2022;38(2):110216. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.110216

Вклад авторов

Н.А. Андреева: написание текста статьи, обзор литературы по теме статьи;
Т.В. Шаманская, Д.Ю. Качанов: научное редактирование;
Н.В. Гегелия, Р.Х. Абасов: анализ и интерпретация данных;
А.Е. Друй: анализ и интерпретация данных, научное редактирование.

Authors' contributions

N.A. Andreeva: article writing, a review of the literature on the topic of the article;
T.V. Shamanskaya, D.Yu. Kachanov: scientific editing;
N.V. Gegeliya, R.H. Abasov: data analysis and interpretation;
A.E. Druy: data analysis and interpretation, scientific editing.

ORCID авторов / ORCID authors

Н.А. Андреева / N.A. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0001-5626-218X>
Т.В. Шаманская / T.V. Shamanskaya: <https://orcid.org/0000-0002-3767-4477>
Д.Ю. Качанов / D.Yu. Kachanov: <https://orcid.org/0000-0002-3704-8783>
Р.Х. Абасов / R.Kh. Abasov: <https://orcid.org/0000-0001-9179-8430>
Н.В. Гегелия / N.V. Gegeliya: <https://orcid.org/0000-0001-6208-6557>
А.Е. Друй / A.E. Druy: <https://orcid.org/0000-0003-1308-8622>

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке фонда «Наука – детям».
Funding. The study was carried out with the support of the Science for Children Foundation.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен независимым этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the independent ethics committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia.

Статья поступила: 11.12.2023. **Принята к публикации:** 18.03.2024.
Article submitted: 11.12.2023. **Accepted for publication:** 18.03.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-116-129>

Модуляция активности генов гомологичной рекомбинации в опухолевых клетках молочной железы в модели *in vitro*

М.М. Цыганов^{1,2}, А.А. Фролова¹, Е.А. Кравцова¹, И.А. Цыденова¹, М.К. Ибрагимова^{1,2}

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

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

Контакты: Матвей Михайлович Цыганов TsyganovMM@yandex.ru

Введение. Установлено, что наличие дефицита гомологичной рекомбинации в опухоли молочной железы связано с эффективностью лечения. При этом, несмотря на высокую химиочувствительность опухоли к ДНК-повреждающим агентам, полные патологические ответы на лечение очень редки. В основе этого процесса может лежать изменение соматического статуса *BRCA1*, т. е. происходят реверсия и возвращение аллеля дикого типа и восстановление функции репарации ДНК.

Цель исследования – оценить изменения хромосомных aberrаций и экспрессионного профиля основных генов гомологичной рекомбинации в клеточных моделях рака молочной железы под действием цисплатина и доцетаксела.

Материалы и методы. Исследование проведено на культурах опухолевых клеток рака молочной железы MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468. Модель лекарственной устойчивости на клетках была получена для двух препаратов – цисплатина и доцетаксела. Из клеточной суспензии РНК и ДНК выделяли с помощью наборов RNeasy Plus Mini Kit и QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) соответственно. Уровень экспрессии генов гомологичной рекомбинации оценивали с использованием обратнo-транскриптазной количественной полимеразной цепной реакции. Для определения наличия хромосомных aberrаций проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах.

Результаты. Показано восстановление нормальной копийности генов *BRCA1*, *CDK12*, *CHEK1* и *RAD51D* в MCF-7 под действием цисплатина. Для *BRCA2* и *PALB2* обнаружено появление амплификаций. Также продемонстрировано статистически значимое увеличение экспрессии генов *BRCA1* ($p = 0,04$), *BRCA2* ($p = 0,02$), *PALB2* ($p = 0,01$) и *RAD51D* ($p = 0,05$). В MDA-MB-231 показано, что все выявленные локусы с делециями, где локализованы гены *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2* и *RAD54L*, под действием цисплатина восстанавливаются до нормальной копийности. Появление амплификаций зарегистрировано для генов *BRCA1*, *BRIP1*, *FANCL*, *RAD51B* и *PARP1*. Аналогичный результат показан для доцетаксела. Увеличение уровня экспрессии характерно для генов *BRCA1* ($p = 0,02$), *BRCA2* ($p = 0,02$), *CHEK2* ($p = 0,05$), *FANCL* ($p = 0,04$), *PALB2* ($p = 0,05$), *RAD51C* ($p = 0,02$) и *PARP1* ($p = 0,02$), что соответствует появлению амплификаций. В клеточной культуре MDA-MB-468 наблюдалось увеличение копийности только гена *BRCA1*. Действие доцетаксела полностью не оказывало влияния на данную клеточную культуру. Уровень экспрессии гена *BRCA1* повышался прямо пропорционально длительности действия препарата.

Заключение. Таким образом, проведенное исследование показало, что под действием цисплатина может происходить реверсия не только мутаций генов гомологичной рекомбинации, но и других нарушений.

Ключевые слова: рак молочной железы, клеточные культуры, BRCAness, дефицит гомологичной рекомбинации, экспрессия, делеция, амплификация, реверсия

Для цитирования: Цыганов М.М., Фролова А.А., Кравцова Е.А. и др. Модуляция активности генов гомологичной рекомбинации в опухолевых клетках молочной железы в модели *in vitro*. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):116–29.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-116-129>

Modulation of homologous recombination gene activity in breast tumor cells in an *in vitro* model

M.M. Tsyganov^{1,2}, A.A. Frolova¹, E.A. Kravtsova¹, I.A. Tsydenova¹, M.K. Ibragimova^{1,2}

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

²Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moscow Trakt, Tomsk 634050, Russia

Contacts: Matvey Mikhailovich Tsyganov TsyganovMM@yandex.ru

Introduction. It has been established that the presence of homologous recombination deficiency in a breast tumor is associated with the effectiveness of treatment. But despite the high chemosensitivity of the tumor to DNA-damaging agents, complete pathological responses to treatment are very rare. And this process may be based on a change in the somatic status of *BRCA1*, that is, a reversion and return of the wild-type allele occurs and the DNA repair function is restored.

Aim. To evaluate changes in the presence of chromosomal aberrations and the expression profile of the main genes of homologous recombination in cell models of breast cancer under the influence of cisplatin and docetaxel.

Materials and methods. The study was conducted on breast cancer tumor cell cultures: MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468. A cell model of drug resistance was obtained for two drugs: cisplatin and docetaxel. RNA and DNA were isolated from cell suspension using the RNeasy Plus Mini Kit and QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany), respectively. The expression level of homologous recombination genes was assessed using reverse transcription polymerase chain reaction. To assess the presence of chromosomal aberrations, microarray analysis was performed on DNA chips.

Results. Restoration of normal copy number for the *BRCA1*, *CDK12*, *CHEK1* and *RAD51D* genes in MCF-7 under the influence of cisplatin was shown. For *BRCA2* and *PALB2*, amplifications were detected. A statistically significant increase in the expression of the *BRCA1* ($p = 0.04$), *BRCA2* ($p = 0.02$), *PALB2* ($p = 0.01$) and *RAD51D* ($p = 0.05$) genes was also shown. MDA-MB-231 shows that all identified loci with deletions, where the *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2* and *RAD54L* genes are localized, are restored to normal copy number by cisplatin. The appearance of amplifications was registered for *BRCA1*, *BRIP1*, *FANCL*, *RAD51B*, *PARP1*. A similar result was shown for docetaxel. An increase in the expression level is typical for the genes *BRCA1* ($p = 0.02$), *BRCA2* ($p = 0.02$), *CHEK2* ($p = 0.05$), *FANCL* ($p = 0.04$), *PALB2* ($p = 0.05$), *RAD51C* ($p = 0.02$), *PARP1* ($p = 0.02$), which corresponds to the appearance of amplifications. In the MDA-MB-468 cell culture, an increase in the copy number of only the *BRCA1* gene is observed. The effect of docetaxel has no effect on this cell culture. The level of *BRCA1* expression increases in direct proportion to the duration of drug action.

Conclusion. Thus, the study showed that under the influence of cisplatin, reversion of not only homologous recombination gene mutations, but also other disorders can occur.

Keywords: breast cancer, cell cultures, BRCAness, homologous recombination deficiency, expression, deletion, amplification, reversion

For citation: Tsyganov M.M., Frolova A.A., Kravtsova E.A. et al. Modulation of homologous recombination gene activity in breast tumor cells in an *in vitro* model. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(2):116–29. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-116-129>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время диагностика, лечение и профилактика рака молочной железы (PMЖ) у носителей мутаций генов *BRCA1* или *BRCA2* имеют ряд особенностей по сравнению с пациентами со спорадическим PMЖ. Рак данной локализации, фенотипически и генетически схожий с наследственной формой (*BRCA1*-ассоциированным PMЖ), обозначается как BRCAness (BRCA-подобные опухоли) [1]. При этом тактика лечения семейной формы PMЖ на сегодняшний день определена. Пациенты, имеющие герминальные мутации, обладают высокой чувствительностью к препаратам платины. Так, результаты последних метаанализов показали, что у больных с мутацией в гене *BRCA1/2*, которым проведена платиносодержащая неоадъювантная химиотерапия (ХТ), частота объективных ответов была значительно выше (отношение рисков (ОР) 1,91; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,48–2,47; $p < 0,00001$; $P = 32$ %), как и показатели выживаемости без прогрессирования (ОР 1,13; 95 % ДИ 0,81–1,57; $p = 0,47$; $P = 0$ %) и общей выживаемости (ОР 1,89; 95 % ДИ 1,22–2,92; $p = 0,004$; $P = 0$ %) [2].

Как правило, для лечения пациентов без герминальных мутаций используется стандартная тактика лечения, которая не всегда может быть эффективной. Тем не менее установлено, что в предполагаемых подгруппах BRCAness, т. е. у больных с дефицитом гомологичной рекомбинации (ГР), может наблюдаться чувствительность к платине и/или другим ДНК-повреждающим агентам. При этом предполагается, что расширение механизмов формирования BRCA-подобных опухолей в процессе канцерогенеза и прогрессии делает опухоли чувствительными к ДНК-повреждающим агентам; это перестает быть «выгодным» опухоли при воздействии химиопрепаратов. Иначе говоря, под действием терапии механизмы BRCAness должны нарушаться, а резистентные клоны, лишённые дефицита *BRCA*, наоборот, формироваться. В исследовании А.Р. Sokolenko и соавт. [3] установлено, что, несмотря на высокую химиочувствительность и быстрое уменьшение опухоли яичника с герминальной мутацией *BRCA* после неоадъювантной ХТ, полные патологические ответы на лечение очень редки. Авторы показали, что в основе этого процесса может лежать изменение соматического статуса *BRCA1* [4].

При проведении неоадьювантной ХТ происходят реверсия и возвращение аллеля дикого типа гена, что вызывает восстановление функциональной активности *BRCA1* и формирование химиорезистентности опухоли, или под селективным действием соединений платины происходит пролиферация уже существующих клонов, несущих дикий аллель гена *BRCA1*.

Согласно нашей рабочей гипотезе, опухоли, в частности новообразования молочной железы, не обусловленные наличием герминальных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, обладают выраженной внутриопухолевой гетерогенностью в отношении соматического статуса данных генов и генов ГР в целом. В связи с этим под действием ХТ могут происходить элиминация чувствительных опухолевых клонов (например, с делециями генов ГР) и распространение и/или замещение уже существующих опухолевых клонов, несущих в себе амплификации генов ГР. Во втором случае возможно возникновение новых мутационных изменений в генах под селективным действием ХТ, в том числе амплификация локуса 17q21.31, содержащего ген *BRCA1*, даже если изначально в опухоли была его аллельная делеция. Таким образом, широкий спектр нарушений механизмов ГР делает опухоли все более чувствительными к ДНК-повреждающим агентам, и это перестает быть «выгодным» опухоли уже при непосредственном воздействии химиопрепаратов. Иначе говоря, под влиянием терапии механизмы BRCAness должны претерпевать обратные канцерогенезу процессы и будут нарушаться. За счет этого формируются резистентные клоны, лишенные дефицита *BRCA*, способные переживать повреждающую ДНК ХТ. И это может являться одним из первых механизмов восстановления функциональности *BRCA1*.

Цель исследования — оценка хромосомных aberrаций и экспрессионного профиля основных генов ГР в клеточных моделях РМЖ под действием цисплатина и доцетаксела.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на культурах опухолевых клеток РМЖ MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН Санкт-Петербург). После разморозки клетки культивировали в чашках Петри во влажной среде, содержащей 5 % CO₂, при температуре 37 °С. Для культивирования клеток использовали полные питательные среды RPMI-1640 и DMEM 1 г/л (ООО «ПанЭко», Россия), содержащие 10 % термоинактивированной фетальной телячьей сыворотки (Biosera, Франция) и 5 % антибиотика (пенициллина, стрептомицина) (ООО «ПанЭко», Россия). Перед 3-м пассажем при достижении 90 % конfluenceности оценивали жизнеспособность клеточных культур с помощью автоматического счетчика клеток Luna-II (Logos Biosystems, Корея) с последующим проведением экспериментов.

Определение полудетальной дозы. Для определения полудетальной дозы (ЛД₅₀) к препарату платины (цисплатин, 1 мг/мл, «Келун Казфарм», Казахстан) клетки культивировались в 96-луночных планшетах, куда при достижении 70 % конfluenceности добавляли цисплатин в концентрациях 10, 20, 30 и 40 мкг/мл. Жизнеспособность клеток измерена с помощью МТТ-теста через 24 ч после воздействия препаратом. Для этого к клеткам добавляли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид тетразолий (МТТ, ООО «ПанЭко», Россия) в конечной концентрации 5 мг/мл, затем клетки инкубировали в течение 4 ч. После инкубации осадок растворяли диметилсульфоксидом (ДМСО, ООО «ПанЭко», Россия) с последующим измерением оптической плотности полученных растворов с помощью спектрофотометра (Thermo Scientific Multiskan FC, США) на длине волны 620 нм и определяли процент жизнеспособных клеток относительно группы контроля (клетки без препарата).

Аналогичную процедуру проводили для препарата доцетаксел (1 мг/мл, новотакс, BIOCAD, Россия) в концентрациях 30, 35, 40, 45 и 50 мкг/мл. Для оценки пролиферативной активности клеток использовали систему многопараметрического анализа клеточных культур в режиме реального времени — RTCA iCELLigence. Для этого клетки вносили в планшеты (общее число лунок — 16, число лунок на группу — 4) в концентрации 40 тыс./лунку (объем лунки 700 мкл), затем инкубировали при 37 °С во влажной среде с 5 % CO₂ в течение 24 ч с фиксацией клеточного индекса каждый час. После окончания инкубации проводили анализ полученных данных с помощью программного обеспечения RTCA Data Analysis Software 1.0.

Разработка моделей химиорезистентного клона. Модель лекарственной устойчивости на клетках РМЖ была получена для двух препаратов — цисплатина и доцетаксела. Клетки линий MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468 высаживали в культуральные флаконы площадью 150 см² в концентрации от 500 тыс. до 1 млн в зависимости от скорости пролиферации. При достижении конfluenceности в 70 % к клеткам добавляли препараты в ранее определенной концентрации ЛД₅₀: цисплатин (10 и 40 мкг/мл), доцетаксел (40 мкг/мл). Инкубация с препаратом выполнялась в течение 24 ч, после чего осуществляли смену среды с последующим культивированием клеток до достижения 90 % конfluenceности (от 7 до 14 дней). Далее проводили снятие клеток и повторный посев в культуральные флаконы перед следующей обработкой препаратом.

Для создания клинической ситуации цикл обработки клеток препаратами в ЛД₅₀ повторяли 3 раза после восстановления клеточной пролиферации. В качестве контроля использовали необработанные клетки, содержащиеся в питательной среде с добавлением ДМСО. Повторение процедуры создания модели химиорезистентного клона для каждой клеточной линии выполняли не менее 3 раз.

Выделение РНК. После экспериментов суспензии опухолевых клеток помещали в раствор RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, США). Из клеточной суспензии с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany) выделяли РНК в соответствии с инструкцией производителя. Концентрация РНК измерялась с помощью флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрация составила от 50 до 100 нг/мкл. Целостность РНК оценивали с использованием капиллярного электрофореза на приборе Tape Station (Agilent Technologies, США) и набора R6K Screen Tape (Agilent Technologies, США). Индекс целостности РНК (RIN) составил 5,6–8,4.

Выделение ДНК. ДНК выделяли из опухолевых клеток с помощью набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрация ДНК измерялась с использованием флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, USA). Концентрация составила от 50 до 120 нг/мкл. Целостность ДНК оценивалась с помощью капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) с использованием набора Agilent Genomic DNA ScreenTape.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени. Уровень экспрессии генов *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDK12*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FANCL*, *PALB2*, *PPP2R2A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RAD54L*, *PARP1* оценивали с помощью обратнотранскрипционной количественной ПЦР в режиме реального времени по технологии TaqMan на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Австралия). Для оценки уровня экспрессии исследуемых генов были использованы коммерческие наборы праймеров и зондов («ДНК-синтез», Россия). Полимеразную цепную реакцию ставили в 3 репликах в объеме 15 мкл, содержащем 250 мкМ dNTPs (SibEnzyme, Россия); 300 нМ прямого и обратного праймеров; 200 нМ зонда; 2,5 мМ MgCl₂; 19 SE-буфер (67 мМ Tris-HCl pH 8,8 при 25 °C; 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,01 % Tween-20); 2,5 ед. HotStart Taq полимеразы (SibEnzyme, Россия) и 50 нг комплементарной ДНК (кДНК). Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл при 94 °C, 10 мин — предварительная денатурация; 40 циклов — 1-й шаг 10 с при 94 °C, и 2-й шаг — 20 с при 60 °C. В качестве референсных генов использовали 2 гена: *GAPDH* (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase) и *ACTB* (β-actin); уровень их экспрессии нормализовался по отношению к экспрессии данных генов в норме и измерялся в условных единицах. Относительная экспрессия генов оценена с помощью метода Pfaffl [5]. В качестве калибратора использовали усредненные данные по ПЦР, полученные от анализа РНК, выделенной из 30 образцов нормальной ткани молочной железы.

Микроматричный анализ. Для оценки наличия хромосомных aberrаций (CNA — copy number aberrations of DNA) выполняли микроматричный анализ на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности

CytoScan™ HD Array (Affymetrix, США), которые содержали 1 млн 900 тыс. непалиморфных маркеров для анализа aberrаций числа копий. Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, США). Для обработки результатов микрочипирования использовали программу Chromosome Analysis Suite 4.3 (Affymetrix, США). С ее помощью в хромосомах определяли несбалансированные хромосомные aberrации — делеции (loss) и амплификации (gain).

Поскольку в образцах опухолевой ткани обязательно присутствуют стромальные элементы и другие нормальные клетки, в полученной ДНК высок процент нормальной геномной ДНК. Микрочип CytoScan™ HD Array позволяет выявить 5 % и более мутантной ДНК. Мутантная опухолевая ДНК определялась на фоне нормальной ДНК. Процент мутантной ДНК — статус числа копий (CN-state) — колебался от 15 до 88 %. Нормальная копийность генов определялась как 2 копии на геном. Для делеций регистрировалась потеря 1 копии гена, для амплификации — увеличение копийности до 2 и 4 вариантов.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое и среднюю квадратичную ошибку. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения изменений спектра нарушений генов ГР при индукции резистентности к препаратам платины и таксанам условно были отобраны клеточные линии с наличием дефицита ГР (MCF-7 и MDA-MB-231) и без такового (MDA-MB-468) (табл. 1, 2). При отборе клеточных культур мы оценили наличие хромосомных aberrаций в исследуемых генах (см. табл. 1, 2) и их экспрессию в клеточных культурах РМЖ до воздействия химиопрепаратами (рис. 1).

Согласно данным, представленным в табл. 1 и 2, в клеточных культурах MCF-7 и MDA-MB-231 наблюдается наличие делеций в 31,2 % случаев (в том числе и в *BRCA1*), что также соотносится с экспрессионным портретом. MDA-MB-468 показано полное отсутствие делеций и наличие в 25 % случаев амплификаций генов *ATM*, *CHEK1*, *RAD54L* и *PARP1*, что также коррелирует с высокой экспрессией данных генов (см. рис. 1). Таким образом, согласно рабочей гипотезе в клеточной культуре с наличием дефицита ГР под действием препаратов будет происходить сужение спектра нарушений генов ГР и возможное развитие структурной и функциональной компенсаторности дефицита ГР, что приводит к развитию резистентности к ДНК-повреждающим агентам.

