ISSN 2313-805X (PRINT)
ISSN 2413-3787 (ONLINE)

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАНЦЕРОГЕНЕЗА ФГБУ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА» МИНЗДРАВА РОССИИ

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ

Нарушения гена нибрин и патогенез злокачественных новообразований

Иммунологическая толерантность при раке молочной железы

Структурные изменения гена EGFR в образцах глиобластомы

Механизмы лекарственной устойчивости к неоадъювантной химиотерапии при раке молочной железы

Diagnostic potential of miRNA-135A1 in HPV-associated cervical lesions

ADVANCES IN MOLECULAR ONCOLOGY

3 ТОМ 11
VOL. 11
2024

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

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

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.*

3 ТОМ 11 ’24

ОСНОВАН В 2014 Г.

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 **Е.С. Самойлова**

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. № 3. 1–132.

© 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)*

Щербаков 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)*

Заридзе 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.*

3 VOL. 11 '24

FOUNDED IN 2014

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 **E.S. Samoylova**
Proofreader **T. N. Pomiluiko**

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 (ПИ No. ФС77-57560 dated 08 April 2014).

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

The editorial board is not responsible for advertising content.The authors, point of view given in the articles may not coincide with the opinion of the editorial board.

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

Uspekhi molekulyarnoy onkologii. 2024. Vol. 11 No. 3. 1–132.

© Design, layout PH "ABV-Press", 2024

Pressa Rossii catalogue index: 93562.

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

EDITOR-IN-CHIEF

Krasil'nikov, Mikhail A., *DSc, PhD, Professor, Director of the Research Institute of Carcinogenesis, Head of Department of Experimental Biology of Tumors (Moscow, Russia)*

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

EXECUTIVE EDITOR

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

EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

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

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

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

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

Karamysheva, Aida F., *DSci, PhD, Chief Scientific Consultant of the Laboratory of the Genetics of Tumor Cells of the Department of Molecular Biology of Tumors of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Kirsanov, Kirill I., *DSc, Head of the Laboratory of Carcinogenic Compounds, Department of Chemical carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Associate Professor of the Department of General Medical Practice of the Peoples' Friendship University of Russia (Moscow, Russia)*

Kovaleva, Olga V., *DSc, Sr. Researcher of the Laboratory of Regulation of Cellular and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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

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

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

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

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

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

О.М. Кривцова, Д.Д. Озерова, Н.Л. Лазаревич
Герминативные и соматические нарушения гена *NBN* и их возможная роль в патогенезе злокачественных новообразований **8**

Е.В. Каюкова, Э.С. Болотов
Иммунологическая толерантность при раке молочной железы: некоторые причины развития **24**

А.Л. Чернышова, А.А. Черняков, Ю.М. Трущук, Н.В. Юнусова, Н.В. Севостьянова, Я.И. Архипова, О.С. Диль, А.Е. Чернышова
Молекулярно-генетический и биохимический профили злокачественных новообразований на фоне беременности **32**

О.В. Морозова, А.Ю. Букина, В.Г. Попова, Г.И. Хайриева, Г.Р. Сагитова, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов, В.П. Максимова
Двуликий Янус: к 150-летию открытия ДДТ **41**

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

D.S. Elkin, M.I. Taubinskaya, N.V. Elkina, R.S. Faskhutdinov, M.D. Fedorova, A.N. Katargin, K.I. Zhordania, E.A. Mustafina, E.A. Grivachev, L.S. Pavlova, S.V. Vinokurova
Diagnostic potential of miRNA-135A1 in human papillomavirus associated cervical lesions **56**

В.О. Варачев, О.Ю. Сусова, А.А. Митрофанов, Г.С. Краснов, Д.Р. Насхлеташвили, Ю.И. Аммур, С.Д. Бежанова, Н.В. Севян, Е.В. Прозоренко, А.Х. Бекяшев, Т.В. Наседкина
Структурные изменения гена *EGFR* в образцах глиобластомы как фактор прогноза и молекулярная мишень для терапии **68**

А.А. Калинина, Д.Б. Казанский, Л.М. Хромых
Противоопухолевые эффекты сочетанного действия рекомбинантного циклофилина А человека и ингибиторов контрольных точек иммунитета в экспериментальной модели меланомы B16 *in vivo* **79**