Таблица 1. Наличие хромосомных aberrаций в генах системы гомологичной рекомбинации в исследуемых клеточных культурах MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468

Table 1. Presence of chromosomal aberrations in the genes of the homologous recombination system in the studied cell cultures MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468

Ген Gene	MCF-7	MDA-MB-231	MDA-MB-468
<i>BRCA1</i>	Del	N	N
<i>BRCA2</i>	N	Del	N
<i>ATM</i>	Del	N	Ampl
<i>BARD1</i>	N	Del	N
<i>BRIP1</i>	Ampl	N	N
<i>CDK12</i>	Del	N	N
<i>CHEK1</i>	Del	N	Ampl
<i>CHEK2</i>	N	Del	N
<i>FANCL</i>	N	N	N
<i>PALB2</i>	N	Del	N
<i>PPP2R2A</i>	N	N	N
<i>RAD51B</i>	Ampl	N	N
<i>RAD51C</i>	Ampl	N	N
<i>RAD51D</i>	Del	N	N
<i>RAD54L</i>	N	Del	Ampl
<i>PARP1</i>	N	N	Ampl

Примечание. Del – делеция; n – нормальная копияность; ampl – амплификация.

Note. Del – deletion; n – normal copy number; ampl – amplification.

Таблица 2. Частота встречаемости aberrаций числа копий ДНК в исследуемых клеточных культурах MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468, абс. (%)

Table 2. Frequency of occurrence of DNA copy number aberrations in the studied cell cultures MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468, abs. (%)

Хромосомная aberrация Chromosomal aberration	MCF-7	MDA-MB-231	MDA-MB-468
Делеция Deletion	5 (31,2)	5 (31,2)	0 (0)
Нормальная копияность Normal copy number	8 (50,0)	11 (68,8)	12 (75,0)
Амплификация Amplification	3 (18,8)	0 (0)	4 (25,0)
Дефицит гомологичной рекомбинации Homologous recombination deficiency	Есть Yes	Есть Yes	Нет No

Далее проводилось создание модели химиорезистентного клона, для которой культуры клеток MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468 подвергались трем последовательным циклам обработки исследуемыми препаратами в ЛД₅₀. Каждый цикл включал 24-часовое культивирование клеток с химиотерапевтическими агентами. По истечении этого периода препарат удаляли, меняли питательную среду и культивировали клетки до достижения 90 % конfluence и повто-

рения цикла обработки. С помощью МТТ-теста и RTCA-iCELLigence предварительно были отобраны оптимальные дозы препаратов: ЛД₅₀ цисплатина для MCF-7 составила 10 мкг/мл, для MDA-MB-231 – 40 мкг/мл и для MDA-MB-468 – 20 мкг/мл, доцетаксела – 50, 50 и 40 мкг/мл соответственно. После воздействия препаратами наблюдалась значительная гибель клеток, что в конечном счете приводило к образованию отдельных колоний в течение нескольких дней. При

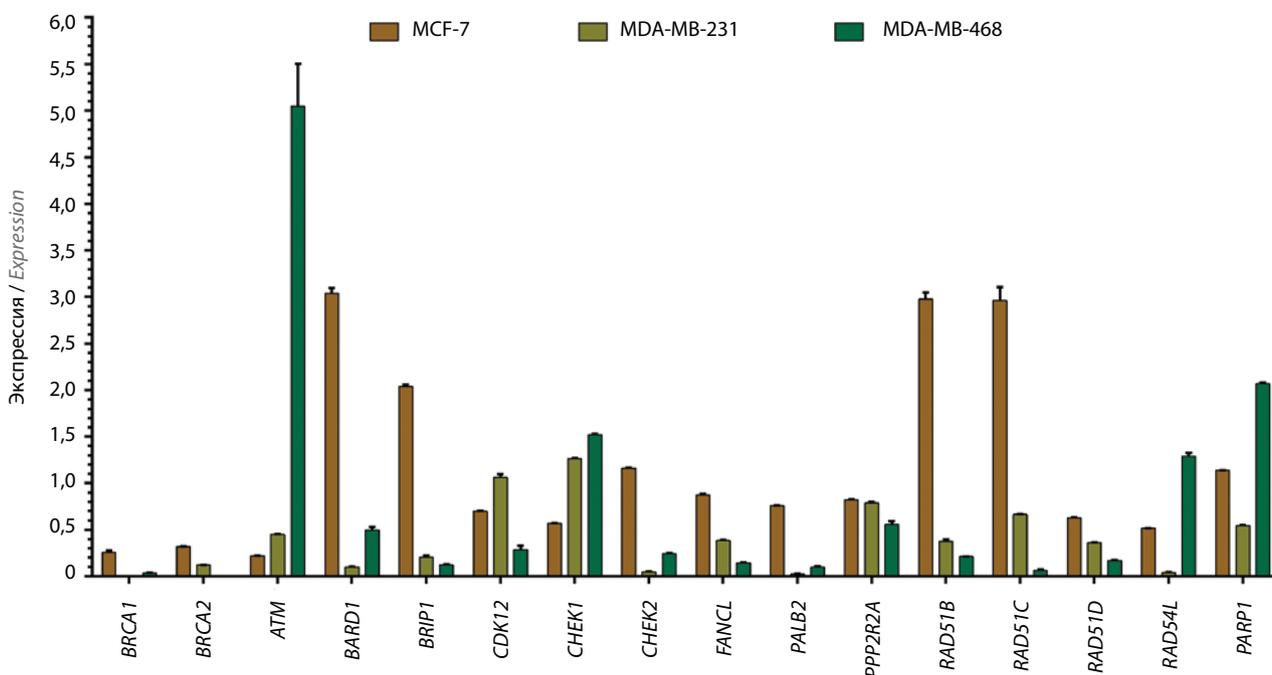


Рис. 1. Конститутивный уровень экспрессии генов системы гомологичной рекомбинации в исследуемых клеточных культурах
 Fig. 1. Initial level of expression of genes of the homologous recombination system in the studied cell cultures

достижении 90 % конfluenceности одну часть клеточной суспензии брали для анализа изменения активности генов ГР, а другую снова пересеивали в культуральные флаконы для повторения воздействия препаратами.

При анализе генетического ландшафта опухолевых клеток РМЖ обнаружены изменения, вызванные селективным действием химиопрепаратов. Установлено изменение aberrаций числа копий ДНК для генов *BRCA1*, *BRCA2*, *CDK12*, *CHEK1*, *PALB2* и *RAD51D* в MCF-7. Показано сужение спектра нарушений для *BRCA1*, *CDK12*, *CHEK1* и *RAD51D* (восстановление нормальной копийности). К 3-му пассажу обнаружены амплификации генов *BRCA2* и *PALB2* (табл. 3). Следует отметить, что доцетаксел не оказывал такого действия, и частота встречаемости делеций и амплификаций не изменялась за исключением гена *PARP1*, у которого в конечной точке наблюдалось появление делеции (табл. 4). Для MDA-MB-231 также был проведен аналогичный анализ, который тоже показал изменение хромосомных aberrаций генов системы ГР в сторону увеличения копийности (см. табл. 3). В частности, продемонстрировано, что все выявленные локусы с делециями, где локализованы гены *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2* и *RAD54L*, с течением времени под действием цисплатина восстанавливаются до нормальной копийности. При этом для остальных генов, например *BRCA1*, наблюдается увеличение копийности, так же как и для *BRIP1*, *FANCL*, *RAD51B* и *PARP1*. Для трех генов — *ATM*, *CHEK1* и *RAD51D* — характерно появление делеции. Следует отметить, что возникновение амплификаций в исследуемых генах наблюдалось сразу после 1-го пассажа и сохранялось на протяжении всего действия препарата, что «выгодно» опухолевым

клеткам и позволяет им быть более устойчивыми к повреждению ДНК. Аналогичный результат показан для доцетаксела (см. табл. 4). При этом частота амплификаций к 3-му пассажу оказалась выше (62,5 %) по сравнению с действием цисплатина (37,5 %). Делеции генов также восстанавливаются до нормальной копийности, кроме гена *CHEK2*, делеция в котором сохраняется на протяжении всего действия препарата.

В заключение была проанализирована клеточная культура опухолевых клеток молочной железы MDA-MB-468, в которой полностью отсутствовали делеции в генах ГР, в 4 генах наблюдались амплификации: *ATM*, *CHEK1*, *RAD54L*, *PARP1*, остальные гены имели нормальную копийность (см. табл. 3). Таким образом, согласно рабочей гипотезе под воздействием ДНК-повреждающих агентов изменение параметров исследуемых генов будет минимальным, поскольку опухолевые клетки не имеют дефицита в репаративной активности ДНК. В данном случае под влиянием цисплатина происходит увеличение копийности только гена *BRCA1*. Через 24 ч и после 1-го пассажа детектируются делеции в генах *PALB2* и *PPP2R2A*, но на 2-м и 3-м пассажах они элиминируются. Действие доцетаксела полностью не оказывает влияния на данную клеточную культуру (см. табл. 4).

Равно как и изменение CNA под действием препарата, изменяется и экспрессия исследуемых генов. Несмотря на то что данная величина вариабельна, наглядно было показано статистически значимое увеличение экспрессии генов *BRCA1* ($p = 0,04$), *BRCA2* ($p = 0,02$), *PALB2* ($p = 0,01$) и *RAD51D* ($p = 0,05$) от нативного варианта к 3-му пассажу в MCF-7. Это может свидетельствовать об активации процесса ГР (рис. 2, а). Причем при воздействии доцетаксела изменения экспрессии

Таблица 3. Наличие хромосомных aberrаций в генах системы гомологичной рекомбинации в клеточных культурах MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468 под действием цисплатина в разные промежутки воздействия препарата

Table 3. The presence of chromosomal aberrations in the genes of the homologous recombination system in cell cultures MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 under the influence of cisplatin at different periods of exposure to the drug

Ген Gen	MCF-7, цисплатин (10 мкг/мл) MCF-7, cisplatin (10 µg/ml)				MDA-MB-231, цисплатин (40 мкг/мл) MDA-MB-231, cisplatin (40 µg/ml)				MDA-MB-468, цисплатин (40 мкг/мл) MDA-MB-468, cisplatin (40 µg/ml)						
	Исходные CNA Original CNAs	Через 24 ч In 24 h	1-й пассаж Passage 1	2-й пассаж Passage 2	3-й пассаж Passage 3	Исходные CNA Original CNAs	Через 24 ч In 24 h	1-й пассаж Passage 1	2-й пассаж Passage 2	3-й пассаж Passage 3	Исходные CNA Original CNAs	Через 24 ч In 24 h	1-й пассаж Passage 1	2-й пассаж Passage 2	3-й пассаж Passage 3
<i>BRCA1</i>	Del	Del	N	N	N	N	N	Ampl	N	Ampl	N	N	N	Ampl	Ampl
<i>BRCA2</i>	N	N	Ampl	N	Ampl	Del	Del	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>ATM</i>	Del	Del	Del	Del	Del	N	N	Ampl	Del	Del	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl
<i>BAR1</i>	N	N	N	N	N	Del	Del	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>BRIP1</i>	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
<i>CDK12</i>	Del	Del	Del	N	N	N	N	Ampl	Del	Del	N	N	N	N	N
<i>CHEK1</i>	Del	Del	Del	Del	N	N	N	Ampl	Del	Del	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl
<i>CHEK2</i>	N	N	N	N	N	Del	Del	Del	N	N	N	N	N	N	N
<i>FANCL</i>	N	N	N	N	N	N	N	Ampl	N	Ampl	N	N	N	N	N
<i>PALB2</i>	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	Del	Del	N	N	N	N	Del	Del	N	N
<i>PPP2R2A</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	Del	Del	N	N
<i>RAD51B</i>	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
<i>RAD51C</i>	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
<i>RAD51D</i>	Del	Del	Del	N	N	N	N	Ampl	Del	Del	N	N	N	N	N
<i>RAD54L</i>	N	N	N	N	N	Del	Del	N	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl
<i>PARP1</i>	N	N	N	N	N	N	N	Ampl	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	Ampl	Ampl

Примечание. Здесь и в табл. 4: 1-й пассаж — через 2 нед после воздействия (после 1-й дозы препарата); 2-й пассаж — после 2-й дозы препарата; 3-й пассаж — после 3-й дозы препарата; CNA — aberrации числа копий ДНК.

Note. Here and in table 4: passage 1 — 2 weeks after exposure (after 1st dose of the drug); passage 2 — after the 2nd dose of the drug; passage 3 — after the 3rd dose of the drug; CNA — copy number aberrations of DNA.

Таблица 4. Наличие хромосомных aberrаций в генах системы гомологичной рекомбинации в клеточных культурах MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468 под действием доцетаксела в разные промежутки воздействия препарата

Table 4. The presence of chromosomal aberrations in the genes of the homologous recombination system in cell cultures MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 under the influence of docetaxel at different periods of exposure to the drug

Ген Gen	MCF-7, доцетаксел (50 мкг/мл) MCF-7, docetaxel (50 µg/ml)				MDA-MB-231, доцетаксел (50 мкг/мл) MDA-MB-231, docetaxel (50 µg/ml)				MDA-MB-468, доцетаксел (50 мкг/мл) MDA-MB-468, docetaxel (50 µg/ml)						
	Исходные CNA Original CNAs	Через 24 ч In 24 h	1-й пассаж Passage 1	2-й пассаж Passage 2	3-й пассаж Passage 3	Исходные CNA Original CNAs	Через 24 ч In 24 h	1-й пассаж Passage 1	2-й пассаж Passage 2	3-й пассаж Passage 3	Исходные CNA Original CNAs	Через 24 ч In 24 h	1-й пассаж Passage 1	2-й пассаж Passage 2	3-й пассаж Passage 3
<i>BRCA1</i>	Del	Del	Del	Del	Del	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
<i>BRCA2</i>	N	N	N	N	N	Del	Del	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>ATM</i>	Del	Del	Del	Del	Del	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl
<i>BAR1</i>	N	N	N	N	N	Del	Del	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>BRIPI</i>	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
<i>CDK12</i>	Del	Del	Del	Del	Del	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
<i>CHEK1</i>	Del	Del	Del	Del	Del	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl
<i>CHEK2</i>	N	N	N	N	N	Del	Del	Del	Del	Del	N	N	N	N	N
<i>FANCL</i>	N	N	N	N	N	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
<i>PALB2</i>	N	N	N	N	N	Del	Del	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>PPP2R2A</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>RAD51B</i>	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
<i>RAD51C</i>	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
<i>RAD51D</i>	Del	Del	Del	Del	Del	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
<i>RAD54L</i>	N	N	N	N	N	Del	Del	N	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl
<i>PARP1</i>	N	N	N	N	N	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl

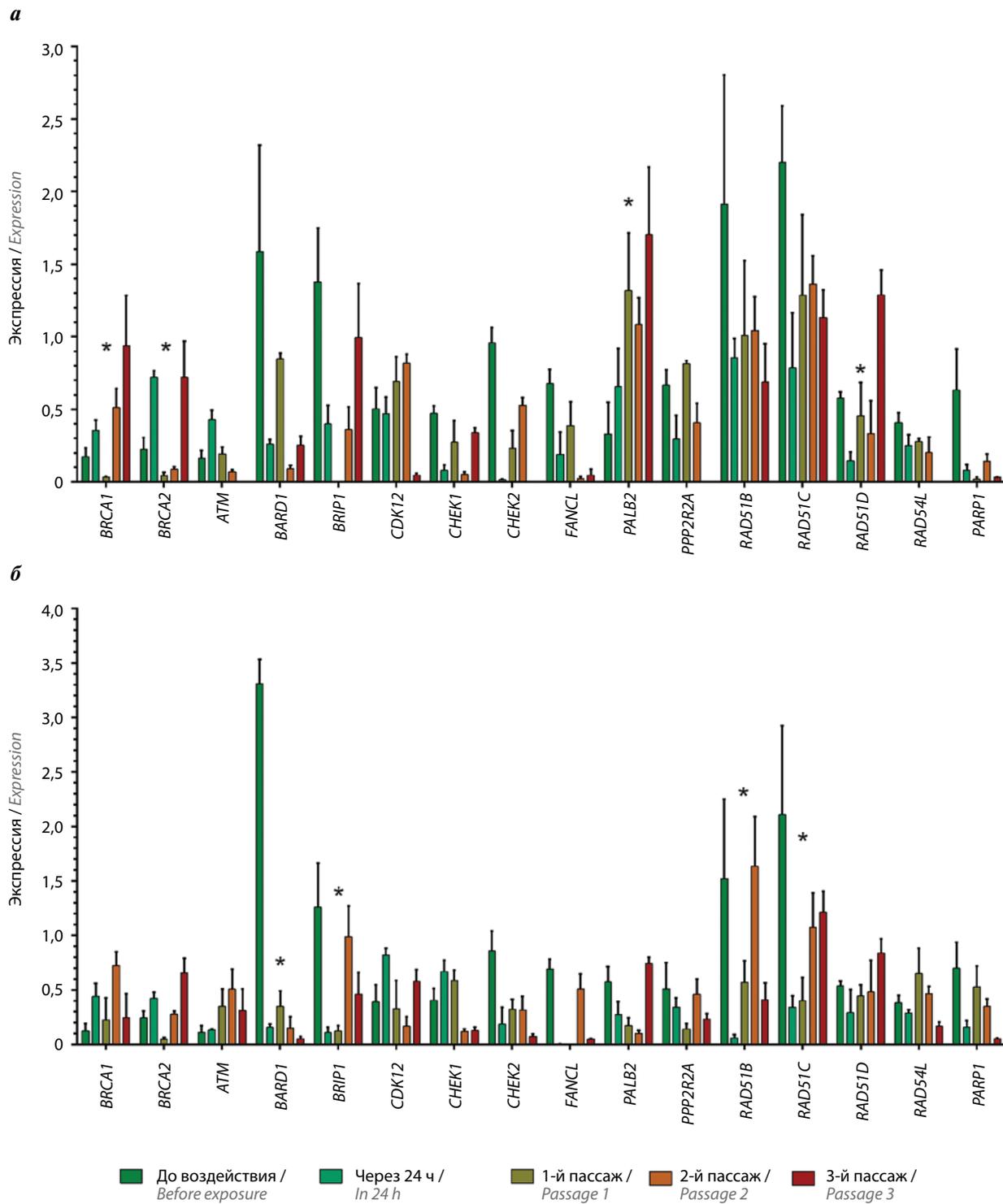


Рис. 2. Уровень экспрессии генов системы гомологичной рекомбинации в клеточной культуре MCF-7 до воздействия препарата и через временные промежутки после него: а – данные для цисплатина; б – данные для доцетаксела. 1-й пассаж – через 2 нед после воздействия (после 1-й дозы препарата); 2-й пассаж – после 2-й дозы препарата; 3-й пассаж – после 3-й дозы препарата. Звездочкой помечены статистически значимые различия между группами

Fig. 2. Level of expression of genes of the homologous recombination system in the MCF-7 cell culture before exposure to the drug and at time intervals after exposure: a – data for cisplatin; б – data for docetaxel. Passage 1 – 2 weeks after exposure (after 1st dose of the drug); passage 2 – after the 2nd dose of the drug; passage 3 – after the 3rd dose of the drug. Statistically significant differences between groups marked with an asterisk

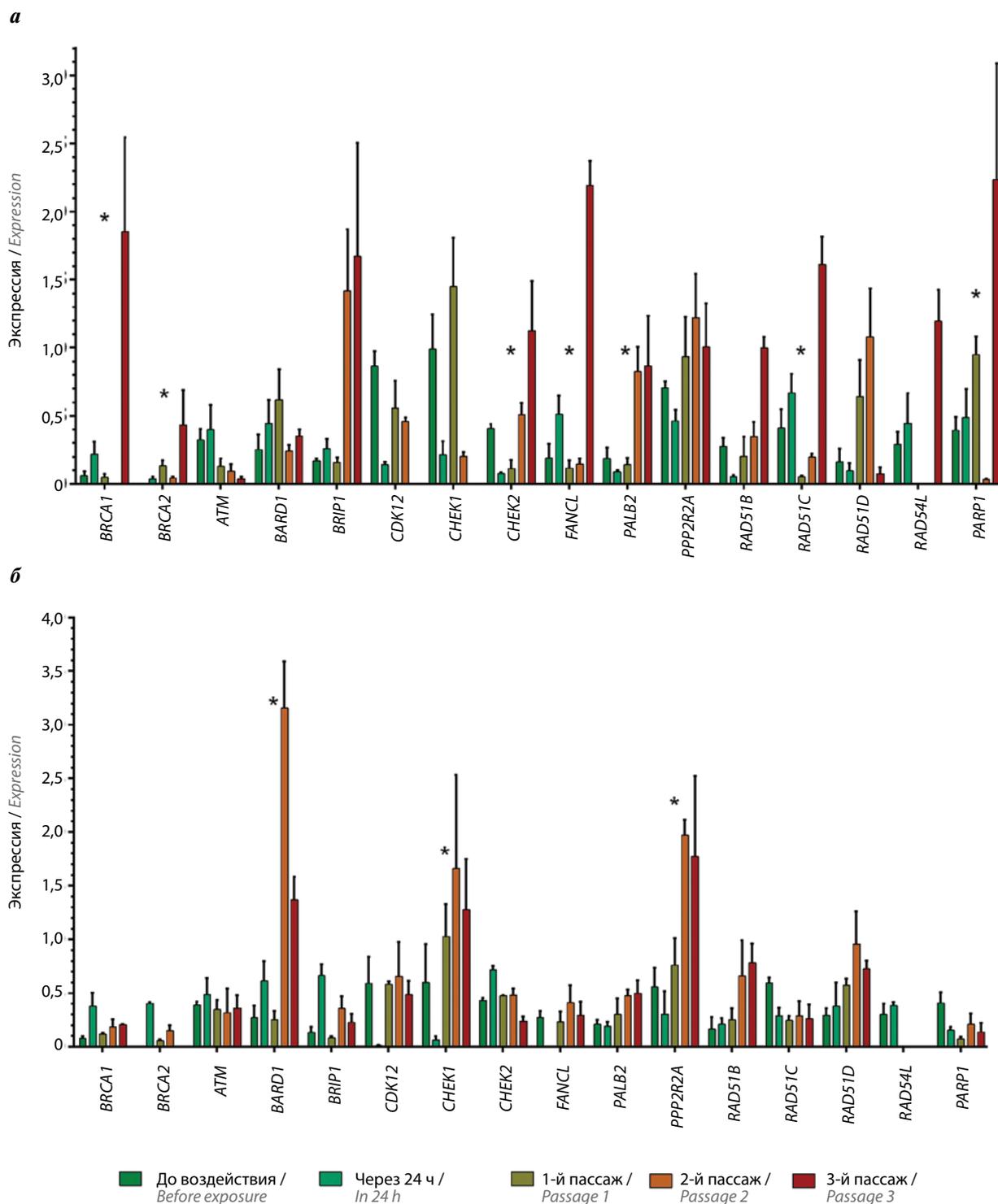


Рис. 3. Уровень экспрессии генов системы гомологичной рекомбинации в клеточной культуре MDA-MB-231 до воздействия препарата и через временные промежутки после воздействия: а – данные для цисплатина; б – данные для доцетаксела. 1-й пассаж – через 2 нед после воздействия (после 1-й дозы препарата); 2-й пассаж – после 2-й дозы препарата; 3-й пассаж – после 3-й дозы препарата. Звездочкой помечены статистически значимые различия между группами

Fig. 3. Level of expression of genes of the homologous recombination system in the MDA-MB-231 cell culture before exposure to the drug and at time intervals after exposure: а – data for cisplatin; б – data for docetaxel. Passage 1 – 2 weeks after exposure (after 1st dose of the drug); passage 2 – after the 2nd dose of the drug; passage 3 – after the 3rd dose of the drug. Statistically significant differences between groups marked with an asterisk

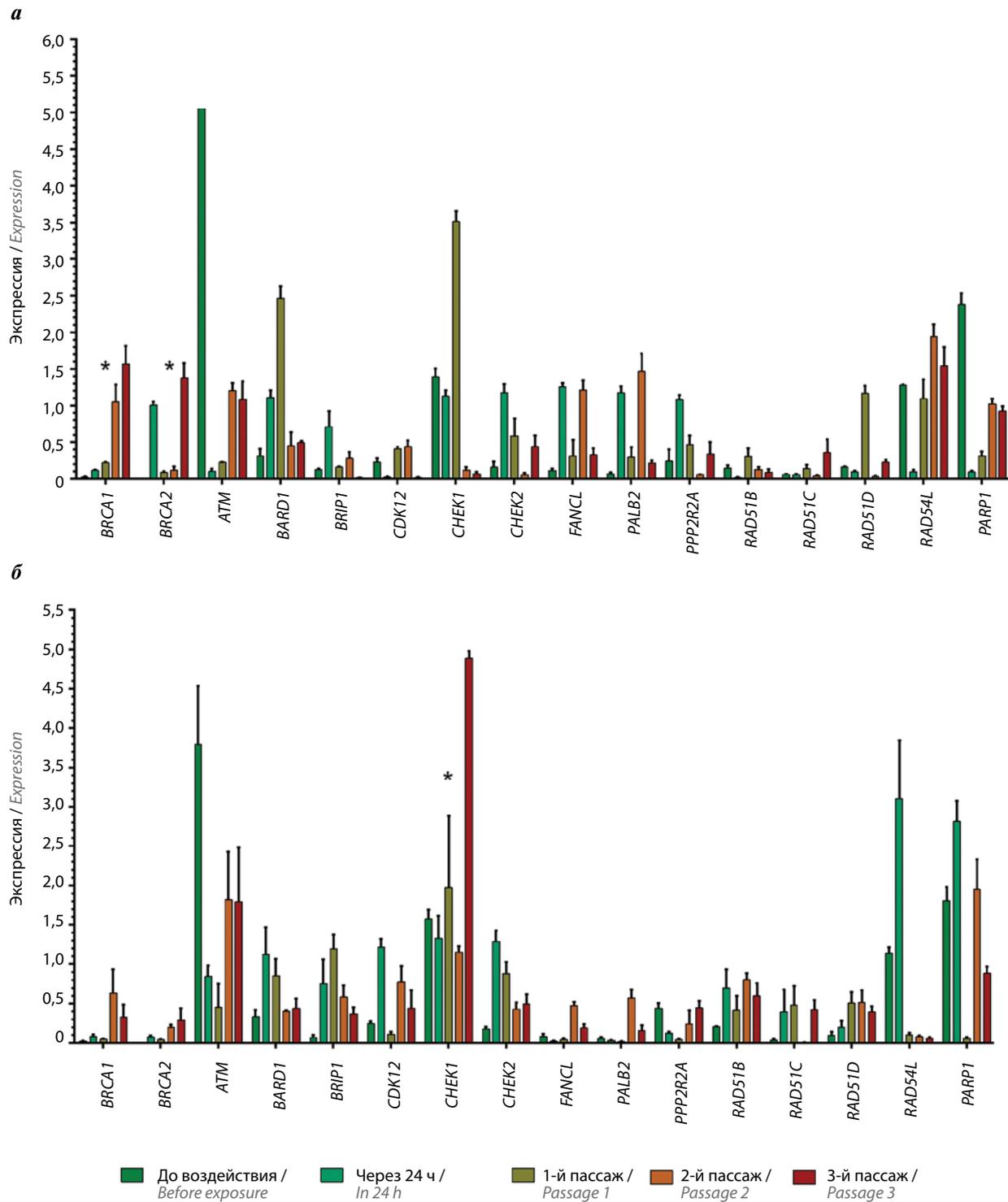


Рис. 4. Уровень экспрессии генов системы гомологичной рекомбинации в клеточной культуре MDA-MB-468 до воздействия препарата и через временные промежутки после воздействия: а – данные для цисплатина; б – данные для доцетаксела. 1-й пассаж – через 2 нед после воздействия (после 1-й дозы препарата); 2-й пассаж – после 2-й дозы препарата; 3-й пассаж – после 3-й дозы препарата. Звездочкой помечены статистически значимые различия между группами

Fig. 4. Level of expression of genes of the homologous recombination system in the MDA-MB-468 cell culture before exposure to the drug and at time intervals after exposure: а – data for cisplatin; б – data for docetaxel. Passage 1 – 2 weeks after exposure (after 1st dose of the drug); passage 2 – after the 2nd dose of the drug; passage 3 – after the 3rd dose of the drug. Statistically significant differences between groups marked with an asterisk

практически не обнаруживаются. Изначально высокий уровень экспрессии характерен для *BARD1* ($p = 0,03$), *BRIP1* ($p = 0,02$), *RAD51B* ($p = 0,02$) и *RAD51C* ($p = 0,05$). При воздействии препарата наблюдается снижение экспрессии данных генов. Для остальных генов ГР ее уровень в среднем приближен к нормальному (рис. 2, б).

Анализ экспрессии в культуре MDA-MB-231 показал увеличение к 3-му пассажу уровня *BRCA1* ($p = 0,02$), *BRCA2* ($p = 0,02$), *CHEK2* ($p = 0,05$), *FANCL* ($p = 0,04$), *PALB2* ($p = 0,05$), *RAD51C* ($p = 0,02$) и *PARP1* ($p = 0,02$), что соответствует появлению амплификаций в данных генах (рис. 3, а). Несмотря на то что под действием доцетаксела также происходит изменение генетического ландшафта клеточной культуры, экспрессионный портрет исследуемых генов значительно не изменяется. Так, уровень экспрессии *BRCA1* не превышает 1, что ниже, чем в нормальных клетках молочной железы; это также характерно для остальных генов. Исключение составляют такие гены, как *BARD1* ($p = 0,02$), *CHEK1* ($p = 0,03$) и *PPP2R2A* ($p = 0,08$). Для них характерны гиперэкспрессия во 2-м пассаже и незначительное снижение экспрессии к 3-му пассажу (рис. 3, б).

На последнем этапе оценена экспрессия исследуемых генов в клеточной культуре MDA-MB-468. Уровень экспрессии *BRCA1* увеличивался прямо пропорционально длительности действия препарата (рис. 4, а) и к 3-му пассажу стал в 2 раза больше, чем в клетках, не подверженных воздействию ($p = 0,02$). Стоит обратить внимание, что под действием доцетаксела наблюдается сильная вариация в экспрессии генов. Только для *CHEK1* установлено увеличение экспрессии ($p = 0,01$), для многих генов показано увеличение экспрессии через 24 ч после, через 2 ч воздействия препаратом и после 2-й его дозы, затем наблюдается снижение уровня экспрессии до начальных значений (рис. 4, б).

Таким образом, на клеточных культурах было установлено снижение количества нарушений генов ГР под действием цисплатина. При этом клеточные культуры, имеющие делеции и низкую экспрессию в генах ГР, восстанавливали копийность, а в некоторых случаях проявляли развитие структурной (амплификации, up-регуляция экспрессии) компенсаторности дефицита ГР. Важно отметить, что изменения параметров генов ГР наступают через длительное воздействие препарата, преимущественно уже через 2 нед наблюдаются первичные изменения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашей работы показали, что под селективным действием цисплатина может происходить изменение генетического ландшафта и экспрессионного портрета генов ГР. В недавнем исследовании изучена чувствительность 12 клеточных культур РМЖ при наличии/отсутствии у них фенотипа BRCAness [6]. В частности, показано, что BRCA-подобные клетки демонстрируют слабую положительную корреляцию с чувствительностью к доцетакселу ($r = 0,377$; $p = 0,039$).

Также обнаружена отрицательная корреляция между BRCA-подобными клетками и чувствительностью к цисплатину ($r = -0,407$; $p = 0,013$).

В настоящее время BRCA-подобные опухоли исследуют не только в качестве прогностического биомаркера, но и как новую терапевтическую стратегию. Интересные результаты были получены А. Мин и соавт. (2015) и С. Мио и соавт. (2019), которые установили, что индукция фенотипа BRCAness может быть достигнута за счет эпигенетического подавления *BRCA1/2* и усиления активности химиопрепаратов [7, 8]. Согласно полученным данным, низкая эффективность препаратов платины может быть связана с тем, что ГР восстанавливается под действием неoadьювантной ХТ [9]. Другие авторы показали, что совокупное воздействие ХТ является наиболее вероятным фактором вторичных генетических изменений [10]. Например, циклофосфамид, обычно используемый у пациентов с карциномой молочной железы, является агентом, сшивающим ДНК, и теоретически может индуцировать или определять восстановление *BRCA1/2* дикого типа аналогично соединениям платины. Подтверждением этому служат результаты исследования больных с опухолью яичников: 13 из 46 рецидивирующих карцином имели вторичную мутацию генов *BRCA1/2* по сравнению с 2 из 64 первичных карцином ($p = 0,0003$) [11]. При этом в 12 из 26 платинорезистентных рецидивов наблюдались вторичные мутации, восстанавливающие генотип *BRCA1/2* по сравнению с 1 из 19 платиночувствительных рецидивов ($p = 0,003$). Авторы предположили, что вторичные мутации могут присутствовать в первичной карциноме из-за нестабильности генома и уже затем выбиваться с помощью ХТ. Кроме этого, вторичные мутации могут встречаться в редких клетках первичной карциномы. Но остается открытым вопрос: существуют ли вторичные мутации, восстанавливающие *BRCA1/2* при первичном раке яичников без проведения ХТ [11].

Результаты ранее проведенного исследования показали, что наличие мутации *BRCA2* 5193C>G (Y1655X) в клеточной линии аденокарциномы яичника PEO1 определяет дефицит *BRCA2* и высокую чувствительность к цисплатину [12]. Обработка PEO1 цисплатином привела к восстановлению функционирования *BRCA2* вследствие появления другой вторичной мутации. Еще в одном исследовании установлено, что амплификации могут напрямую или опосредованно влиять на резистентность. Амплификация гена *NBN* в клетках РМЖ и яичников приводит к *BRCA1*-зависимой устойчивости к олапарибу [13]. Установлено, что применение ингибиторов фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) снижает экспрессию генов *BARD1* и *BRCA1* в клетках, устойчивых к тамоксифену, и повторно повышают их чувствительность к цисплатину как *in vitro* (MCF-7 и T47D), так и *in vivo* [14].

Таким образом, настоящее исследование показало, что под действием цисплатина может происходить

реверсия не только мутаций генов ГР, но и других нарушений. При этом данный механизм был описан *in vitro* на линии *BRCA2*-мутированного рака поджелудочной железы, но считался основным фактором развития резистентности при РМЖ, раке яичников, поджелудочной и предстательной желез [15–18]. Кроме того, реверсии, ассоциированные с резистентностью к РАРР-ингибиторам и препаратам платины, обнаружены не только в генах *BRCA1/2*, но и в других генах ГР, таких как *RAD51C*, *RAD51D* и *PALB2* [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, было выявлено, что формирование резистентности к химиопрепаратам может происходить за счет не только реверсивных мутаций в генах *BRCA1/2*, но и изменения количества копий ДНК генов ГР. Кроме того, полученные данные указывают на необходимость исследования механизмов пульсирующей функциональности генов ГР в опухоли в процессе ее развития и лечения, что и может являться основным фактором формирования резистентности опухолевых клеток.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Turner N.C., Reis-Filho J.S. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene* 2006;25(43):5846–53. DOI: 10.1038/sj.onc.1209876
- Jia X., Wang K., Xu L. et al. A systematic review and meta-analysis of BRCA1/2 mutation for predicting the effect of platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer. *The Breast* 2022;66:31–9. DOI: 10.1016/j.breast.2022.08.012
- Sokolenko A.P., Savonevich E.L., Ivantsov A.O. et al. Rapid selection of BRCA1-proficient tumor cells during neoadjuvant therapy for ovarian cancer in BRCA1 mutation carriers. *Cancer Lett* 2017;397(1):127–32. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.03.036
- Sokolenko A.P., Bizin I.V., Preobrazhenskaya E.V. et al. Molecular profiles of BRCA1-associated ovarian cancer treated by platinum-based therapy: analysis of primary, residual and relapsed tumors. *Int J Cancer* 2020;146(7):1879–88. DOI: 10.1002/ijc.32776
- Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45
- Teraoka S., Muguruma M., Takano N. et al. Association of BRCA mutations and BRCAness status with anticancer drug sensitivities in triple-negative breast cancer cell lines. *J Surg Res* 2020;250:200–8. DOI: 10.1016/j.jss.2019.12.040
- Min A., Im S.-A., Kim D.K. et al. Histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), enhances anti-tumor effects of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor olaparib in triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2015;17(1):1–13. DOI: 10.1186/s13058-015-0534-y
- Mio C., Gerratana L., Bolis M. et al. BET proteins regulate homologous recombination-mediated DNA repair: BRCAness and implications for cancer therapy. *Int J Cancer* 2019;144(4):755–66. DOI: 10.1002/ijc.31898
- Lord C.J., Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer* 2016;16(2):110–20. DOI: 10.1038/nrc.2015.21
- Fleming R.A. An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology. *Pharmacotherapy* 1997;17(5 Pt. 2):146–54.
- Norquist B., Wurz K.A., Pennil C.C. et al. Secondary somatic mutations restoring BRCA1/2 predict chemotherapy resistance in hereditary ovarian carcinomas. *J Clin Oncol* 2011;29(22):3008–15. DOI: 10.1200/JCO.2010.34.2980
- Sakai W., Swisher E.M., Jacquemont C. et al. Functional restoration of BRCA2 protein by secondary BRCA2 mutations in BRCA2-mutated ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2009;69(16):6381–6. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1178
- Wu Z., Li S., Tang X. et al. Copy number amplification of DNA damage repair pathways potentiates therapeutic resistance in cancer. *Theranostics* 2020;10(9):3939–51. DOI: 10.7150/thno.39341
- Zhu Y., Liu Y., Zhang C. et al. Tamoxifen-resistant breast cancer cells are resistant to DNA-damaging chemotherapy because of upregulated BARD1 and BRCA1. *Nat Commun* 2018;9(1):1–11. DOI: 10.1038/s41467-018-03951-0
- Afghahi A., Timms K.M., Vinayak S. et al. Tumor *BRCA1* reversion mutation arising during neoadjuvant platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer is associated with therapy resistance. *Clin Cancer Res* 2017;23(13):3365–70. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2174
- Weigelt B., Comino-Méndez I., De Bruijn I. et al. Diverse *BRCA1* and *BRCA2* reversion mutations in circulating cell-free DNA of therapy-resistant breast or ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23(21):6708–20. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0544
- Pishvaian M.J., Biankin A.V., Bailey P. et al. BRCA2 secondary mutation-mediated resistance to platinum and PARP inhibitor-based therapy in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2017;116(8):1021–6. DOI: 10.1038/bjc.2017.40
- Goodall J., Mateo J., Yuan W. et al. Circulating cell-free DNA to guide prostate cancer treatment with PARP inhibition. *Cancer Discov* 2017;7(9):1006–17. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0261
- Feng L., Fong K.-W., Wang J. et al. RIF1 counteracts BRCA1-mediated end resection during DNA repair. *J Biol Chem* 2013;288(16):11135–43. DOI: 10.1074/jbc.M113.457440

Вклад авторов

М.М. Цыганов: написание текста статьи;
А.А. Фролова: получение данных для анализа;
Е.А. Кравцова: обзор публикаций по теме статьи;
И.А. Цыденова: анализ полученных данных;
М.К. Ибрагимова: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

M.M. Tsyganov: article writing;
A.A. Frolova: obtaining data for analysis;
E.A. Kravtsova: reviewing of publications of the article's theme;
I.A. Tsydenova: analysis of the obtained data;
M.K. Ibragimova: developing the research design.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.М. Цыганов / M.M. Tsyganov: <https://orcid.org/0000-0001-7419-4512>
А.А. Фролова / A.A. Frolova: <https://orcid.org/0000-0003-3297-1680>
Е.А. Кравцова / E.A. Kravtsova: <https://orcid.org/0000-0002-9022-7764>
И.А. Цыденова / I.A. Tsydenova: <https://orcid.org/0000-0002-2716-3075>
М.К. Ибрагимова / M.K. Ibragimova: <https://orcid.org/0000-0001-8815-2786>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00169).