Е.М. Жидкова, В.П. Максимова, Д.Д. Григорьева, В.З. Ширинян, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая
Молекулярные механизмы действия нового селективного агониста глюкокортикоидного рецептора в клетках рака молочной железы **92**

К.А. Алиев, Е.Ю. Зяблицкая, Т.П. Макалиш, Л.Е. Сорокина, Э.Р. Асанова
Механизмы лекарственной устойчивости к неоадъювантной химиотерапии при раке молочной железы **103**

Л.М. Обухова, Е.В. Балавина, Т.А. Веселова, И.А. Медяник, А.С. Гришин, В.Ф. Лазукин, М.М. Конторщиков
Липидный профиль плазмы крови при глиальных опухолях **114**

А.Н. Егоров, Д.Г. Тихонов, А.С. Гольдерова
Антипролиферативное воздействие дикорастущих ягод и вздутоплодника сибирского Северо-Восточной Сибири на клетки рака молочной железы MCF-7 . . . . . **126**

REVIEWS

O.M. Krivtsova, D.D. Ozerova, N.L. Lazarevich
Germline and somatic alterations in *NBN* and their putative impact on the pathogenesis of malignant neoplasms 8

E.V. Kayukova, E.S. Bolotov
Immunological tolerance in breast cancer: some reasons for development 24

A.L. Chernyshova, A.A. Chernyakov, Yu.M. Truschuk, N.V. Yunusova, N.V. Sevostyanova, Ya.I. Arkhipova, O.S. Dil, A.E. Chernyshova
Molecular genetic and biochemical profiles of malignant neoplasms during pregnancy 32

O.V. Morozova, A.Yu. Bukina, V.G. Popova, G.I. Khairieva, G.R. Sagitova, G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov, V.P. Maksimova
Two-faced Janus: on the 150th anniversary of the discovery of DDT 41

EXPERIMENTAL REPORTS

D.S. Elkin, M.I. Taubinskaya, N.V. Elkina, R.S. Faskhutdinov, M.D. Fedorova, A.N. Katargin, K.I. Zhordania, E.A. Mustafina, E.A. Grivachev, L.S. Pavlova, S.V. Vinokurova
Diagnostic potential of miRNA-135A1 in human papillomavirus associated cervical lesions 56

V.O. Varachev, O.Yu. Susova, A.A. Mitrofanov, G.S. Krasnov, D.R. Naskhletashvili, Yu.I. Ammour, S.D. Bezhanova, N.V. Sevyan, E.V. Prozorenko, A.Kh. Bekyashev, T.V. Nasedkina
Structural alterations of the *EGFR* gene in glioblastoma samples as a prognostic factor and molecular target for therapy 68

A.A. Kalinina, D.B. Kazansky, L.M. Khromykh
Anti-tumor effects of recombinant human cyclophilin A combined with immune checkpoint inhibitors in the experimental model of melanoma B16 *in vivo* 79

E.M. Zhidkova, V.P. Maksimova, D.D. Grigoreva, V.Z. Shirinian, M.G. Yakubovskaya, E.A. Lesovaya
Molecular mechanisms of novel selective glucocorticoid receptor agonist action in breast cancer cells. 92

K.A. Aliev, E.Yu. Zyablitskaya, T.P. Makalish, L.E. Sorokina, E.R. Asanova
Mechanisms of drug resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. 103

L.M. Obukhova, E.V. Balavina, T.A. Veselova, I.A. Medyanik, A.S. Grishin, V.F. Lazukin, M.M. Kontorshchikov
Blood plasma lipid profile in glial tumors 114

A.N. Egorov, D.G. Tikhonov, A.S. Golderova
Antiproliferative effect of wild berries and North-Eastern Siberian bulbous spleen carp on breast cancer cells MCF-7 126

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-8-23

CC BY 4.0

Герминативные и соматические нарушения гена *NBN* и их возможная роль в патогенезе злокачественных новообразований

О.М. Кривцова[1], Д.Д. Озерова[1], Н.Л. Лазаревич[1, 2]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115552 Москва, Каширское шоссе, 24;
[2]ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Контакты: Ольга Михайловна Кривцова *o.krivtsova@ronc.ru*

Нарушение механизмов поддержания стабильности генома является важным условием опухолевой прогрессии. По этой причине предрасположенность к развитию новообразований нередко связана с носительством герминативных мутаций в генах систем детекции и репарации повреждений ДНК. Вместе с тем нарушение систем репарации может служить фактором прогноза эффективности противоопухолевой терапии, а гиперэкспрессия отвечающих за репарацию ДНК генов является частым событием в различных типах новообразований, которое может приводить к приобретению опухолевыми клетками устойчивости к химио- и радиотерапии. Ген *NBN* (нибрин) кодирует субъединицу MRN-комплекса, являющегося сенсором двунитевых разрывов ДНК и участвующего в их репарации путем гомологичной рекомбинации. Ассоциированные с повышенным риском развития опухолей герминативные мутации *NBN*, представленные в первую очередь инделами, приводящими к сдвигу рамки считывания и синтезу укороченных форм белка, а также нонсенс- и некоторыми миссенс-мутациями в функционально значимых доменах, обусловливают частичную утрату нибрином своих функций и увеличение числа спонтанных и индуцированных хромосомных аберраций в клетках носителей. Среди соматических мутаций, затрагивающих *NBN* в опухолевых клетках, преобладают амплификации локуса этого гена, что указывает на двойственную роль белка NBN в опухолевой прогрессии. Результаты немногочисленных исследований влияния уровня экспрессии *NBN* и его мутационного статуса на устойчивость конкретных типов опухолевых клеток к применяемым в терапии злокачественных новообразований препаратам и выживаемость пациентов указывают на необходимость углубленного исследования функциональной значимости различных вариантов, поскольку статус *NBN* может иметь значение при выборе тактики лечения некоторых типов опухолей.

Ключевые слова: нибрин, репарация двунитевых разрывов ДНК, устойчивость к противоопухолевой терапии

Для цитирования: Кривцова О.М., Озерова Д.Д., Лазаревич Н.Л. Герминативные и соматические нарушения гена *NBN* и их возможная роль. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(3):8–23.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-8-23

Germline and somatic alterations in *NBN* and their putative impact on the pathogenesis of malignant neoplasms

O.M. Krivtsova[1], D.D. Ozerova[1], N.L. Lazarevich[1, 2]

[1]N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;
[2]Lomonosov Moscow State University; GSP-1, Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Contacts: Olga Mikhailovna Krivtsova *o.krivtsova@ronc.ru*

Disruption of mechanisms that maintain genome stability is an essential factor of tumor progression. Accordingly, predisposition to the development of neoplasms is often associated with germline mutations in genes involved in DNA damage detection and repair. At the same time, impairment of DNA repair systems may be a predictor of antitumor treatment efficacy while overexpression of genes involved in DNA repair is a frequent event in various types of malignancies that can lead to development of tumor cells' resistance to chemo- and radiotherapy. *NBN* (nibrin) gene encodes the subunit

of the MRN complex which acts as a sensor of double-strand DNA breaks and participates in their repair by homologous recombination. Germline variants in *NBN* which are associated with increased risk of tumor development are generally represented by frameshift mutations that lead to the synthesis of truncated protein as well as by nonsense and some missense mutations which occur in functionally significant domains. These germline mutations result in partial loss of nibrin function and in increased frequency of spontaneous and induced chromosomal aberrations in the cells of the carriers. On the contrary, amplification of *NBN* locus is a predominant type of somatic mutations affecting this gene, which indicates a dual role of NBN protein in tumor progression. The results of several studies demonstrate the influence of *NBN* expression level and its mutational status on anti-tumor drug resistance in particular types of tumor cells and on the survival rate of patients. These data indicate that an in-depth study of different variants and their functional significance is necessary since *NBN* status may be essential for the choice of treatment tactics for some types of tumors.

Keywords: nibrin, double-strand break repair, drug resistance in cancer

For citation: Krivtsova O.M., Ozerova D.D., Lazarevich N.L. Germline and somatic alterations in *NBN* and their putative impact on the pathogenesis of malignant neoplasms. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(3):8–23. (In Russ.).

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-8-23

ВВЕДЕНИЕ

Нарушение механизмов поддержания стабильности генома является одним из ключевых свойств опухолевой клетки, способствующим инициации и прогрессии опухолей, приводящим к возникновению внутри- и межопухолевой генетической гетерогенности и обеспечивающим возможность клональной эволюции опухоли. Приобретение геномной нестабильности вызывают нарушения в работе систем детекции и репарации повреждений ДНК, а также детоксикации мутагенных соединений [1]. Такие нарушения могут возникать в результате соматических и герминативных мутаций в генах, кодирующих участвующие в этих процессах белки.