Funding. This research was funded by the Russian Science Foundation (grant No. 22-15-00169).

Статья поступила: 03.03.2024. **Принята к публикации:** 09.04.2024.

Article submitted: 03.03.2024. **Accepted for publication:** 09.04.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-130-146>

Деполимеризация тубулина как основной молекулярный механизм цитотоксической и противоопухолевой активности пиррол-содержащих гетероциклических соединений

А.Р. Галембикова¹, П.Д. Дунаев¹, Т.В. Ивойлова¹, А.И. Гилязова¹, А.Э. Галяутдинова¹, Е.Г. Михеева¹, С.С. Зыкова², Н.М. Игидов², П.Б. Копнин³, С.В. Бойчук^{1,4-6}

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

²ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России; Россия, 614081 Пермь, ул. Полевая, 2;

³Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

⁴Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18;

⁵ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1;

⁶Отделение медицинских и биологических наук, Академия наук Республики Татарстан; Россия, 420111 Казань, ул. Баумана, 20

Контакты: Сергей Васильевич Бойчук boichuksergei@mail.ru

Введение. Микротрубочки представляют собой высокодинамичные полимеры димеров α - и β -тубулина, которые играют большую роль во многих клеточных процессах, таких как внутриклеточный транспорт и клеточная пролиферация, что делает их привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии злокачественных новообразований. Вещества, влияющие на динамическое состояние тубулиновых микротрубочек, именуется митотическими ядами и являются эффективными и широко применяемыми в лечении различных опухолей химиопрепаратами. Митотические яды приводят к полимеризации (стабилизации) или деполимеризации тубулина, что вызывает задержку клеток в М-фазе (митотическую катастрофу) и их последующую гибель по механизму апоптоза. Однако эффективность данных химиопрепаратов снижается из-за активации в опухолевых клетках механизмов вторичной лекарственной устойчивости. Поэтому поиск новых соединений, нацеленных на тубулин, эффективных также в отношении опухолей с множественной лекарственной устойчивостью, является актуальной научно-практической задачей современной онкологии.

Цель исследования – изучить цитотоксическую и противоопухолевую активность некоторых пирролсодержащих гетероциклических соединений (ЕРС-91, ЕРС-92 и РСА-93) в отношении опухолевых клеточных линий эпителиального и мезенхимального происхождения, в том числе с фенотипом множественной лекарственной устойчивости.

Материалы и методы. Исследования проводили на клеточных линиях человека – трижды негативного рака молочной железы НСС1806, гастроинтестинальной стромальной опухоли GIST T-1, остеосаркомы SaOS-2, – чувствительных к химиопрепаратам (паклитаксел, доксорубицин), их резистентных сублиниях (НСС1806 Tx-R, GIST T-1 Tx-R, SaOS-2 Dox-R), а также на мышинной недифференцированной колоректальной аденокарциноме линии Colon-26, имеющей первичную резистентность к химиопрепаратам.

Результаты. Цитотоксическая активность ЕРС-91 и РСА-93 обусловлена их способностью к деполимеризации тубулина. Результаты иммунофлуоресцентной микроскопии и вестерн-блоттинга свидетельствуют о способности данных соединений нарушать процессы сборки тубулиновых микротрубочек и предотвращать полимеризацию тубулина в опухолевых клетках. Ингибирование полимеризации тубулина в этих клетках приводило к митотической катастрофе и накоплению в популяции округлых митотических клеток с последующей их гибелью по механизму апоптоза. РСА-93 также показал высокий противоопухолевый эффект за счет проапоптотической активности в отношении синотрансплантата Colon-26.

Заключение. Результаты исследований показали высокую цитотоксическую активность ЕРС-91 и РСА-93 в отношении опухолевых клеточных линий эпидермального и мезенхимального происхождения, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью, а также высокую противоопухолевую активность РСА-93 на модели синотрансплантата Colon-26, что открывает перспективы для создания новых эффективных противоопухолевых препаратов на основе пиррола.

Ключевые слова: микротрубочки, деполимеризация тубулина, клеточный цикл, апоптоз, митотическая катастрофа, множественная лекарственная устойчивость, трижды негативный рак молочной железы, гастроинтестинальная стромальная опухоль, остеосаркома, колоректальная аденокарцинома, этил-пиррол-карбоксила, пиррол-карбоксамиды, паклитаксел, винбластин, доксорубин

Для цитирования: Галембикова А.Р., Дунаев П.Д., Ивойлова Т.В. и др. Деполимеризация тубулина как основной молекулярный механизм цитотоксической и противоопухолевой активности пирролсодержащих гетероциклических соединений. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):130–46.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-130-146>

Depolymerization of tubulin as the main molecular mechanism of the cytotoxic and antitumor activity of pyrrole-containing heterocyclic compounds

A.R. Galembikova¹, P.D. Dunaev¹, T.V. Ivoilova¹, A.I. Gilyazova¹, A.E. Galyautdinova¹, E.G. Mikheeva¹, S.S. Zykova², N.M. Igidov², P.B. Kopnin³, S.V. Boichuk^{1, 4-6}

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

²Perm State Academy of Pharmacy, Ministry of Health of Russia; 2 Polevaya St., Perm 614990, Russia;

³N.N. Blokhin National Medical Russian Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia;

⁴Biomarker Research Laboratory, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University; 18 Kremlevskaya St., Kazan 420008, Russia;

⁵Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 Barricadnaya St., Moscow 125993, Russia;

⁶Division of Mecial and Biological Sciences, Tatarstan Academy of Sciences; 20 Bauman St., Kazan 420111, Russia

Contacts: Sergei Vasilyevich Boichuk boichuksergei@mail.ru

Introduction. Microtubules are highly dynamic polymers of α , β -tubulin dimers involves in a broad spectrum of the processes, such as intracellular transport and cell proliferation. This makes them an attractive molecular target for anti-cancer therapies. Substances that affect the dynamic state of tubulin microtubules are known as the mitotic poisons that are effective and widely used in the chemotherapy of various tumors. Mitotic poisons are able to interfere with polymerization (stabilization) or depolymerization of tubulin, which in turn leads to the arrest of cells in the M-phase (named as a mitotic catastrophe) and their subsequent death via activation of apoptotic mechanisms. However, the effectiveness of MP-based therapies is gradually decreasing over the time due to development of multiple drug resistance mechanisms in cancer cells. Thus, development of novel compounds selectively targeting tubulin and effectively overcoming multiple drug resistance phenotype in cancer is an urgent need in current oncology.

Aim. To examine the cytotoxic and antitumor activities of several pyrrole-containing heterocyclic compounds (EPC-91, EPC-92 and PCA-93) against cancer cell lines with epithelial and mesenchymal origin, including those with multiple drug resistance phenotype.

Materials and methods. Studies were performed on parental human cancer cell lines – triple-negative breast cancer HCC1806, gastrointestinal stromal tumor GIST T-1, osteosarcoma SaOS-2, – sensitive to chemotherapy (paclitaxel, doxorubicin) and their resistant sublines (HCC1806 Tx-R, GIST T-1 Tx-R, SaOS-2 Dox-R), as well as on murine colorectal adenocarcinoma cell line Colon-26, exhibiting primary resistance to the aforementioned chemotherapeutic agents.

Results. The cytotoxic activities of EPC-91 and PCA-93 were due to their abilities to depolymerize tubulin. The results of immunofluorescence microscopy and Western blotting indicated that the compounds disrupt assembly of tubulin microtubules and prevent polymerization of α -tubulin in cancer cells. Inhibition of tubulin polymerizations led to significant increase in number of round-shaped and phospho-histone 3 (e. g. mitotic) cells, followed by their death through apoptosis. PCA-93 also exhibited potent anti-tumor effect against Colon-26 cells due to its anti-proliferative and proapoptotic activities.

Conclusion. The data shown here illustrates potent cytotoxic activities of EPC-91 and PCA-93 against multiple cancer cell lines *in vitro* including those with multiple drug resistance phenotype. Similarly, PCA-93 was found to be highly effective against Colon-26 cell *in vivo*, thereby illustrating the attractive platform for the development of novel pyrrole-based agents exhibiting potent anti-tumor activities.

Keywords: microtubules, tubulin depolymerization, cell cycle, apoptosis, mitotic catastrophe, multidrug resistance, triple-negative breast cancer, gastrointestinal stromal tumor, osteosarcoma, colorectal adenocarcinoma, ethyl-pyrrole-carboxyls, pyrrole-carboxamides, paclitaxel, vinblastine, doxorubicin

For citation: Galembikova A.R., Dunaev P.D., T.V. Ivoilova et al. Depolymerization of tubulin as the main molecular mechanism of the cytotoxic and antitumor activity of pyrrole-containing heterocyclic compounds. Uspexhi molekulyar-noy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(2):130–46. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-130-146>

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что химические соединения, содержащие пиррольное кольцо, обладают широким спектром биологической активности, что делает их привлекательными для создания новых перспективных лекарственных соединений, обладающих в том числе противоопухолевой активностью [1]. Пирролсодержащие гетероциклические соединения представляют собой молекулярные структуры, обладающие способностью селективно связываться с рядом различных биологических мишеней посредством модификации их функциональных групп [2, 3]. К тому же соединения на основе пиррола можно использовать для разработки потенциальных противоопухолевых препаратов, благодаря их способности модулировать некоторые параметры фармакокинетики, такие как растворимость, липофильность, полярность и фармакодинамика, включая способность к образованию водородных связей и комплексов с координирующими металлами [4, 5]. Это объясняет наличие довольно широкого спектра лекарственных препаратов, синтезированных на основе пиррола, в том числе противогрибковые, противомикробные, противовоспалительные, антигипертензивные, противомаларийные и противоопухолевые средства, ингибиторы гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазы, антидепрессанты, а также препараты, применяемые в лечении инфекции вируса иммунодефицита человека [6–8]. Также известно, что пирролсодержащие и пиррол-конденсированные гетероциклы можно использовать для разработки новых эффективных препаратов, проявляющих свою противоопухолевую активность за счет связывания с колхицинсвязывающим сайтом тубулина. Действительно, эти структуры дают большие возможности для расширения химического разнообразия тубулинсвязывающих агентов, благодаря существованию разных способов синтеза производных пиррола с различными функциональными группами, а также широкой модификации существующих молекул-кандидатов [9–15].

Микротрубочки представляют собой высокодинамичные полимеры α - и β -тубулина, которые играют большую роль во многих клеточных процессах, таких как внутриклеточный транспорт различных биологически активных веществ, а также регулируют процессы клеточного деления, что, безусловно, делает их привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии злокачественных новообразований [16–20]. Вещества, влияющие на динамическое состояние тубулиновых микротрубочек, именуется митотическими ядами (МЯ) и в настоящее время широко применяются для терапии пациентов с различными онкологическими заболеваниями [21]. Белок тубулин – основной строительный элемент микротрубочек – содержит несколько различных сайтов связывания для низкомолекулярных лекарственных средств, относящихся к МЯ (таксаны, эпотилоны, алкалоиды барвинка, колхицин, лаулималид и майтанзин) [22–27]. В зависимо-

сти от влияния на динамическое состояние микротрубочек МЯ подразделяются на 2 основные группы: агенты, стабилизирующие микротрубочки за счет полимеризации тубулина (таксаны, эпотилоны и лаулималид), и агенты, дестабилизирующие микротрубочки за счет деполимеризации тубулина (колхицин, алкалоиды барвинка и майтанзин) [28, 29].

Алкалоиды барвинка связываются с участком β -тубулина, расположенным на границе между димерами тубулина [24], тогда как колхицин – с участком β -тубулина, расположенным на внутридимерном пространстве между α - и β -субъединицами [30]. Два других препарата – майтанзин и пиронетин – ингибируют полимеризацию тубулина посредством взаимодействия с доменами, отличными от сайтов связывания алкалоида барвинка и колхицина [31, 32]. Агенты, стабилизирующие микротрубочки (например, таксол, доцетаксел), взаимодействуют с таксоидным доменом на β -тубулине [33, 34]. Продукты морских губок (например, лаулималид [26] и пелорузид А [35]) так же, как и таксаны, усиливают полимеризацию микротрубочек и стабилизируют их посредством связывания с нетаксановым доменом на β -тубулине [36].

С точки зрения сайта связывания на тубулине агенты, взаимодействующие с колхицинсвязывающим сайтом, обладают рядом преимуществ, включая их способность преодолевать множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) опухолей и ингибировать процессы ангиогенеза [37–40]. Более того, ингибиторы данного сайта имеют несколько существенных преимуществ перед другими МЯ, поскольку колхициновый сайт тубулина считается более восприимчивым к молекулам с благоприятными физико-химическими свойствами, которые улучшают биодоступность препарата при пероральном приеме по сравнению с таксанами и алкалоидами барвинка. Именно на этом основана точка зрения, что развитие МЛУ к препаратам с данным механизмом действия является гораздо более редким событием. В настоящее время описано большое количество ингибиторов колхицинсвязывающего сайта тубулина [41], которые можно использовать в качестве каркасов для создания мощных противоопухолевых производных, обладающих ограниченной токсичностью, лучшей растворимостью и т. д. [42].

Результаты ранее проведенных нами исследований показали высокую цитотоксическую и противоопухолевую активность этил-2-амино-пиррол-3-карбоксилатов [43–47] и 2-амино-пиррол-3-карбоксамидов [15, 48, 49] в отношении довольно широкого спектра опухолевых клеточных линий и ксенографтных опухолей. Молекулярный механизм действия данных пирролсодержащих гетероциклических соединений связан с нарушением динамического состояния тубулиновых микротрубочек, что приводит к выраженным нарушениям регуляции клеточного цикла в опухолевых клетках, накоплению их в М-фазе и последующей гибели по механизму апоптоза. Эти данные согласуются

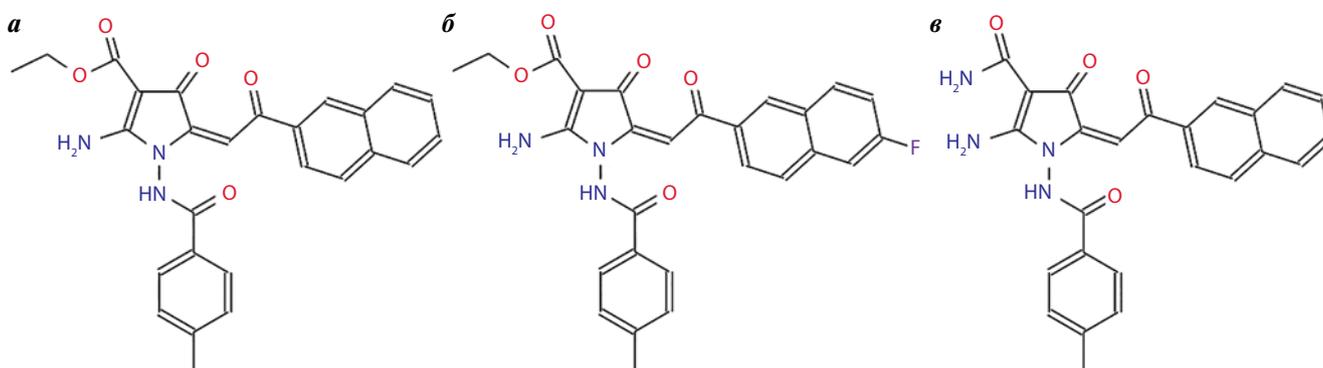


Рис. 1. Химические структуры EPC-91 (а), EPC-92 (б) и PCA-93 (в)
 Fig. 1. Chemical structures of EPC-91 (a), EPC-92 (b) and PCA-93 (c)

с результатами других исследователей, которые сообщают о цитотоксической и проапоптотической активности некоторых пирролсодержащих соединений, ингибирующих процессы полимеризации тубулина [50, 51]. В отношении большинства синтезированных нами пирролсодержащих гетероциклических соединений с помощью методов молекулярного докинга выявлена основная молекулярная мишень. Ею оказался колхициновый сайт в молекуле α -тубулина, что обусловило способность этих соединений эффективно нарушать процессы полимеризации данного белка и индуцировать гибель опухолевых клеток по механизму апоптоза [15, 47, 48].

В настоящем исследовании показана высокая цитотоксическая и противоопухолевая активность новых синтезированных нами соединений из группы этилпиррол-карбоксилатов и пиррол-карбоксамидов в отношении опухолевых клеток эпидермального и мезенхимального происхождения, в том числе с фенотипом МЛУ. Полученные результаты, на наш взгляд, имеют большое научно-практическое значение и открывают перспективы для разработки новых противоопухолевых лекарственных средств на основе пиррола, эффективных в отношении широкого спектра злокачественных новообразований, в том числе с признаками вторичной резистентности к химиотерапевтическим препаратам, используемым в современной онкологии.

Цель исследования — изучить цитотоксическую и противоопухолевую активность некоторых пирролсодержащих гетероциклических соединений (EPC-91, EPC-92 и PCA-93) в отношении опухолевых клеточных линий эпителиального и мезенхимального происхождения, в том числе с фенотипом МЛУ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические соединения. Этил-2-амино-1-[4-метилбензамидо]-5-[2-(нафталин-2-ил)-2-оксоэтилиден]-4-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксилат (EPC-91), этил-2-амино-1-[4-метилбензамидо]-5-[2-(4-фторфенил)-2-оксоэтилиден]-4-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксилат (EPC-92) и 2-амино-1-[4-метилбензамидо]-5-[2-(нафталин-2-ил)-2-оксоэтилиден]-4-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксилат (PCA-93) синтезированы в соответствии

с стандартными протоколами, как показано в предыдущих исследованиях [15, 47, 52–54]. Химические структуры EPC-91, EPC-92 и PCA-93 представлены на рис. 1. Доксорубин, паклитаксел, винбластин (Sigma-Aldrich, США), EPC-91, EPC-92 и PCA-93 были растворены в 100 % диметилсульфоксиде (ДМСО) (Sigma-Aldrich, США). В качестве контроля клетки инкубировали в культуральной среде с соответствующей концентрацией ДМСО (конечная концентрация 0,1 %). EPC-91, EPC-92 и PCA-93 использовались в концентрации, близкой к половинной ингибирующей концентрации (IC_{50}) (5 мкМ) (табл. 2), паклитаксел и винбластин — в концентрациях, подобранных ранее (10 и 0,01 мкМ соответственно) [15].

Клеточные линии и условия их культивирования.

В качестве объекта исследования использованы 6 опухолевых клеточных линий человека эпителиального (трижды негативный рак молочной железы линии HCC1806) и мезенхимального (остеосаркома линии SaOS-2, гастроинтестинальная стромальная опухоль линии GIST T-1) происхождения, в том числе 3 сублинии с приобретенной химиорезистентностью, а также мышьяная клеточная линия (недифференцированная колоректальная аденокарцинома линии Colon-26), имеющая первичную химиорезистентность, обусловленную тканевой специфичностью.

Сублинии опухолевых клеток с приобретенной химиорезистентностью были получены ранее в нашей лаборатории путем последовательного культивирования материнских опухолевых линий с постепенно увеличивающимися концентрациями химиопрепаратов: клеточная линия трижды негативного рака молочной железы, резистентная к паклитакселу (HCC1806 Tx-R) [55], клеточная линия остеосаркомы, резистентная к доксорубину (SaOS-2 Dox-R) [56], клеточная линия гастроинтестинальной стромальной опухоли, резистентная к паклитакселу (GIST T-1 TxR) [57]. Линии HCC1806, SaOS-2, Colon-26 получены из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection (ATCC), США), GIST T-1 — из метастаза гастроинтестинальной стромальной опухоли

желудка, имеющей гетерозиготную делецию из 57 пар оснований (V570-Y578) в 11-м экзоне *KIT* [58].

Все клеточные линии культивировали в стандартных условиях (влажная атмосфера с 5 % CO₂, 37 °С) CO₂-инкубатора (LAMSYSTEMS, Россия) в среде RPMI-1640 (ООО «ПанЭко», Россия) с добавлением 15 % эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США), 1 % L-глутамина, 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ООО «ПанЭко», Россия).