В среднем в опухолях различных типов выявляют около 5 драйверных генетических нарушений, преимущественно соматического происхождения, включающих точечные мутации, инделы, изменение копийности генов и хромосомные перестройки [2]. Однако при ослаблении контроля над целостностью генома и нарушении механизмов репарации наряду с драйверными мутациями в ДНК опухолевых клеток накапливаются пассажирские мутации, которые не обеспечивают селективных преимуществ и, напротив, могут замедлять прогрессию заболевания, снижая приспособленность опухолевых клеток к неблагоприятным условиям [3].

При множестве ассоциированных с повышенным риском развития новообразований синдромов предрасположенность к возникновению опухолей обусловлена прежде всего герминативными мутациями в генах систем репарации ДНК [4]. Наиболее изученными являются связанные с синдромом наследственного рака молочной железы и яичников патогенные герминативные варианты в генах *BRCA1* и *BRCA2*, продукты которых контролируют репарацию двунитевых разрывов ДНК по механизму гомологичной рекомбинации. В исследованиях широкого спектра различных злокачественных опухолей (pan-cancer) патогенные герминативные мутации *BRCA1* и *BRCA2* выявляют в 2–3 % случаев, однако в целом патогенные и потенциально патогенные варианты в генах системы гомологичной рекомбинации ДНК обнаруживают в 17 % опухолей различных типов, в том числе спорадических [5, 6].

Ген *NBN* (нибрин) впервые охарактеризован при обнаружении биаллельной мутации c.675del5, вызывающей синдром Неймегена (СН), одним из проявлений которого является развитие в раннем возрасте преимущественно онкогематологических заболеваний. В составе комплекса MRE11-RAD50-NBN (MRN) нибрин участвует в репарации двунитевых разрывов ДНК по механизму гомологичной рекомбинации, а также в активации ответа на повреждение ДНК. В гетерозиготном состоянии вариант c.675del5 к развитию синдрома не приводит, но ассоциирован с повышенным риском возникновения рака молочной, предстательной желез и онкогематологических заболеваний в некоторых популяциях [5]. Известны герминативные миссенс-варианты в гене *NBN*, носительство которых также связано с повышенным риском развития опухолей, в том числе солидных [7], однако *NBN* редко является мишенью соматических миссенс-мутаций. В то же время амплификация этого гена представляет собой частое событие во многих типах опухолей [8], что указывает на двойственную роль нибрина в патогенезе злокачественных новообразований (ЗНО).

В настоящем обзоре обобщены данные о герминативных вариантах *NBN*, обусловливающих ослабление контроля процессов репарации двунитевых разрывов ДНК, частоте и паттерне соматических мутаций в этом гене, а также о роли NBN в возникновении устойчивости к применяемым в онкологической практике ингибиторам белков, участвующих в репарации ДНК путем гомологичной рекомбинации.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ БЕЛКА НИБРИН

Ген *NBN* расположен в локусе 8q21, имеет длину 50 000 п.н. и кодирует 2 транскрипта. Канонический транскрипт, включающий 16 экзонов, является преобладающей изоформой в большинстве тканей и кодирует белок нибрин (NBN, NBS1, p95). Неканоническая изоформа, на долю которой приходится менее 10 % транскриптов гена *NBN*, содержит дополнительную 50-нуклеотидную вставку из интрона 2, внутри которой находится стоп-кодон. Показано, что трансляция укороченных вариантов белка нибрин с альтернативных сайтов инициации в этом транскрипте не происходит [8, 9].

Нибрин входит в состав гетерогексамерного комплекса MRN, участвующего в репарации двуцепочечных разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации. Нибрин отвечает за стабилизацию комплекса MRN, его транслокацию в ядро, привлечение комплекса к местам двуцепочечных разрывов ДНК, рекрутирование чекпоинт-киназ ATM, ATR и других белков, необходимых для репарации разрывов [8, 10].

Белок NBN состоит из 754 аминокислот. N-концевая часть нибрина содержит FHA-домен (20–108 аминокислот (а.)), за которым следуют 2 C-концевых BRCA1-домена (BRCT1 (111–197 а.) и BRCT2 (219–327 а.)), разделенные BRCT-линкером, и сигнал ядерной локализации. Ближе к C-концу NBN располагаются 2 домена связывания нуклеазы MRE11 (640–662 и 681–692 а.) и мотив взаимодействия с ATM (734–754 а.) [8]. Доменная структура белка представлена на рис. 1.

Через домен FHA нибрин связывается с белком RBBP8 (CtIP), необходимым для инициации 5'–3'-деградации концов ДНК в местах двунитевых разрывов. Кроме того, наличие интактного FHA-домена необходимо для зависимой от ATR, но не от ATM, активации чекпоинта клеточного цикла в фазе G2/M. Посредством FHA и тандема BRCT-доменов NBN связывается с фосфорилированным участком SDT-повторов белка MDC1, который напрямую взаимодействует с фосфорилированным гистоном H2A.X (γH2A.X), тем самым привлекая MRN-комплекс в места двунитевых разрывов ДНК. Показано, что в клетках, мутантных по FHA- (p.Arg28Ala) или BRCT-домену (p.Lys160Met), NBN не способен связываться с фосфорилированными SDT-повторами MDC1. Таким образом, наличие всех трех доменов NBN необходимо для локализации MRN в местах двуцепочечных разрывов ДНК [8, 11, 12]. Утрата N-концевых доменов нибрина не летальна, но приводит к нарушению 5'–3'-деградации концов в ДНК в местах двунитевых разрывов, необходимой для их репарации, а также к нарушению активации чекпоинтов клеточного цикла [13].

Белки MRN-комплекса принимают участие в контроле поддержания длины теломер. Так, экзонуклеазная активность MRE11 необходима для формирования Т-петли на концах теломер после репликации ДНК. В то же время белки MRN-комплекса способны инициировать ATM- и ATR-зависимую репарацию укороченных теломер, утративших способность связывать белки комплекса шелтерина TRF2 и POT1, по механизму негомологичного соединения концов, которое повышает вероятность слияния хромосом. В отличие от MRE11 и RAD50, которые связаны с теломерами в течение всего клеточного цикла, NBN, способный взаимодействовать с субъединицей шелтерина TRF2 через свой мотив, состоящий из аминокислотных остатков 419–449, локализуется в теломерных областях в зависимости от статуса фосфорилирования по серину 512. Нибрин, дефосфорилированный фосфатазой PP1 в фазе G1, взаимодействует с TRF2, в то время как фосфорилирование Ser512 киназой CDK2 в фазе S/G2 приводит к диссоциации NBN и делает возможным связывание TRF2 с комплексом Apollo/SNM1B, необходимым для защиты лидирующей цепи синтезируемой теломерной ДНК от репарации путем негомологичного соединения концов. При репарации укороченных теломер фосфорилирование TRF2-связывающего домена

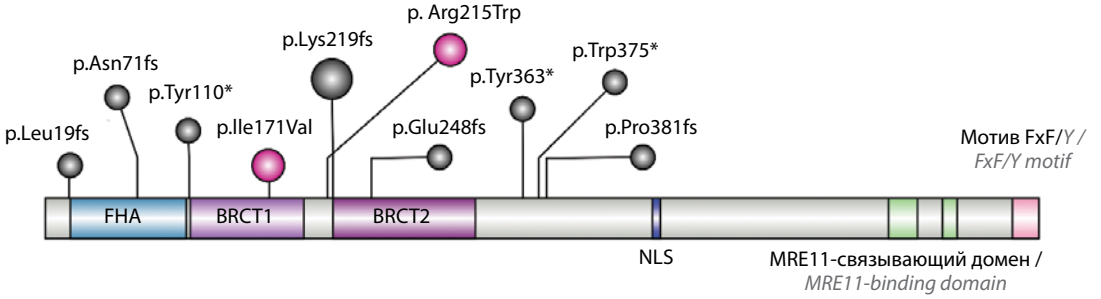


Рис. 1. *Доменная структура белка NBN и герминативные варианты, приводящие к аминокислотным заменам и синтезу укороченного белка, функциональная значимость которых подтверждена исследованиями in vitro. Серыми маркерами обозначено расположение инделов и нонсенс-мутаций, розовыми – миссенс-вариантов. NLS – сигнал ядерной локализации, мотив FxF/Y – мотив взаимодействия с киназой ATM*

Fig. 1. *Domain organization of NBN protein and its missense and protein-truncating germline variants, for which their functional significance has been demonstrated in vitro. Gray markers indicate the location of indels and nonsense mutations, pink markers – of missense variants. NLS – nuclear localization signal, FxF/Y motif – ATM kinase interaction motif*

NBN по Ser512 определяет выбор между каноническим и альтернативным путями негомологичного соединения концов ДНК [14].