Оценка жизнеспособности клеточных линий. Опухолевые клетки высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты (Corning Inc., США) и культивировали в течение 24 ч в стандартных условиях CO₂-инкубатора. Затем клетки инкубировали в течение 48 ч в присутствии EPC-91, EPC-92 и PCA-93, винбластин, паклитаксела, доксорубинина или растворителя (DMCO) в соответствующих разведениях. Спустя 48 ч в лунки на 1 ч вносили реагент MTS (Promega, США). Клеточную жизнеспособность измеряли на спектрофотометре MultiScan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 492 нм. Половинную ингибирующую концентрацию исследуемых соединений определяли с использованием онлайн-калькулятора (<http://ic50.tk/> – по состоянию на 25.11.2023). Проведены 3 повтора для каждого исследуемого соединения.

Вестерн-блоттинг. Клеточные экстракты получали путем внесения к клеткам лизирующего буфера для радиоиммунопреципитации RIPA (25 мМ Tris-HCl; pH 7,6; 150 мМ NaCl; 5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА); 1 % NP-40; 1 % дезоксихолат натрия; 0,1 % додецилсульфат натрия (SDS) с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз). Далее клеточные лизаты инкубировали в течение 20 мин на льду, центрифугировали в течение 30 мин при 13000 об/мин при 4 °С. Концентрацию белка в лизатах определяли по методу Брэдфорда (Thermo Fisher Scientific, США). Лизаты, содержащие 30 мкг белка, вносили в кассеты с 4–12 % Bis-Tris NuPAGE гелем (Invitrogen, США). Электрофорез проводили при 4 °С в течение 3 ч с использованием постоянного напряжения (80 В) в NuPAGE MOPS SDS буфере (Invitrogen, США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в трансфер-буфере (25 мМ Tris; метанол (20 %); pH 8,3) при 350 мА в течение 1,5 ч при 4 °С. Для блокирования неспецифических взаимодействий и разведения антител использовали 1–5 % бычий сывороточный альбумин (БСА). Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали с первичными антителами (АТ) в течение 16 ч при 4 °С, затем со вторичными АТ, конъюгированными с HRP (Santa Cruz Biotechnology, США), в течение 1 ч. Экспрессию белков оценивали в режиме хемилюминесценции в гель-документирующей системе Fusion Solo S (Vilber Lourmat, Франция). Эксперименты проводили в 3 повторностях.

Для оценки полимеризации тубулина и разделения его свободной и полимеризованной форм клеточные лизаты готовили согласно методике, описанной

С. Wittmann и соавт. [59]. К клеточному осадку добавляли 100 мкл холодного гипотонического буфера (50 мМ Tris-HCl; pH 6,8; 2 мМ ЭДТА; 0,5 % NP-40; 1 мМ MgCl₂ и смесь ингибиторов протеаз и фосфатаз) и инкубировали при 37 °С в течение 5 мин в темноте. Затем клеточный лизат кратковременно перемешивали (Вортекс V-1 plus, Biosan, Латвия). После этого клеточные лизаты центрифугировали при 14400 об/мин в течение 10 мин при 4 °С. Полимеризованная фракция тубулина находилась в осадке, свободная фракция – в надосадочной жидкости.

После разделения 2 фракций тубулина осадок ресуспендировали в 10 мкл модифицированного буфера RIPA (150 мМ NaCl; 1 % дезоксихолат натрия; 2 % IGEPAL CA-630; 0,4 % SDS; 50 мМ Tris и смесь ингибиторов протеаз и фосфатаз) с 2 мкл ДНКазы Invitrogen TURBO (2 ед/мкл). Затем вносили дополнительно 50 мкл модифицированного буфера RIPA (150 мМ NaCl; 1 % дезоксихолат натрия; 2 % IGEPAL CA-630; 0,4 % SDS; 50 мМ Tris (pH 8,0); 5 мМ ЭДТА (pH 8,0) и смесь ингибиторов протеаз и фосфатаз) и несколько раз ресуспендировали и перемешивали (Вортекс V-1 plus, Biosan, Латвия). После полного растворения осадка лизат центрифугировали при 14400 об/мин при температуре 4 °С в течение 10 мин, затем супернатант помещали в отдельную пробирку (полимерная фракция тубулина). Далее проводились описанные выше этапы вестерн-блоттинга и детекция экспрессии α -тубулина в свободной и полимеризованной фракциях.

Были использованы следующие первичные АТ для вестерн-блоттинга: коктейль антител Cell Cycle and Apoptosis WB Cocktail (p-Cdk2 (Tyr15)/p-H3 (Ser10)/Actin/Cleaved PARP) (Abcam, США), циклин A2, расщепленная форма каспазы 3 (cl. caspase-3) (Cell Signaling, США), α -тубулин (Sigma-Aldrich, США) и β -актин (GenScript, США).

Имунофлуоресцентная микроскопия. Опухолевые клетки засеивали на покровные стекла, предварительно покрытые поли-L-лизинном (Sigma-Aldrich, США) и культивировали в 6-луночных плоскодонных планшетах (Corning Inc., США) в течение 48 ч. Затем в течение 8 ч опухолевые клетки культивировали в присутствии исследуемых соединений и препаратов сравнения.

Для визуализации p-H3-положительных клеток покровные стекла с клетками фиксировали 4 % раствором формальдегида в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем последовательно проводили: 3-кратный отмыв фосфатно-солевым буфером (ФСБ); инкубацию в блокирующем растворе (ФСБ с 5 % козьей сывороткой и 0,3 % Triton X-100) в течение 60 мин при комнатной температуре; инкубацию в присутствии АТ к p-H3 (Ser10), конъюгированных с вторичными АТ Alexa Fluor 488 (Cell Signaling, США) и разведенных в соотношении 1:200 в ФСБ, содержащем 1 % БСА и 0,3 % Triton X-100, в течение 16 ч при 4 °С; 3-кратный отмыв ФСБ. Перед визуализацией к клеткам

добавлялся ядерный краситель DAPI (Sigma-Aldrich, США).

Для исследования тубулиновых микротрубочек покровные стекла с клетками фиксировали смесью метанола и ацетона (соотношение 1:1) в течение 20 мин при -20°C . Затем последовательно проводили: 3-кратный отмыв ФСБ; инкубацию в блокирующем растворе (ФСБ с 5 % козьей сывороткой и 0,3 % Triton X-100) в течение 60 мин при комнатной температуре; инкубацию в присутствии первичных моноклональных АТ к α -тубулину (Sigma-Aldrich, США) в течение 16 ч при 4°C ; 3-кратный отмыв ФСБ; инкубацию со вторичными АТ, конъюгированными с техасским красным (Invitrogen, США) в течение 60 мин при комнатной температуре; 3-кратный отмыв ФСБ. Для визуализации ядер к клеткам добавлялся краситель DAPI (Sigma-Aldrich, США). Визуализацию результатов проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus BX63 (Olympus, Япония). Для каждого экспериментального условия проведены 3 повтора.

Проточная цитофлуориметрия. Распределение опухолевых клеток по фазам клеточного цикла исследовали на проточном цитофлуориметре Guava Muse (Luminex, США) с помощью коммерческого набора Cell Cycle Kit (Luminex, США) в соответствии с протоколом производителя. Эксперименты проведены как минимум в 5 повторностях.

Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия Тьюки на множественные сравнения с использованием программного обеспечения R (R Foundation for Statistical Computing, Австрия; <https://www.R-project.org/> – по состоянию на 25.11.2023).

Оценка противоопухолевой активности соединений на сингенной модели. Противоопухолевые свойства (торможение роста опухоли) лидерных соединений оценивали с использованием сингенной модели. Восемь самкам мышей Balb/c в возрасте от 5 до 8 нед в латеральные области подкожно трансплантировали мышиную недифференцированную колоректальную аденокарциному линии Colon-26 (100 мкл суспензии в ФСБ Дульбекко содержало 200 тыс. клеток). После достижения опухолью объемов $\sim 50\text{ мм}^3$ мышей рандомизировали на 2 группы: мышам 1-й группы вводили внутривенно 100 мкл растворителя, мышам 2-й группы – 100 мкл лидерного соединения (10 мг/кг) на 10, 13, 16, 19, 22, 25 и 28-й день после трансплантации опухоли. Растворитель содержал 4,6 % ДМСО, 40 % ПЭГ-400, 5 % Твин-80 и 50,4 % деионизованной воды. Объемы опухолей измеряли штангенциркулем каждые 3 дня в течение 30 дней. Средние объемы опухолей в каждой экспериментальной группе рассчитывали следующим образом: длина \times ширина \times глубина $\times 0,5$. Затем строили кривые роста опухолей.

Выделенный опухолевый материал фотографировали, взвешивали, фиксировали в 4 % параформальдегиде и заливали в парафин. Затем проводили гистологическое окрашивание гематоксилином и эозином,

а также иммуногистохимическое окрашивание АТ к расщепленной форме каспазы-3 (Cell Signaling, США) парафиновых срезов. Изображения окрашенных образцов сняты с помощью микроскопа Olympus BX63 (Olympus, Токио, Япония).

Статистическую обработку проводили с использованием параметрических (t -критерий Стьюдента и критерий Фишера) и непараметрических (критерий Уилкоксона) методов. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитотоксическая активность ЕРС-91, ЕРС-92 и РСА-93 изучена на панели опухолевых клеточных линий с использованием колориметрического МТС-метода. Половинные ингибирующие рост клеток концентрации исследуемых соединений вычислены с помощью онлайн-калькулятора (<https://www.ic50.tk>) (табл. 1, 2). Согласно полученным значениям IC_{50} ЕРС-92 показал умеренную, а ЕРС-91 и РСА-93 – высокую цитотоксическую активность в отношении всех использованных опухолевых клеточных линий, в том числе с фенотипом МЛУ. При этом кратность изменений IC_{50} стандартных химиопрепаратов (доксорубин, паклитаксел, винбластин) (индекс резистентности) в сублиниях НСС1806 Тх-Р, SaOS-2 Dox-R и GIST T-1 Тх-Р по отношению к материнским линиям НСС1806, SaOS-2, GIST T-1 достигала очень высоких значений (например, индекс резистентности винбластин в сублинии НСС1806 Тх-Р был равен 800), в то время как индекс резистентности ЕРС-91, ЕРС-92 и РСА-93 варьировал от 0,5 до 3, что свидетельствует об отсутствии перекрестной устойчивости опухолевых клеток к отдельным химиопрепаратам (доксорубину, паклитакселу, винбластину).

При изучении цитотоксической активности ЕРС-91, ЕРС-92 и РСА-93 обнаружено, что 24-часовая инкубация опухолевых клеток в присутствии исследуемых соединений приводит не только к уменьшению конfluenceности клеточных культур, но и к изменению морфологии клеток, схожих с изменениями при их культивировании с химиопрепаратом класса винкалоидов винбластином. Накопление клеток округлой формы (предположительно митотических) под влиянием ЕРС-91, ЕРС-92, РСА-93 и винбластина показано на рис. 2.

Аналогичные морфологические изменения могут быть обусловлены схожим механизмом действия исследуемых соединений и винбластина. Винбластин-индуцированная митотическая катастрофа (остановка клеточного цикла в М-фазе) обусловлена ингибированием полимеризации тубулина и нарушением сборки микротрубочек веретена деления. Для обнаружения подобной активности у синтезированных нами соединений проведены следующие эксперименты. Опухолевые клетки сублинии НСС1806 Тх-Р инкубировали в течение 8 ч в присутствии ЕРС-91, ЕРС-92 и РСА-93,

Таблица 1. Значения половинных ингибирующих концентраций (IC_{50}) для EPC-91, EPC-92, PCA-93, доксорубицина (Dox), паклитаксела (Tx) и винбластина (Vin) в опухолевых линиях HCC1806, HCC1806 Tx-R, SaOS-2, SaOS-2 Dox-R, GIST T-1, GIST T-1 Tx-R, Colon-26 ($n = 3$), мкМ, среднее значение \pm стандартное отклонение

Table 1. Concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) values (in the micromolar range) for EPC-91, EPC-92, PCA-93, doxorubicin (Dox), paclitaxel (Tx) and vinblastine (Vin) in HCC1806, HCC1806 Tx-R, SaOS-2, SaOS-2 Dox-R, GIST T-1, GIST T-1 Tx-R, Colon-26 cancer lines ($n = 3$), μM , mean \pm standard deviation

Клеточная линия/сублиния Cell line/subline	PC-91	EPC-92	PCA-93	Dox	Tx	Vin
HCC1806 Tx-R	10,3 \pm 0,4	32,1 \pm 1,5	12,2 \pm 0,3	1,8 \pm 0,5 [60]	5,4 \pm 1 [60]	(3 \pm 0,4) $\times 10^{-4}$
HCC1806	3,5 \pm 0,4	15,7 \pm 1,2	5,2 \pm 0,8	0,22 \pm 0,004 [60]	0,22 \pm 0,01 [60]	0,25 \pm 0,019
SaOS-2 Dox-R	2 \pm 0,1	7,3 \pm 0,3	2,4 \pm 0,02	0,97 \pm 0,12 [56]	(3,9 \pm 0,8) $\times 10^{-9}$ [56]	(2,9 \pm 0,5) $\times 10^{-4}$ [56]
SaOS-2	2,5 \pm 0,1	5 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1	0,16 \pm 0,02 [56]	(1,196 \pm 0,209) $\times 10^{-7}$ [56]	(1,22 \pm 0,21) $\times 10^{-3}$ [56]
GIST T-1 Tx-R	1,7 \pm 0,2	2,4 \pm 0,4	1 \pm 0,05	6,5 \pm 1 [60]	0,46 \pm 0,08 [60]	0,073 \pm 0,009
GIST T-1	1,4 \pm 0,1	5,2 \pm 0,1	0,6 \pm 0,07	0,04 \pm 0,005 [60]	<0,01 [60]	0,044 \pm 0,007
Colon-26	5,5 \pm 0,2	14,1 \pm 0,2	4 \pm 0,1	>256	0,11 \pm 0,028	2 \pm 0,2

Примечание. Здесь и в табл. 2: в квадратных скобках указаны ссылки на публикации, в которых приведены значения IC_{50} для соответствующих химиопрепаратов.

Note. Here and in table 2: in square brackets are links to publications that provide IC_{50} values for the corresponding chemotherapy drugs.

Таблица 2. Индекс резистентности в сублиниях HCC1806 Tx-R, SaOS-2 Dox-R и GIST T-1 Tx-R

Table 2. Resistance index in HCC1806 Tx-R and SaOS-2 Dox-R cancer sublines

Клеточная сублиния Cell subline	PC-91	EPC-92	PCA-93	Dox	Tx	Vin
HCC1806 Tx-R	3	2,1	2,4	81,8 [60]	24,5 [60]	800
SaOS-2 Dox-R	0,8	1,5	2,2	6,1 [56]	30,7 [56]	4,2 [56]
GIST T-1 Tx-R	1,2	0,5	1,6	162,5 [60]	>46 [60]	1,7

Примечание. Dox – доксорубицин; Tx – паклитаксел; Vin – винбластин.

Note. Dox – doxorubicin; Tx – paclitaxel; Vin – vinblastine.

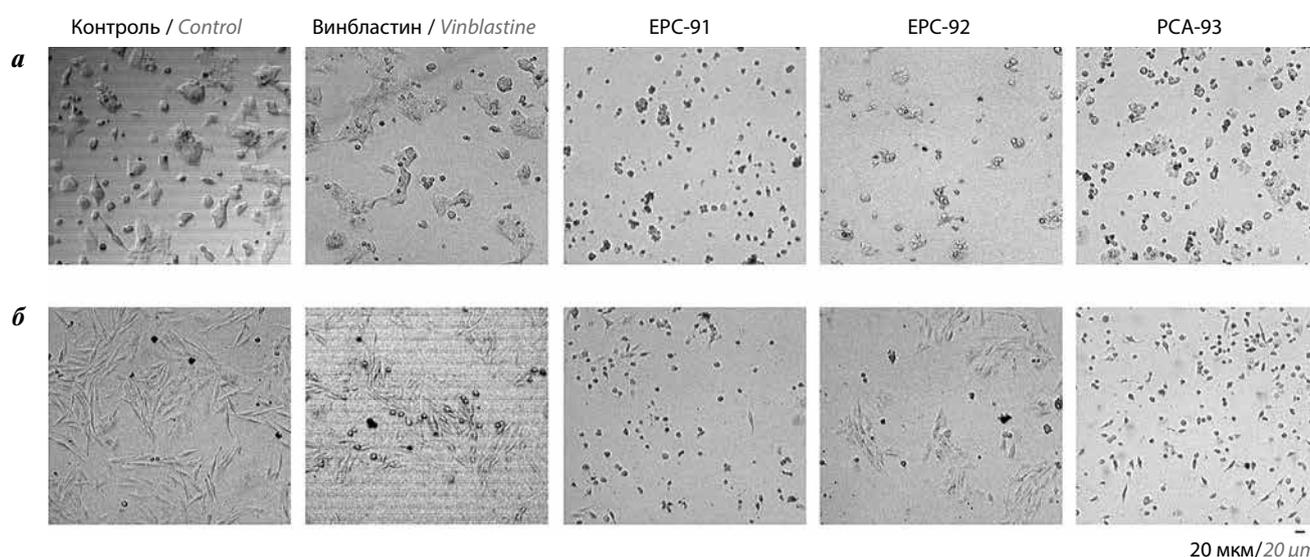


Рис. 2. Морфологические изменения в клетках сублиний SaOS-2 Dox-R (а) и GIST T-1 Tx-R (б), культивированных в течение 24 ч в присутствии растворителя (диметилсульфоксида) (отрицательный контроль) (5 мкМ), винбластина (0,05 мкМ) (положительный контроль), EPC-91 (5 мкМ), EPC-92 (5 мкМ) и PCA-93 (5 мкМ). $\times 10$

Fig. 2. Changes in morphology of SaOS-2 Dox-R (a) and GIST T-1 Tx-R (b) cancer cells treated by EPC-91 (5 μM), EPC-92 (5 μM), PCA-93 (5 μM), vinblastine (0,05 μM) (positive control), cultured in presence of the solvent DMSO (dimethyl sulfoxide) for 24 h. $\times 10$

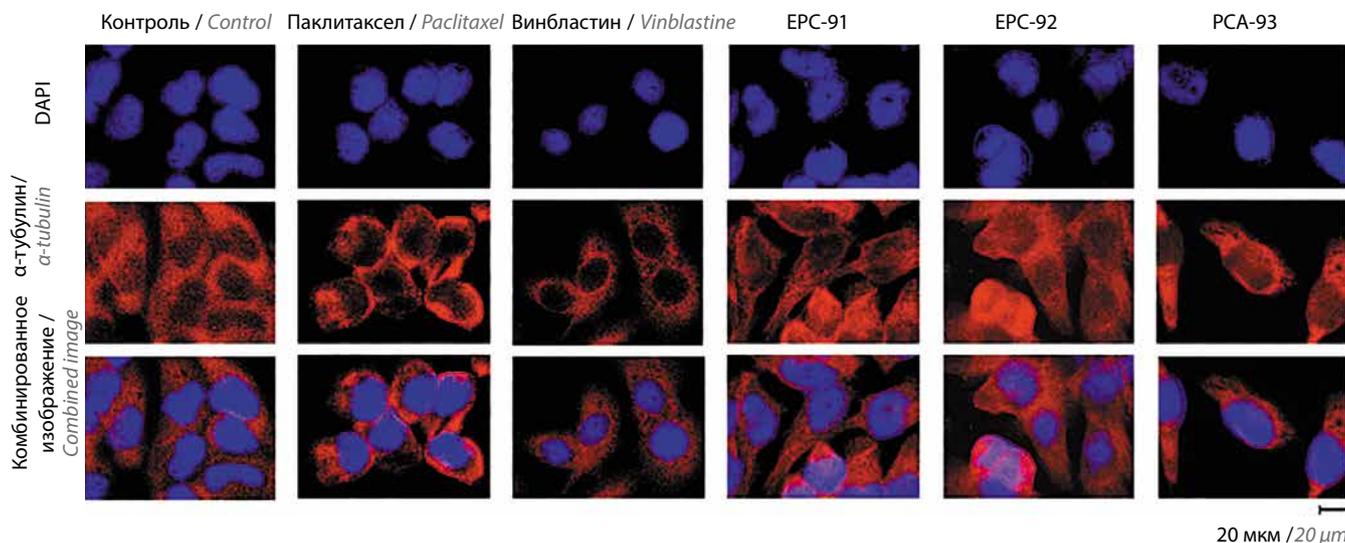


Рис. 3. Ингибирование сборки микротрубочек в опухолевых клетках линии HCC1806 Tx-R под влиянием EPC-91 и PCA-93. Клетки HCC1806 Tx-R инкубировали с диметилсульфоксидом (контроль), паклитакселом (10 мкМ), винбластинем (0,01 мкМ), EPC-91, EPC-92 и PCA-93 (5 мкМ) в течение 8 ч, затем фиксировали смесь метанола и ацетона (соотношение 1:1) и окрашивали антителами к α -тубулину (красный цвет) и ядерным красителем DAPI (синий цвет), $\times 100$

Fig. 3. EPC-91 and PCA-93 disrupt the microtubules network in cancer cells. HCC1806 Tx-R breast cancer cells were treated with dimethyl sulfoxide (control), paclitaxel (10 μ M), vinblastine (0,01 μ M), EPC-91, EPC-92 and PCA-93 (5 μ M) for 8 h, fixed with a mixture of methanol and acetone, and stained with mAbs targeting α -tubulin (red). DAPI nuclear staining (blue) was used to outline the nuclei, $\times 100$

а также винбластина (препарата, деполимеризующего тубулин) и паклитаксела (препарата, полимеризующего тубулин). Затем клетки фиксировали для иммунофлуоресцентного окрашивания на α -тубулин с целью выявления структурных изменений в сборке тубулиновых нитей.