Сигнал ядерной локализации NBN состоит из 7 аминокислотных остатков (461–467 а.). При возникновении двунитевых разрывов в ДНК киназа ATM фосфорилирует NBN, который взаимодействует с импортином KPNA2, обеспечивая транслокацию комплекса MRN в клеточное ядро [15].

Участок связывания NBN с партнером по MRN-комплексу нуклеазой MRE11 состоит из двух консервативных доменов. MRE11 обладает 3'-5'-экзонуклеазной и 5'-3'-эндонуклеазной активностями, необходимыми для образования выступающих 3'-концов ДНК в сайтах двунитевых разрывов и их последующей репарации путем гомологичной рекомбинации. Мутации, приводящие к утрате этих доменов белка NBN или к невозможности связывания MRE11, летальны. Частичное нарушение связывания NBN с MRE11 снижает эффективность репарации, что выражается в увеличении количества хромосомных аберраций в клетках, экспрессирующих мутантные по этому участку варианты *NBN*, а также в снижении активации чекпоинт-киназы ATM, мотив связывания с которой расположен на С-конце вблизи MRE11-связывающих доменов, и, как следствие, в нарушении G2/M-чекпоинта [10, 13].

АССОЦИАЦИЯ СИНДРОМА НЕЙМЕГЕНА С ВЫСОКИМ РИСКОМ РАЗВИТИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Важность сохранения функции белка NBN для поддержания генетической стабильности в клетках подтверждается существованием наследственных заболеваний, характерных для носителей функционально значимых герминативных мутаций в кодирующем его гене. Синдром Неймегена, который вызывают гипоморфные мутации в гене *NBN*, является аутосомно-рецессивным заболеванием, характеризующимся микроцефалией и комбинированным иммунодефицитом. Пациенты с СН также имеют высокий риск развития новообразований; к 20 годам у 48 % из них развиваются опухоли, преимущественно лимфоидного происхождения [16].

В 90 % случаев данная патология связана с редкой герминативной биаллельной делецией c.657_del5 (c.657_661del) в гене *NBN*, которая наиболее распространена среди западных и восточных славян. В Чехии и Польше заболеваемость СН, обусловленная носительством этой мутации в гомозиготном состоянии, составляет 3,1 случая на 100 тыс. населения, в Беларуси – 2,3 случая, в России – 0,7 случая [17]. Клиническое проявление СН описано у гомозигот по другим уникальным патогенным вариантам, приводящим к сдвигу рамки считывания, а также у носителей однонуклеотидных замен, вызывающих появление стоп-кодона. В редких случаях пациенты с признаками СН являются сложными гетерозиготами по гену *NBN*, один из аллелей которого имеет делецию c.657del5 [16].

Делеция c.657del5 приводит к сдвигу рамки считывания в 6-м экзоне и синтезу двух укороченных белков: p26, который содержит N-концевые домены FHA и BRCT1, и p70, образующегося в результате трансляции с альтернативного сайта инициации, который сохраняет домены BRCT2, сигнал ядерной локализации, MRE11- и ATM-связывающие сайты. Оба фрагмента частично сохраняют способность к связыванию с белками-партнерами полноразмерного нибрина. Так, белок p70 может связываться с MRE11 и образовывать MRN-комплекс, активирующий ATM [13, 18, 19].

В связи с сохранением остаточной функции у укороченного белка p70 высокие уровни его синтеза коррелируют с низким риском развития лимфом у пациентов с СН [20]. У гетерозиготных носителей аллеля c.657del5 наблюдаются высокий риск развития солидных опухолей (отношение шансов (ОШ) 2,22; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,3–3,6), а также предрасположенность к раку молочной, предстательной желез, меланоме, медуллобластоме и лимфомам [7, 16, 21]. Несмотря на то что мутантный нибрин может активировать чекпоинт-киназу ATM, эта способность снижена, что подтверждается низким уровнем фосфорилирования ее мишени KAP1 в иммортализованных фибробластах, полученных от пациентов с СН. Частота спонтанных и индуцированных хромосомных аберраций высока в В-лимфоцитах, гетерозиготных по c.657del5, и максимальна в В-лимфоцитах и фибробластах, полученных от гомозигот по рассматриваемой делеции. Динамика изменения количества фокусов γH2A.X после индукции повреждений в В-лимфоцитах с NBN c.657del5 по сравнению с контрольными культурами более медленная, что указывает на снижение скорости репарации двунитевых разрывов ДНК. Кроме того, В-лимфоциты, экспрессирующие *NBN* c.657del5, продолжают синтезировать ДНК после индукции в ней повреждений. В результате жизнеспособность подвергнутых облучению В-лимфоцитов и фибробластов, гомозиготных по c.657del5, значительно снижена по сравнению с клетками, экспрессирующими *NBN* дикого типа (*NBNwt*). Фибробласты, полученные от пациентов с СН, чувствительны и к другим ДНК-повреждающим агентам, например к митомицину С и ингибитору поли(АДФ-рибоза)полимеразы-1 (PARP1) AZD2281 [21–24].