Обнаружено, что под влиянием EPC-91 и PCA-93, а также винбластина в опухолевых клетках, в отличие от контроля, не визуализируются тонкие тубулиновые нити, по форме напоминающие паутину, а наблюдается диффузное окрашивание α -тубулина в виде взвеси, что свидетельствует о его деполимеризации и нарушении сборки тубулиновых микротрубочек (рис. 3). В свою очередь, паклитаксел приводит к конденсации тубулиновых нитей в виде тяжей и пучков, что говорит об изменении динамического состояния тубулиновых белков цитоскелета в сторону их стабилизации (см. рис. 3).

Для подтверждения деполимеризующего влияния на тубулин в исследуемых соединениях также проанализирована экспрессия его растворенной и полимеризованной форм. Выявлено достоверное повышение уровня экспрессии тубулина в растворимой (свободной) фракции клеток линии HCC1806 Tx-R, инкубированных в присутствии PCA-93 и винбластина, по сравнению с контрольными и инкубированными паклитакселом клетками (рис. 4). В свою очередь, в клетках, инкубированных в присутствии данного препарата, наблюдалась гиперэкспрессия α -тубулина в полимеризованной клеточной фракции, что подтверждает способность данного химиопрепарата инициировать полимеризацию тубулина.

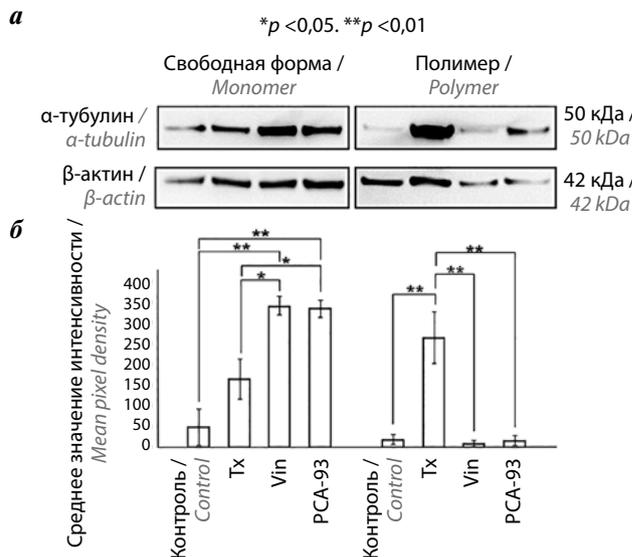


Рис. 4. Ингибирование полимеризации тубулина в опухолевых клетках линии HCC1806 Tx-R под влиянием PCA-93: а – данные вестерн-блоттинга, иллюстрирующие уровень экспрессии α -тубулина в растворимых (свободная форма) и полимеризованных (полимер) клеточных фракциях линии HCC1806 Tx-R после 24-часовой инкубации в присутствии паклитаксела (Tx) (10 мкМ), винбластина (Vin) (0,01 мкМ) и PCA-93 (5 мкМ). В качестве контроля белковой нагрузки в исследуемых образцах использовался β -актин; б – денситометрический анализ уровня экспрессии α -тубулина в растворимых (свободная форма) и полимеризованных (полимер) клеточных фракциях линии HCC1806 Tx-R, представленного на рис. 3, а

Fig. 4. PCA-93 inhibits α -tubulin polymerization in HCC1806 Tx-R tumor cells: а – Western Blot analysis of α -tubulin protein in soluble and polymerized cell fractions after treatment with paclitaxel (Tx) (10 μ M), vinblastine (Vin) (0,01 μ M), and PCA-93 (5 μ M). β -actin staining was used to show the comparable amounts of protein loaded into each sample; б – quantification by mean pixel density of level of α -tubulin expression in soluble (monomer) and polymerized (polymer) fractions in HCC1806 Tx-R line, presented in fig. 3, а

Таким образом, результаты иммунофлуоресцентного окрашивания и вестерн-блоттинга свидетельствуют о способности исследуемых соединений ингибировать процессы сборки микротрубочек и полимеризации тубулина, что может привести к остановке клеточного цикла в одной из точек рестрикции (М-фазе). Для подтверждения данной гипотезы исследовано распределение фаз клеточного цикла в опухолевых клетках под влиянием EPC-91, EPC-92 и PCA-93 методом проточной цитофлуориметрии. Результаты, представленные на рис. 5 и в табл. 3, свидетельствуют о преимущественном накоплении клеток сублинии SaOS-2 Dox-R, культивируемых в присутствии EPC-91, EPC-92 и PCA-93, в G2/M-фазе клеточного цикла. Аналогичные данные получены и в отношении других опухолевых клеточных линий.

Для подтверждения того, что появление округлых клеток под влиянием EPC-91, EPC-92 и PCA-93 (см. рис. 1) является результатом ареста клеток в фазе митоза (митотическая катастрофа), проведены дальнейшие исследования по выявлению маркеров М-фазы клеточного цикла с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии и вестерн-блоттинга.

Результаты иммунофлуоресцентной микроскопии показали значительное увеличение количества р-Н3-положительных клеток линии HCC1806 Тх-Р под влиянием EPC-91 и PCA-93 по сравнению с контрольными клетками (рис. 6). Как известно, фосфорилирование гистона Н3 по серину в положении 10 связано непосредственно с процессами деления клетки, так как оно не наблюдается в интерфазе, а начинается в профазе, достигает максимума в метафазе и исчезает в телофазе митоза, поэтому фосфорилированная форма гистона Н3 (фосфо-Н3 (Ser10) считается классическим маркером митотических клеток. Повышение количества р-Н3-положительных клеток наблюдалось также в отношении винбластина, но не паклитаксела, что подтверждает наличие резистентности клеток сублинии HCC1806 Тх-Р к паклитакселу.

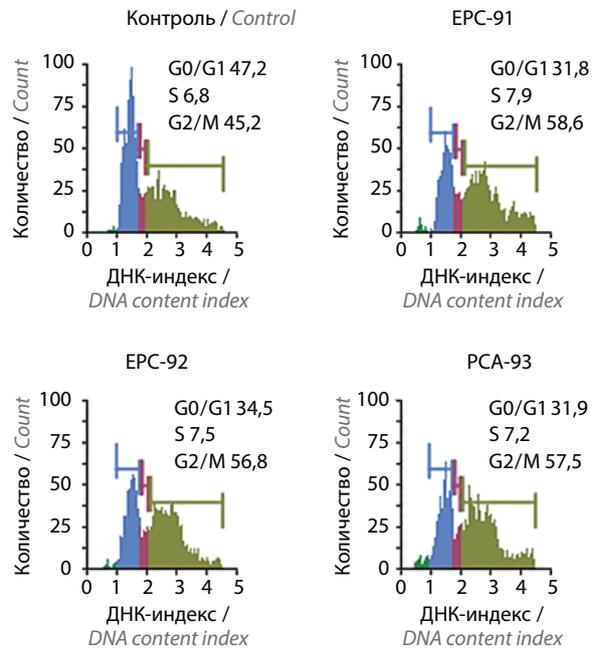


Рис. 5. Накопление опухолевых клеток линии SaOS-2 Dox-R в G2/M-фазе клеточного цикла под влиянием EPC-91, EPC-92 и PCA-93. Репрезентативные изображения распределения фаз клеточного цикла в клетках сублинии остеосаркомы SaOS-2 Dox-R, культивируемых в присутствии диметилсульфоксида (контроль) (5 мкМ), EPC-91 (5 мкМ), EPC-92 (5 мкМ) и PCA-93 (5 мкМ) в течение 24 ч

Fig. 5. Accumulation of SaOS-2 Dox-R cancer cells in the G2/M phases after treatment with EPC-91, EPC-92 and PCA-93. Representative histograms illustrating the changes in cell cycle profile of SaOS-2 Dox-R cells treated with dimethyl sulfoxide (negative control) (5 μM), EPC-91 (5 μM), EPC-92 (5 μM) and PCA-93 (5 μM) for 24 h

Результаты иммуноблоттинга, представленные на рис. 7, также свидетельствовали о повышении уровня экспрессии р-Н3 (Ser10) в материнских (SaOS-2, GIST T-1) и резистентных (SaOS-2 Dox-R, GIST T-1 Тх-Р) сублиниях клеток под влиянием EPC-91, EPC-92, PCA-93 и винбластина. В свою очередь, экспрессия белков, регулирующих клеточный цикл (p-Cdk2 (Tyr15) и циклин А2) под влиянием вышеуказанных соединений, напротив, снижалась.

Таблица 3. Распределение фаз клеточного цикла в клетках сублинии остеосаркомы SaOS-2 Dox-R после воздействия диметилсульфоксида (контроль), EPC-91, EPC-92 и PCA-93 (5 мкМ) (n = 5), среднее ± стандартное отклонение

Table 3. Cell cycle distribution in SaOS-2 Dox-R cancer subline treated with dimethyl sulfoxide (control), EPC-91, EPC-92 and PCA-93 (5 μM) (n = 5), mean ± standard deviation

Воздействие Effects	Фаза G0/G1 G0/G1 phase	Фаза S S phase	Фаза G2/M G2/M phase
Контроль Control	46,7 ± 0,9	6,8 ± 0,6	45,6 ± 0,4
EPC-91	32,5 ± 0,9*	8,5 ± 0,6**	57,3 ± 1,4*
EPC-92	34,6 ± 1,0*	7,7 ± 0,9	56,3 ± 1,6*
PCA-93	33,0 ± 1,1*	7,9 ± 0,6***	55,9 ± 1,2*

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

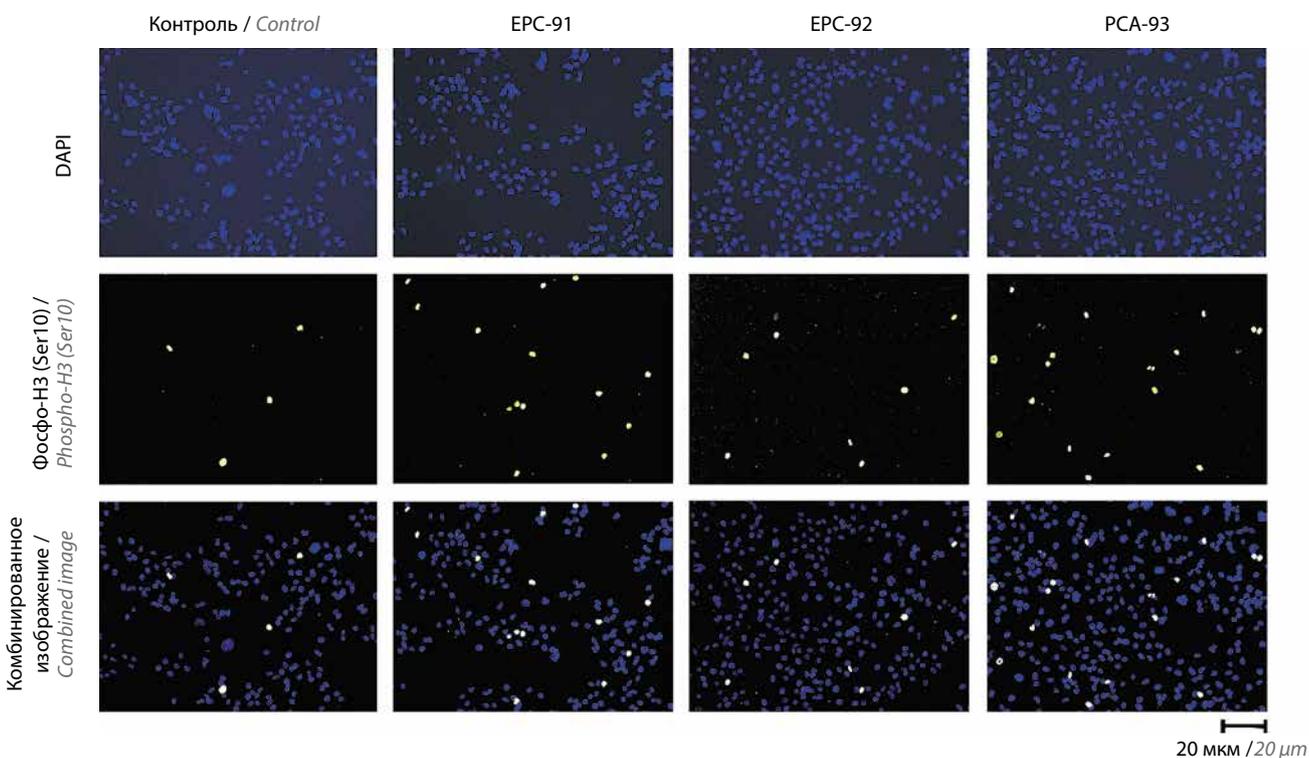


Рис. 6. Накопление опухолевых клеток линии HCC1806 Tx-R в M-фазе под влиянием EPC-91 и PCA-93. Репрезентативные изображения клеток сублинии HCC1806 Tx-R, инкубированных в присутствии диметилсульфоксида (отрицательный контроль), EPC-91 (5 мкМ), EPC-92 (5 мкМ) и PCA-93 (5 мкМ) в течение 8 ч. Клетки фиксировали 4 % параформальдегидом и окрашивали антителами к фосфорилированной форме гистона 3 (фосфо-Н3 (Ser10)), конъюгированными с флуорохромом Alexa488 (зеленый цвет) и ядерным красителем DAPI (синий цвет). ×10
Fig. 6. EPC-91 and PCA-93 induce accumulation of HCC1806 Tx-R breast cancer cells in M-phase. The representative images of cancer cells treated with dimethyl sulfoxide (negative control), EPC-91 (5 μM), EPC-92 (5 μM) and PCA-93 (5 μM) for 8 h. The cells were fixed with 4 % paraformaldehyde and immunostained by using the Alexa488-conjugated anti-histone H3 phosphorylated on residue Ser10 (anti-p-H3 (Ser10)) antibody (green color). Cell nuclei were outlined by staining with DAPI (blue color). ×10

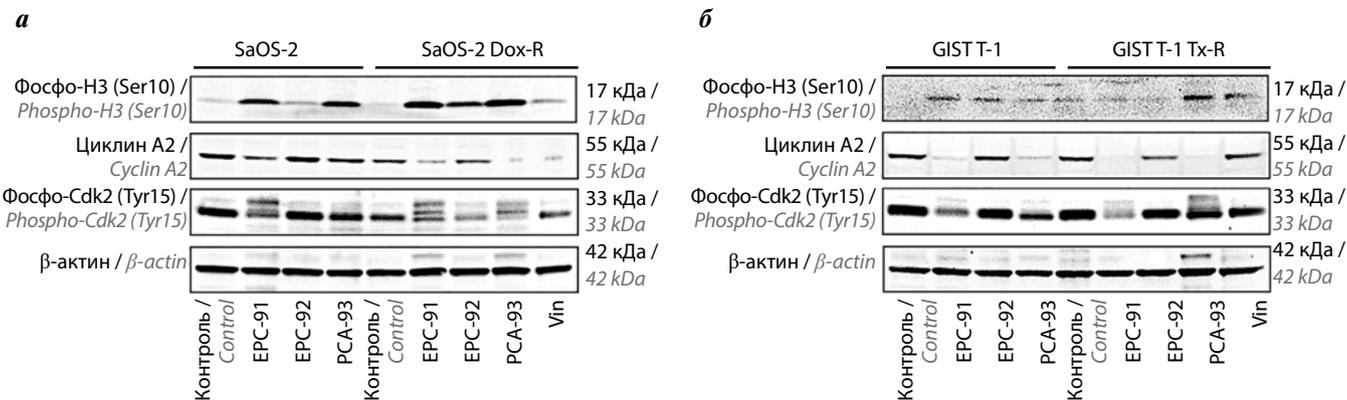


Рис. 7. Нарушения регуляции клеточного цикла в опухолевых клетках линий SaOS-2, SaOS-2 Dox-R, GIST T-1, GIST T-1 Tx-R под влиянием EPC-91, EPC-92 и PCA-93. Уровень экспрессии циклина A2 и фосфорилированных форм гистона 3 (фосфо-Н3 (Ser10)) и циклинзависимой киназы 2 (фосфо-Cdk2 (Tyr15)) в клетках линий SaOS-2, SaOS-2 Dox-R (а) и GIST T-1, GIST T-1 Tx-R (б) после их культивирования с диметилсульфоксидом (контроль) (5 мкМ), EPC-91 (5 мкМ), EPC-92 (5 мкМ), PCA-93 (5 мкМ) и винбластинем (Vin) (0,05 мкМ) в течение 48 ч. Уровень экспрессии β-актина использовали в качестве контроля белковой нагрузки в исследуемых образцах
Fig. 7. EPC-91, EPC-92 and PCA-93 induce abnormalities of cell cycle regulation in SaOS-2, SaOS-2 Dox-R, GIST T-1, GIST T-1 Tx-R cancer lines. Immunoblot analysis for the expression histone H3 phosphorylated on residue Ser10 (phospho-H3 (Ser10)), cyclin A2, and cyclin-dependent kinase 2 phosphorylated on residue Tyr15 (phospho-Cdk2 (Tyr15)) in SaOS-2, SaOS-2 Dox-R (a) and GIST T-1, GIST T-1 Tx-R (b) after treatment with dimethyl sulfoxide (control) (5 μM), EPC-91 (5 μM), EPC-92 (5 μM), PCA-93 (5 μM), and vinblastine (Vin) (0,05 μM) for 48 h. β-actin stain is used as a loading control

Данные нарушения в регуляции клеточного цикла, индуцированные EPC-91, EPC-92 и PCA-93, приводили к гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза, о чем свидетельствовало повышение уровней

экспрессии маркеров программируемой клеточной гибели – расщепленных форм поли(АДФ-рибоза)-полимеразы и каспазы 3 (рис. 8) под влиянием EPC-91, EPC-92 и PCA-93. Следует отметить, что EPC-91

и PCA-93 проявляли бóльшую проапоптотическую активность в отношении линий SaOS-2 Dox-R и GIST T-1 Tx-R по сравнению с винбластином.

Аналогичные результаты получены в отношении мышинной опухолевой клеточной линии Colon-26 (рис. 9). Следует отметить, что наиболее значимые изменения наблюдались в опухолевых клетках, культивированных в присутствии PCA-93. В связи с этим данное лидерное соединение было использовано для последующего изучения его противоопухолевых свойств.

Противоопухолевая активность PCA-93 изучалась на модели синотрансплантата Colon-26. Мышам линии Balb/c подкожно трансплантировали клетки линии Colon-26. После достижения объемов опухолей 50 см³ группы животных рандомизировали и интраперитонеально вводили растворитель (контроль) или PCA-93 в дозе 10 мг/кг на 10, 13, 16, 19, 22, 25 и 28-й дни эксперимента. Обнаружено, что на 30-й день

после инокуляции клеток Colon-26 у лабораторных животных контрольной группы размеры опухоли 8-кратно превышали аналогичный показатель у мышей, которым вводили соединение PCA-93 (рис. 10, а). Репрезентативные фотографии мышей с опухолями, а также размеры выделенных опухолей обеих групп показаны на рис. 10, б, в соответственно. Данные результаты коррелировали с объемом и массой опухолей. Важно, что за весь период эксперимента (30 дней) в группе животных, получавших инъекции соединения PCA-93, не наблюдалось системных побочных эффектов.

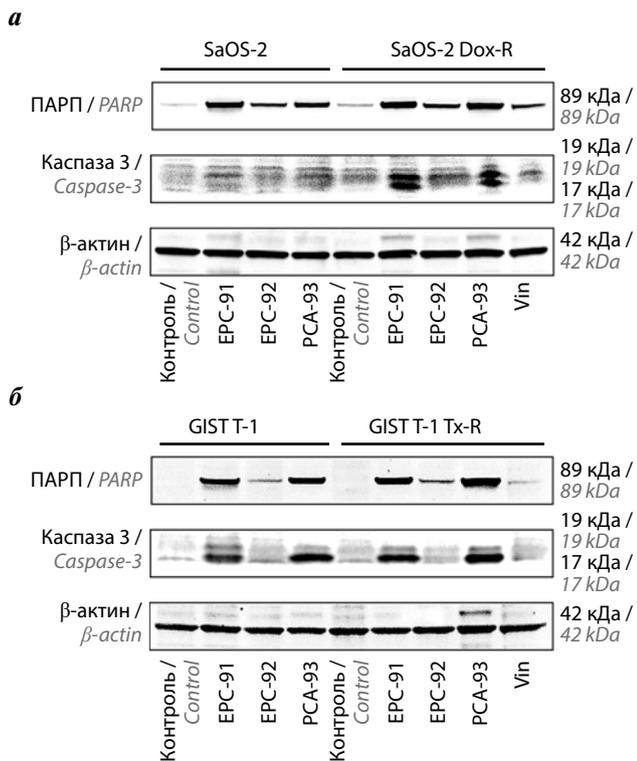


Рис. 8. Индукция апоптоза в опухолевых клетках линий SaOS-2, SaOS-2 Dox-R, GIST T-1, GIST T-1 Tx-R под влиянием EPC-91, EPC-92 и PCA-93. Уровень экспрессии расщепленных форм поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП) и каспазы 3 в клетках линий SaOS-2, SaOS-2 Dox-R (а) и GIST T-1, GIST T-1 Tx-R (б) после их культивирования с диметилсульфоксидом (контроль) (5 мкМ), EPC-91 (5 мкМ), EPC-92 (5 мкМ), PCA-93 (5 мкМ) и винбластином (Vin) (0,05 мкМ) в течение 48 ч. Уровень экспрессии β-актина использовали в качестве контроля белковой нагрузки в исследуемых образцах

Fig. 8. EPC-91, EPC-92 and PCA-93 induce apoptosis of SaOS-2, SaOS-2 Dox-R, GIST T-1, GIST T-1 Tx-R cancer lines. Immunoblot analysis for apoptosis markers (e. g., cleaved forms of poly-ADP-ribose polymerase (PARP) and caspase-3) in SaOS-2, SaOS-2 Dox-R (a) and GIST T-1, GIST T-1 Tx-R (b) after treatment with dimethyl sulfoxide (control) (5 μM), EPC-91 (5 μM), EPC-92 (5 μM), PCA-93 (5 μM), and vinblastine (Vin) (0,05 μM) for 48 h. β-actin stain is used as a loading control

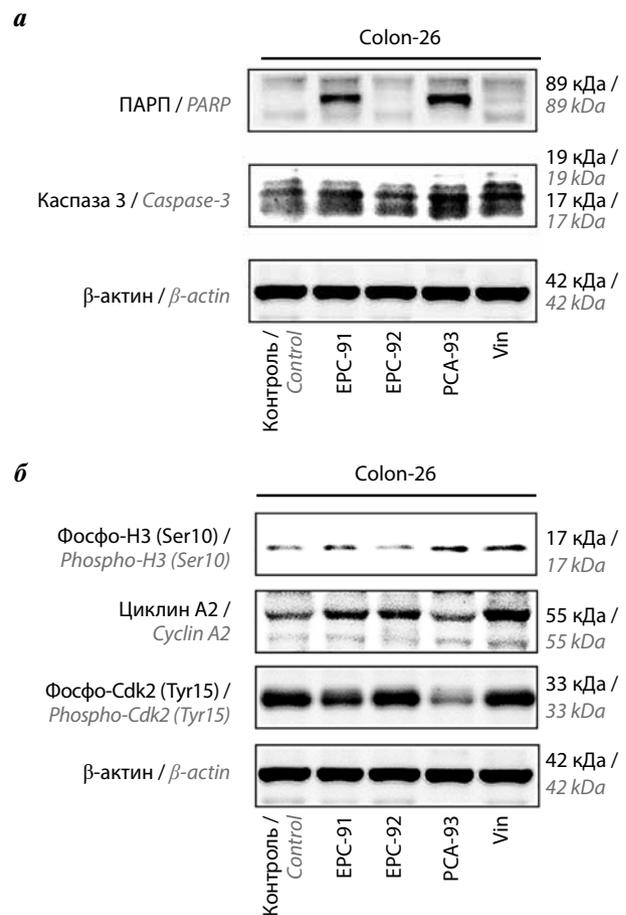


Рис. 9. Индукция апоптоза и нарушений регуляции клеточного цикла в опухолевых клетках линии Colon-26 под влиянием EPC-91, EPC-92 и PCA-93. Уровень экспрессии расщепленных форм поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП) и каспазы 3 (а), циклина А2, фосфорилированных форм гистона 3 (фосфо-Н3 (Ser10)) и циклинзависимой киназы 2 (фосфо-Сdk2 (Tyr15)) (б) в клетках линии Colon-26 при культивировании в присутствии диметилсульфоксида (контроль) (5 мкМ), EPC-91 (5 мкМ), EPC-92 (5 мкМ), PCA-93 (5 мкМ) и винбластину (Vin) (0,05 мкМ) в течение 48 ч. Уровень экспрессии β-актина использовали в качестве контроля белковой нагрузки в исследуемых образцах

Fig. 9. EPC-91, EPC-92 and PCA-93 induce apoptosis and abnormalities of cell cycle regulation in Colon-26 cancer line. Immunoblot analysis for apoptosis markers (e. g., cleaved forms of poly-ADP-ribose polymerase (PARP) and caspase-3) (a) and for the expression of histone H3 phosphorylated on residue Ser10 (phospho-H3 (Ser10)), cyclin A2, and phosphorylated on residue Tyr15 (phospho-Cdk2 (Tyr15)) (b) in Colon-26 after treatment with dimethyl sulfoxide (control) (5 μM), EPC-91 (5 μM), EPC-92 (5 μM), PCA-93 (5 μM), and vinblastine (Vin) (0,05 μM) for 48 h. β-actin stain is used as a loading control

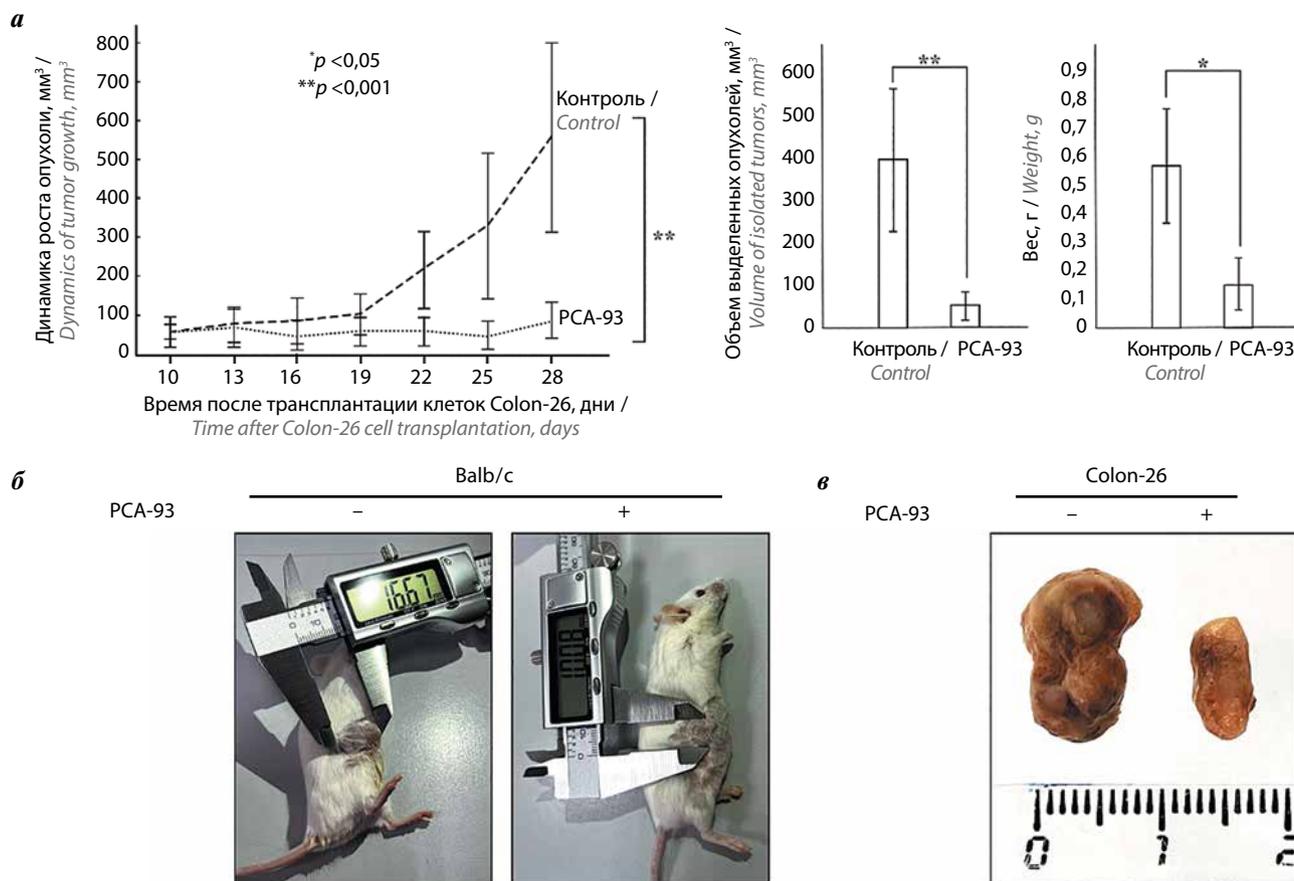


Рис. 10. Противопухольная активность PCA-93 на модели синотрансплантата Colon-26 мышей Balb/c: а – динамика роста опухолей, объемов и веса опухолей для каждой экспериментальной группы; б – изображения мышей с опухолью в каждой экспериментальной группе; в – репрезентативные изображения окончательных объемов опухоли в каждой экспериментальной группе. После подкожной инокуляции клеток Colon-26 (14-й день) мышей Balb/c рандомизировали на 2 группы (n = 4) и вводили внутривенно 100 мкл растворителя (отрицательный контроль) или PCA-93 (10 мг/кг). Объем опухоли в каждой группе измеряли штангенциркулем и рассчитывали следующим образом: длина × ширина × ширина × 0,5. Результаты выражали в виде среднего объема и веса опухолей (среднее ± ошибка среднего) (n = 5)

Fig. 10. Anti-tumor activity of PCA-93 in a Balb/c mice sinograft Colon-26 models: а – dynamics of the tumor growth, tumor volumes and weights for each experimental group; б – images mice with the tumor in each experimental group; в – representative images of the final tumor volumes in each experimental group. After subcutaneous inoculation of Colon-26 cells (day 14), Balb/c mice were randomized into 2 groups (n = 4) and administered i. p. 100 μL of vehicle (negative control) or PCA-93 (10 mg/kg). Tumor volumes in each group were assessed by calipers and calculated as length × width × width × 0.5. Results were expressed as the mean volume and weight of tumors (mean ± standard error) (n = 5)

Окрашивание опухолей гематоксилином и эозинном позволило выявить уменьшение клеточности и возникновение очагов некроза под влиянием PCA-93 (рис. 11). Данное соединение также проявляло проапоптотическую активность в отношении синотрансплантата Colon-26, о чем свидетельствовало повышение количества каспаза-3-позитивных клеток по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез новых соединений, обладающих противоопухольной активностью, в том числе в отношении клеток, резистентных к используемым в настоящее время химиопрепаратам, является одним из перспективных научных направлений в области фундаментальной и практической онкологии. Несмотря на довольно высокую эффективность лекарственных препаратов, оказывающих влияние на динамическое состояние микротрубочек веретена деления, их про-

должительное применение в виде как моно-, так и комбинированной химиотерапии имеет ряд серьезных ограничений, обусловленных системными побочными эффектами (миелосупрессией, периферической нейропатией и др.) и неуклонным развитием резистентности злокачественных новообразований к данным лекарственным средствам, а также к химиопрепаратам с иным механизмом действия [61–67]. Последнее может являться следствием усиленной экскреции химиопрепаратов из опухолевых клеток, обусловленной активацией АВС-транспортеров [66, 68], процессов репарации повреждений ДНК [69], изменением молекулярной мишени [70–73] и нарушениями фармакодинамики химиопрепарата и его биодоступности [74, 75] и др. Следовательно, синтез новых химических соединений, влияющих на опухолевые клетки с МЛУ и в то же время имеющих меньшую системную токсичность, представляет безусловный научно-практический интерес.

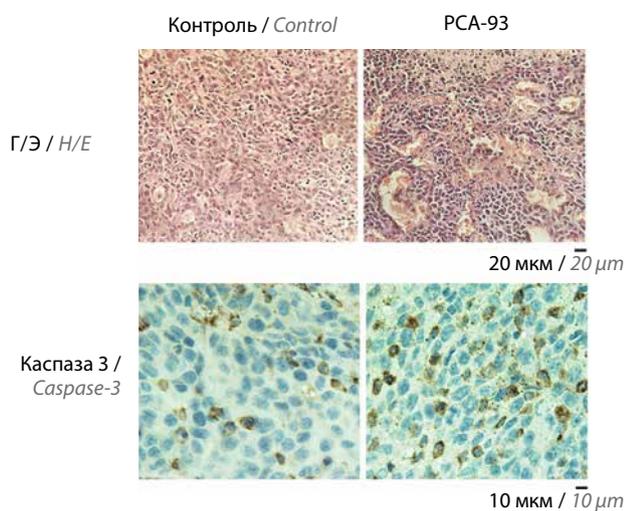


Рис. 11. Противоопухолевая и проапоптотическая активность соединения PCA-93 в отношении синотрансплантата Colon-26. Представительные изображения: окраска синотрансплантатов Colon-26 гематоксилином и эозином (Г/Э) (верхний ряд) и иммуногистохимическое окрашивание на расщепленную форму каспазы-3 (нижний ряд) у животных групп контроля и животных, получавших PCA-93 (10 мг/кг) в течение 7 дней

Fig. 11. PCA-93 exhibits anti-tumor and pro-apoptotic activities in Colon-26 sinografts. Representative images of hematoxylin and eosin-stained (H/E) (top row) and images of cleaved caspase-3 found by the IHC-staining (bottom row) of Colon-26 sinografts treated for 7 days with PCA-93 (10 mg/kg)

Ранее проведенные нами исследования показали, что пирролсодержащие гетероциклические соединения обладают высокой цитотоксической активностью в отношении широкого спектра трансформированных клеток *in vitro* [15, 43–49]. Было показано, что основным молекулярным механизмом действия данных соединений является их способность нарушать динамическое состояние микротрубочек веретена деления посредством ингибирования процессов полимеризации тубулина, что, в свою очередь, приводит к нарушениям в регуляции клеточного цикла, накоплению клеток в М-фазе и их последующей гибели по механизму апоптоза [15, 43–49]. С помощью методов компьютерного моделирования нам удалось выявить потенциальные сайты их связывания, находящиеся в колхициновом сайте α -тубулина [15, 47, 48]. Последующие исследования показали высокую противоопухолевую активность данных соединений *in vivo* на ксенографтных моделях опухолей [15, 45].

Данное исследование продемонстрировало высокую цитотоксическую активность новых синтезированных нами соединений в отношении довольно широкого спектра опухолевых клеток с фенотипом МЛУ. Примечательным являлся тот факт, что использованные в настоящей работе опухолевые клеточные линии отличались друг от друга типом гиперэкспрессированных АВС-транспортёров. В частности, для клеточной линии рака молочной железы HCC1806 основным транспортёром являлся ABCB1 (р-гликопротеин) [55], в то время как для клеток гастроинтестинальной стромальной опухоли характерна гипер-

экспрессия ABCC1 (MRP-1) [57], а для клеток аденокарциномы кишечника линии Colon-26 [76] и остеосаркомы линии SaOS-2 [56] – гиперэкспрессия ABCG2. Несмотря на выраженные различия в уровне экспрессии данных белков, все вышеуказанные клеточные линии были чувствительны к соединениям EPC-91 и PCA-93, что свидетельствует об их способности обходить различные адаптационные механизмы, направленные на экскрецию из опухолевых клеток химиопрепаратов разных групп. Наибольшая цитотоксическая активность выявлена для соединения PCA-93, что также подтверждено результатами данного исследования, проведенного на синографтной модели Colon-26: показана выраженная противоопухолевая активность данного соединения. Об этом свидетельствовали значительное сокращение размеров опухолей у животных, усиление гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза, а также значительное уменьшение количества пролиферирующих клеток.