ГЕРМИНАТИВНЫЕ МИССЕНС-МУТАЦИИ В ГЕНЕ *NBN*

Согласно данным базы герминативных вариантов dbSNP [25], для гена *NBN* известно 260 сайтов однонуклеотидных полиморфизмов, встречающихся в популяции с частотой аллеля не менее 1 %. Из них лишь 6 полиморфизмов приходятся на экзоны гена и только 1 является миссенс-вариантом (p.Glu185Gln), который, однако, не имеет доказанной клинической и функциональной значимости [7, 21, 25].

Большинство герминативных вариантов в гене *NBN* являются редкими и чаще всего, если их носительство не сопряжено с синтезом укороченных

изоформ белка NBN, аннотированы в базах данных как доброкачественные (benign), вероятно доброкачественные (likely benign) или варианты с неопределенной значимостью (uncertain significance), даже в том случае, если они затрагивают функциональные домены NBN [25, 26]. Примером редкого доброкачественного герминативного миссенс-варианта является аллель rs61754520, встречающийся в общемировой популяции с частотой около 0,2 % случаев и приводящий к аминокислотной замене p.Asp95Asn в FHA-домене NBN. Носительство rs61754520 не вызывает предрасположенности к развитию опухолей в целом [26] и не повышает риск возникновения рака молочной, предстательной желез, гортани или лимфом [7]. В клетках линии иммортализованных фибробластов ILB1 от пациента с СН, экспрессирующих аллель rs61754520, нибрин способен транслоцироваться в ядро, где при индуцированных облучением повреждениях ДНК фосфорилируется по Ser439 так же, как и нибрин дикого типа, и образует фокусы в местах повреждений, колокализующиеся с фокусами MRE11 [27].

В то же время описаны несколько редких миссенс-вариантов в BRCT-доменах NBN, носительство которых, вероятно, повышает риск развития новообразований.