Полученные нами данные коррелируют с результатами других исследований, свидетельствующих о высокой цитотоксической и противоопухолевой активности пирролсодержащих химических соединений. В пионерском исследовании S.L. Mooberry и соавт., опубликованном в 2007 г., показана высокая активность в отношении микротрубочек веретена деления соединения JG03–14, представляющего собой тетразамещенный бромированный пиррол. Результатами этого взаимодействия были нарушение регуляции клеточного цикла и накопление клеток в М-фазе вследствие образования aberrантных митотических волокон [77]. Последующие исследования показали, что способность пирролсодержащих соединений к деполимеризации тубулина является следствием их связывания с колхициновым доменом данного белка. Во всех источниках литературы, упомянутых выше, подчеркивалось, что активность соединений на основе пиррола в отношении деполимеризации тубулина обусловлена их связыванием с колхициновым доменом в молекуле тубулина. Это коррелирует с данными, полученными нашей исследовательской группой: выявлена способность многих этил-пиррол-карбоксилатов [47] и пиррол-карбоксамидов [15, 48] выступать в качестве эффективных лигандов при связывании с колхициновым сайтом тубулина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что 2 новых соединения, относящиеся к группе этил-пиррол-карбоксилатов (EPC-91) и пиррол-карбоксамидов (PCA-93), обладают наивысшей по сравнению с ранее синтезированными нами пирролсодержащими гетероциклическими соединениями цитотоксической и противоопухолевой активностью в отношении опухолевых клеток различного происхождения с фенотипом МЛУ. Это является следствием их способности нарушать процессы полимеризации α -тубулина, что приводит к выраженным нарушениям в регуляции

клеточного цикла и последующей гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза. Таким образом, этил-пиррол-карбоксилы и пиррол-карбоксамиды могут рассматриваться в качестве перспективных средств, обладающих противоопухолевой активностью, и являться платформой для разработки нового класса химио-

препаратов, эффективных в отношении широкого спектра злокачественных новообразований, в том числе у уже развившейся лекарственной устойчивостью к современным химиопрепаратам различных групп (ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа, ингибиторам микротрубочек веретена деления и др.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bhardwaj V., Gumber D., Abbot V. et al. Pyrrole: a resourceful small molecule in key medicinal hetero-aromatics. *RSC Adv* 2015;5:15233–66. DOI: 10.1039/C4RA15710A
- DeSimone R.W., Currie K.S., Mitchell S.A. et al. Privileged structures: applications in drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen* 2004;7(5):473–93. DOI: 10.2174/1386207043328544
- Duarte C.D., Barreiro E.J., Fraga C.A.M. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. *Mini-Rev Med Chem* 2007;7(11):1108–19. DOI: 10.2174/138955707782331722
- Li Petri G., Spanò V., Spatola R. et al. Bioactive pyrrole-based compounds with target selectivity. *Eur J Med Chem* 2020;208:112783. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112783
- Walsh C.T., Garneau-Tsodikova S., Howard-Jones A.R. Biological formation of pyrroles: Nature's logic and enzymatic machinery. *Nat Prod Rep* 2006;23:517–31. DOI: 10.1039/b605245m
- Ahmad S., Alam O., Naim M.J. et al. Pyrrole: An insight into recent pharmacological advances with structure activity relationship. *Eur J Med Chem* 2018;157:527–61. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.08.002
- Bianco M.C.A.D., Marinho D.I.L.F., Hoelz L.V.B. et al. Pyrroles as privileged scaffolds in the search for new potential HIV inhibitors. *Pharmaceuticals* 2021;14(9):893. DOI: 10.3390/ph14090893
- La Regina G., Bai R., Coluccia A. et al. New pyrrole derivatives with potent tubulin polymerization inhibiting activity as anticancer agents including hedgehog-dependent cancer. *J Med Chem* 2014;57:6531–52. DOI: 10.1021/jm500561a
- Jadala C., Prasad B., Prasanthi A.V.G. et al. Transition metal-free one-pot synthesis of substituted pyrroles by employing aza-Wittig reaction. *RSC Adv* 2019;9:30659–65. DOI: 10.1039/C9RA06778G
- Tang S., Zhou Z., Jiang Z. et al. Indole-based tubulin inhibitors: binding modes and sars investigations. *Molecules* 2022;27(5):1587. DOI: 10.3390/molecules27051587
- Romagnoli R., Oliva P., Salvador M.K. et al. A facile synthesis of diaryl pyrroles led to the discovery of potent colchicine site antimitotic agents. *Eur J Med Chem* 2021;214:113229. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113229
- Sun J., Chen L., Liu C. et al. Synthesis and biological evaluations of 1,2-diaryl pyrroles as analogues of combretastatin A-4. *Chem Biol Drug Des* 2015;86(6):1541–7. DOI: 10.1111/cbdd.12617
- Ma Z., Ma Z., Zhang D. Synthesis of multi-substituted pyrrole derivatives through [3+2] cycloaddition with tosylmethyl isocyanides (TosMICs) and electron-deficient compounds. *Molecules* 2018;23(10):2666. DOI: 10.3390/molecules23102666
- Mowery P., Mejia F.B., Franceschi C.L. et al. Synthesis and evaluation of the anti-proliferative activity of diaryl-3-pyrroline-2-ones and fused analogs. *Bioorganic Med Chem Lett* 2017;27(2):191–5. DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.11.076
- Boichuk S., Galembikova A., Syuzov K. et al. The design, synthesis, and biological activities of pyrrole-based carboxamides: the novel tubulin inhibitors targeting the colchicine-binding site. *Molecules* 2021;26(19):5780. DOI: 10.3390/molecules26195780
- Findeisen P., Mühlhausen S., Dempewolf S. et al. Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biol Evol* 2014;6(9):2274–88. DOI: 10.1093/gbe/evu187
- Avila J. Microtubule functions. *Life Sci* 1992;50(5):327–34. DOI: 10.1016/0024-3205(92)90433-P
- Vukušić K., Buđa R., Tolić I.M. Force-generating mechanisms of anaphase in human cells. *J Cell Sci* 2019;132(18):jcs231985. DOI: 10.1242/jcs.231985
- de Forges H., Bouissou A., Perez F. Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44(2):266–74. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.11.009
- Bonifacino J.S., Neeffes J. Moving and positioning the endolysosomal system. *Curr Opin Cell Biol* 2017;47:266–74. DOI: 10.1016/jceb.2017.01.008
- Wood K.W., Cornwell W.D., Jackson J.R. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1(4):370–7. DOI: 10.1016/s1471-4892(01)00064-9
- von Hoff D.D. The taxoids: Same roots, different drugs. *Semin Oncol* 1997;24(13):S13-3–10.
- Bollag D.M., McQueney P.A., Zhu J. et al. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res* 1995;55(11):2325–33.
- Gigant B., Wang C., Ravelli R.B.G. et al. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* 2005;435(7041):519–22. DOI: 10.1038/nature03566
- Hastie S.B. Interactions of colchicine with tubulin. *Pharmacol Ther* 1991;51(3):377–401. DOI: 10.1016/0163-7258(91)90067-V
- Mooberry S.L., Tien G., Hernandez A.H. et al. Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents. *Cancer Res* 1999;59(3):653–60.
- Hamel E. Natural products which interact with tubulin in the vinca domain: Maytansine, rhizoxin, phomopsin a, dolastatins 10 and 15 and halichondrin B. *Pharmacol Ther* 1992;55(1):31–51. DOI: 10.1016/0163-7258(92)90028-X
- Jordan M.A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Cancer* 2004;4(4):253–65. DOI: 10.1038/nrc1317
- Stanton R.A., Gernert K.M., Nettles J.H. et al. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med Res Rev* 2011;31(3):443–81. DOI: 10.1002/med.20242
- Ravelli R.B., Gigant G., Curmi B. et al. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* 2004;428(6979):198–202. DOI: 10.1038/nature02393
- Yang J., Wang Y., Wang T. et al. Pironetin reacts covalently with cysteine-316 of α -tubulin to destabilize microtubule. *Nat Commun* 2016;7:12103. DOI: 10.1038/ncomms12103
- Prota A.E., Setter J., Waight A.B. et al. Pironetin binds covalently to α Cys316 and perturbs a major loop and helix of α -tubulin to inhibit microtubule formation. *J Mol Biol* 2016;428(15):2981–8. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.06.023

33. Steinmetz M.O., Prota A.E. Microtubule-targeting agents: strategies to hijack the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 2018;28(10):776–92. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.05.001
34. Fanale D., Bronte G., Passiglia F. et al. Stabilizing *versus* destabilizing the microtubules: A double-edge sword for an effective cancer treatment option? *Anal Cell Pathol (Amst)* 2015;2015:690916. DOI: 10.1155/2015/690916
35. West L.M., Northcote P.T., Battershill C.N., Peloruside A. A potent cytotoxic macrolide isolated from the New Zealand marine sponge *Mycale* sp. *J Org Chem* 2000;65(2):445–9. DOI: 10.1021/jo991296y
36. Prota A.E., Bargsten K., Northcote P.T. et al. Structural basis of microtubule stabilization by laulimalide and peloruside A. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014;53(6):1621–5. DOI: 10.1002/anie.201307749.
37. Chaplin D.J., Hill S.A. The development of combretastatin A4 phosphate as a vascular targeting agent. *Int J Radiat Oncol* 2002;54(5):1491–6. DOI: 10.1016/S0360-3016(02)03924-X
38. Siemann D.W., Shi W. Dual targeting of tumor vasculature: combining Avastin and vascular disrupting agents (CA4P or OXi4503). *Anticancer Res* 2008;28(4 B):2027–31.
39. Lindamulage I.K., Vu H.-Y., Karthikeyan C. et al. Novel quinolone chalcones targeting colchicine-binding pocket kill multidrug-resistant cancer cells by inhibiting tubulin activity and MRP1 function. *Sci Rep* 2017;7(1):10298. DOI: 10.1038/s41598-017-10972-0
40. Gupta S., Banerjee M., Poddar A. et al. Biphasic kinetics of the colchicine–tubulin interaction: role of amino acids surrounding the A ring of bound colchicine molecule. *Biochemistry* 2005;44(30):10181–8. DOI: 10.1021/bi0505991
41. McLoughlin E.C., O’Boyle N.M. Colchicine-binding site inhibitors from chemistry to clinic: a review. *Pharmaceuticals* 2020;13(1):8. DOI: 10.3390/ph13010008
42. Arnst K.E., Banerjee S., Chen H. et al. Current advances of tubulin inhibitors as dual acting small molecules for cancer therapy. *Med Res Rev* 2019;39(4):1398–426. DOI: 10.1002/med.21568
43. Зыкова С.С., Бойчук С.В., Галембикова А.Р. и др. 3-гидрокси-1,5-диарил-4-пивалоил-2,5-дигидро-2-пирролоны нарушают процессы митоза и индуцируют гибель опухолевых клеток *in vitro*. *Цитология* 2014;56:439–42. Zykova S.S., Boychuk S.V., Galimbekova A.R. et al. 3-hydroxy-1,5-diaryl-4-pivaloyl-2,5-dihydro-2-pyrrolone disrupt the processes of mitosis and induce the death of tumor cells *in vitro*. *Citologiya = Cytology* 2014;56:439–42. (In Russ.).
44. Boichuk S., Galembikova A., Zykova S. et al. Ethyl-2-amino-pyrrole-3-carboxylates are novel potent anticancer agents that affect tubulin polymerization, induce G2/M cell-cycle arrest, and effectively inhibit soft tissue cancer cell growth *in vitro*. *Anti-Cancer Drugs* 2016;27(7):620–34. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000372
45. Boichuk S., Galembikova A., Dunaev P. et al. Ethyl-2-amino-pyrrole-3-carboxylates are active against imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors *in vitro* and *in vivo*. *Anti-Cancer Drugs* 2019;30(5):475–84. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000753
46. Boichuk S., Bikinieva F., Mustafin I. et al. 2-Amino-pyrrole-carboxylate attenuates homology-mediated DNA repair and sensitizes cancer cells to doxorubicin. *Biochemistry (Mosc)* 2022;87(5):391–9. DOI: 10.1134/S0006297922050017
47. Boichuk S., Syuzov K., Bikinieva F. et al. Computational-based discovery of the anti-cancer activities of pyrrole-based compounds targeting the colchicine-binding site of tubulin. *Molecules* 2022;27(9):2873. DOI: 10.3390/molecules27092873
48. Boichuk S., Galembikova A., Bikinieva F. et al. 2-APCAs, the novel microtubule targeting agents active against distinct cancer cell lines. *Molecules* 2021;26(3):616. DOI: 10.3390/molecules26030616
49. Галембикова А.Р., Дунаев П.Д., Бикиниева Ф.Ф. и др. Механизмы цитотоксической активности пиррол-карбоксамидов в отношении опухолевых клеточных сублиний с множественной лекарственной устойчивостью. *Успехи молекулярной онкологии* 2023;10(3):59–71. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-59-71
50. Carta D., Bortolozzi R., Sturlese M. et al. Synthesis, structure-activity relationships and biological evaluation of 7-phenyl-pyrroloquinolinone 3-amide derivatives as potent antimetabolic agents. *Eur J Med Chem* 2017;127:643–60. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.10.026
51. Brindisi M., Olivieri C., Alfano G. et al. Structure-activity relationships, biological evaluation and structural studies of novel pyrrolonaphthoxazepines as antitumor agents. *Eur J Med Chem* 2019;162:290–320. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.11.004
52. Zykova S.S., Galembikova A.R., Ramazanov B.R. et al. Synthesis and cytotoxic activity of ethyl 2-amino-1-benzamido-4-oxo-5-(2-oxo-2-arylethylidene)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxylates. *Pharm Chem J* 2016;49(12):817–20. DOI: 10.1007/s11094-016-1378-1
53. Zykova S.S., Igidov N.M., Zakhmatov A.V. et al. Synthesis and biological activity of 2-amino-1-aryl-5-(3,3-dimethyl-2-oxobutylidene)-4-oxo-n-(thiazol-5-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamides. *Pharm Chem J* 2018;52(3):198–204.
54. Zykova S.S., Kizimova I.A., Syutkina A.I. et al. Synthesis and cytostatic activity of (e)-ethyl-2-amino-5-(3,3-dimethyl-4-oxobutylidene)-4-oxo-1-(2-phenylaminobenzamido)-4,5-dihydro-1H-pyrrol-3-carboxylate. *Pharm Chem J* 2020;53:895–8. DOI: 10.1007/s11094-020-02096-z
55. Boichuk S., Galembikova A., Sitenkov A. et al. Establishment and characterization of a triple negative basal-like breast cancer cell line with multi-drug resistance. *Oncol Lett* 2017;14(4):5039–45. DOI: 10.3892/ol.2017.6795
56. Boichuk S., Bikinieva F., Valeeva E. et al. Establishment and characterization of multi-drug resistant p53-negative osteosarcoma SaOS-2 subline. *Diagnostics (Basel)* 2023;13(16):2646. DOI: 10.3390/diagnostics13162646
57. Хуснутдинов Р.Р., Галембикова А.Р., Бойчук С.В. Получение клона клеток гастроинтестинальной стромальной опухоли с признаками множественной лекарственной устойчивости и оценка его свойств. *Современные технологии в медицине* 2016;8(4):36–41. DOI: 10.17691/stm2016.8.4.05
58. Taguchi T., Sonobe H., Toyonaga S. et al. Conventional and molecular cytogenetic characterization of a new human cell line, GIST-T1, established from gastrointestinal stromal tumor. *Lab Invest* 2002;82(5):663–5. DOI: 10.1038/labinvest.3780461
59. Wittmann C., Sivchenko A.S., Bacher F. et al. Inhibition of microtubule dynamics in cancer cells by indole-modified latonduine derivatives and their metal complexes. *Inorg Chem* 2022;61(3):1456–70. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.1c03154
60. 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
61. Marupudi N.I., Han J.E., Li K.W. et al. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. *Expert Opin Drug Saf* 2007;6(5):609–21. DOI: 10.1517/14740338.6.5.609
62. Young J.A., Howell S.B., Green M.R. Pharmacokinetics and toxicity of 5-day continuous infusion of vinblastine. *Cancer*

- Chemother Pharmacol 1984;12(1):43–5.
DOI: 10.1007/BF00255908
63. Mora E., Smith E.M., Donohoe C. et al. Vincristine-induced peripheral neuropathy in pediatric cancer patients. *Am J Cancer Res* 2016;6(11):2416–30.
 64. Abu Samaan T.M., Samec M., Liskova A. et al. Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer. *Biomolecules*. 2019;9(12):789. DOI: 10.3390/biom9120789
 65. Hashemi M., Zandieh M.A., Talebi Y. et al. Paclitaxel and docetaxel resistance in prostate cancer: molecular mechanisms and possible therapeutic strategies. *Biomed Pharmacother* 2023;160:114392. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114392
 66. Zhang Y., Yang S.H., Guo X.L. New insights into Vinca alkaloids resistance mechanism and circumvention in lung cancer. *Biomed Pharmacother* 2017;96:659–66. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.041
 67. Toledo B., González-Titos A., Hernández-Camarero P. et al. A brief review on chemoresistance; targeting cancer stem cells as an alternative approach. *Int J Mol Sci* 2023;24(5):4487. DOI: 10.3390/ijms24054487
 68. Distefano M., Scambia G., Ferlini C. et al. Antitumor activity of paclitaxel (taxol) analogues on MDR-positive human cancer cells. *Anticancer Drug Des* 1998;13(5):489–99.
 69. Liu J., Yang X., Gao S. et al. DDX11-AS1 modulates DNA damage repair to enhance paclitaxel resistance of lung adenocarcinoma cells. *Pharmacogenomics* 2023;24(3):163–72. DOI: 10.2217/pgs-2022-0121
 70. Kavallaris M., Kuo D.Y., Burkhart C.A. et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J Clin Invest* 1997;100(5):1282–93. DOI: 10.1172/JCI119642
 71. Poruchynsky M.S., Giannakakou P., Ward Y. et al. Accompanying protein alterations in malignant cells with a microtubule-polymerizing drug-resistance phenotype and a primary resistance mechanism. *Biochem Pharmacol* 2001;62(11):1469–80. DOI: 10.1016/s0006-2952(01)00804-8
 72. Houghton J.A., Houghton P.J., Hazelton B.J. et al. *In situ* selection of a human rhabdomyosarcoma resistant to vincristine with altered beta-tubulins. *Cancer Res* 1985;45(6):2706–12.
 73. Stengel C., Newman S.P., Leese M.P. et al. Class III β -tubulin expression and *in vitro* resistance to microtubule targeting agents. *Br J Cancer* 2009;102:316–24. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605489
 74. Rodríguez-Antona C. Pharmacogenomics of paclitaxel. *Pharmacogenomics* 2010;11(5):621–3. DOI: 10.2217/pgs.10.32
 75. Ezrahi S., Aserin A., Garti N. Basic principles of drug delivery systems – the case of paclitaxel. *Adv Colloid Interface Sci* 2019;263:95–130. DOI: 10.1016/j.cis.2018.11.004
 76. Tuy H.D., Shiomi H., Mukaisho K.I. et al. ABCG2 expression in colorectal adenocarcinomas may predict resistance to irinotecan. *Oncol Lett* 2016;12(4):2752–60. DOI: 10.3892/ol.2016.4937
 77. Mooberry S.L., Weiderhold K.N., Dakshanamurthy S. et al. Identification and characterization of a new tubulin-binding tetrasubstituted brominated pyrrole. *Mol Pharmacol* 2007;72(1):132–40. DOI: 10.1124/mol.107.034876

Благодарность. Авторы выражают благодарность А.М. Аухадиевой за помощь в проведении вестерн-блоттинга.

Acknowledgment. The authors acknowledge A.M. Aukhadieva for the help in conducting western blotting.

Вклад авторов

А.Р. Галембикова, С.В. Бойчук: разработка концепции и дизайна исследования, проведение исследования, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи, редактирование;

П.Д. Дунаев: проведение иммунофлуоресцентного анализа, анализ и интерпретация данных;

Т.В. Ивойлова: проведение проточной цитометрии, MTS-теста, анализ и интерпретация данных;

А.И. Гилязова, А.Э. Галяутдинова: проведение исследований на лабораторных животных, анализ и интерпретация данных;

Е.Г. Михеева: гистологическое и иммуногистохимическое исследование синотрансплантатов, анализ и интерпретация данных;

С.С. Зыкова, Н.М. Игидов: синтез пирролсодержащих гетероциклических соединений;

П.Б. Копнин: вестерн-блоттинг, научное консультирование.

Authors' contributions

A.R. Galemnikova, S.V. Boichuk: development of the concept and design of the study, research, analysis and interpretation of data, article writing, editing;

P.D. Dunaev: immunofluorescence analysis, data analysis and interpretation;

T.V. Ivoilova: flow cytometry, MTS-test, analysis and interpretation of data;

A.I. Gilyazova, A.E. Galyautdinova: conducting research on laboratory animals, analysis and interpretation of data;

E.G. Mikheeva: histological and immunohistochemical examination of synografts, analysis and interpretation of data;

S.S. Zyкова, N.M. Igidov: synthesis of pyrrole-containing heterocyclic compounds;

P. B. Kopnin: western-blotting, scientific consulting.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.Р. Галембикова / A.R. Galemnikova: <https://orcid.org/0000-0002-0293-2974>

П.Д. Дунаев / P.D. Dunaev: <https://orcid.org/0000-0002-5449-4435>

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

А.И. Гилязова / A.I. Gilyazova: <https://orcid.org/0009-0003-0680-4595>

А.Э. Галяутдинова / A.E. Galyautdinova: <https://orcid.org/0009-0003-0885-5994>

Е.Г. Михеева / E.G. Mikheeva: <https://orcid.org/0000-0001-8213-427X>

С.С. Зыкова / S.S. Zyкова: <https://orcid.org/0000-0002-7395-4951>

Н.М. Игидов / N.M. Igidov: <https://orcid.org/0000-0003-0976-9951>

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

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00001) и проведено 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 (RSF) (grant No. 20-15-00001) and was performed as a part of Russia Strategic Academic Leadership Program (“Priority-2030”) of Kazan (Volga Region) Federal University.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 10 от 21.11.2023).

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The protocol of the study was approved by the committee on biomedical ethics of the Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia (protocol No. 10 dated 21.11.2023).