Вариант rs61754966, приводящий к аминокислотной замене p.Ile171Val, встречается в глобальной популяции с частотой 0,15 % случаев и, согласно базе данных фенотипических проявлений генетических полиморфизмов ClinVar, характеризуется неоднозначной функциональной значимостью [25, 26]. По данным метаанализа, проведенного P. Gao и соавт., в 7 из 10 исследований популяций славян наличие rs61754966 ассоциировано с высоким риском развития опухолей (ОШ 3,93; 95 % ДИ 1,68–9,20), в том числе острого лимфобластного лейкоза, но не рака молочной железы [7]. В то же время в когорте, включавшей 42 846 американских пациентов с 20 различными типами опухолей, повышение риска новообразований среди носителей rs61754966 выявлено не было [21]. Иммортализованные В-лимфоциты, полученные от гетерозиготных носителей rs61754966, не отличаются от контрольных клеток, экспрессирующих *NBNwt*, по количеству спонтанных или индуцированных ионизирующим излучением хромосомных аберраций, а также при дозе облучения >0,75 Гр, по количеству образующихся фокусов γH2A.X и динамике снижения их количества. Высокая жизнеспособность таких клеток и снижение уровня ДНК-синтетической активности после повреждения ДНК облучением сопоставимы с наблюдаемыми в контроле [22, 23]. В связи с нарушением связывания NBN p.Ile171Val с белком MDC1, необходимым для привлечения MRN-комплекса к γH2A.X в места двунитевых разрывов, в подвергнутых ионизирующему излучению фибробластах, полученных от пациентов с СН, при экспрессии аллеля rs61754966 нарушается образование фокусов NBN, MRE11 и других белков, отвечающих за репарацию ДНК, по сравнению с клетками, трансфицированными векторами, кодирующими *NBNwt*. Кроме того, по сравнению с контрольной культурой в фибробластах с *NBN* p.Ile171Val в 3 раза снижается частота репарации путем гомологичной рекомбинации, сокращается выживаемость клеток после облучения и обработки алкилирующим ДНК агентом митомицином С, возрастает чувствительность к ингибитору PARP1 AZD2281, процесс репликации ДНК становится радиоустойчивым. При экзогенной экспрессии *NBN* p.Ile171Val в клетках культуры рака шейки матки HeLa формирования фокусов NBN и MRE11 в результате повреждения ДНК также не происходит, а число хромосомных аберраций по сравнению с контрольной культурой возрастает, что, как предполагают Y. Yamamoto и соавт., указывает на доминантно-негативное влияние NBN p.Ile171Val на функционирование NBN дикого типа [24]. В геномно отредактированных клетках культуры колоректального рака HCT116, гомозиготных по rs61754966, частота индуцированных ионизирующим излучением хромосомных аберраций выше, чем в контрольных клетках, но ниже, чем в клетках, нокаутных по *NBN*. Выживаемость гомозигот по *NBN* p.Ile171Val после внесения повреждений в ДНК также принимает промежуточные значения между контролем и нокаутом по *NBN*. По результатам кариотипирования и микроядерных тестов с блоком цитокинеза на эмбриональных фибробластах мыши, гетеро- и гомозиготных по rs61754966, частота хромосомных аберраций может также варьировать в зависимости от числа копий *NBN* p.Ile171Val [28]. Таким образом, аллель, кодирующий NBN p.Ile171Val, в связи с неспособностью привлечь MRN-комплекс к сайтам двунитевых разрывов является гипоморфным, однако нарушение репарации ДНК и контроля над продвижением по клеточному циклу является менее выраженным, чем в клетках, гомо- или гетерозиготных по NBN c.657del5.

Еще одним хорошо изученным однонуклеотидным герминативным вариантом *NBN*, который обнаруживают в 0,21 % случаев, является rs42767444, приводящий к аминокислотной замене p.Arg215Trp. Сообщения о патогенности варианта, по данным ClinVar и литературы, различаются. Так, по результатам метаанализа 9 исследований, включавших 6728 пациентов с опухолями и 9588 здоровых индивидов, риск развития новообразований у носителей rs42767444 оказался высоким (ОШ 1,77; 95 % ДИ 1,07–2,91). В то же время в исследовании на крупной выборке больных с различными типами опухолей с использованием панели MSK-impact наличие ассоциации между рассматриваемым генотипом и предрасположенностью к ЗНО не подтвердилось [7, 21, 25, 26]. По его результатам различий в частоте хромосомных аберраций и жизнеспособности подвергшихся облучению иммортализованных В-лимфоцитов, экспрессирующих *NBN* p.Arg215Trp, а также способности таких клеток

Таблица 1. *Клинические и функциональные характеристики наиболее исследованных герминативных инделов и однонуклеотидных вариантов в гене NBN*

Table 1. *Clinical and functional characteristics of the most studied germline indels and single nucleotide variants in NBN*

Мутация, нуклеотид в кДНК (NM_002485.5) Mutation, cDNA nucleotide (NM_002485.5)	**Мутация, белок (NP_002476.2)** Mutation, protein (NP_002476.2)	**Идентификатор dbSNP** dbSNP ID	**Тип мутации** Mutation type	**Результат** Consequence	**Аллельная частота (GnomAD genomes)** Allele frequency (GnomAD genomes)	**Классификация по ClinVar (ассоциированные состояния)** ClinVar classification (associated conditions)	**Ассоциированные состояния (по данным литературы)** Associated conditions (according to the literature)	**Функциональный эффект *in vitro*** *In vitro* functional evidence	**Источник** Source
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Варианты, приводящие к синтезу укороченного белка Protein truncating variants									
c.55_56del	p.Leu19fs	rs876659305	Fs	PTV	Н/д N/a	П (СНПР) P (HCPS)	Обнаружен у пациента с первичными множественными опухолями (предстательной железы, легкого, крови) Found in a patient with multiple primary cancers (prostate, lung, and blood)	Экспрессия этих аллелей в фибробластах ILB1 приводит к синтезу белка ~45 кДа, способного к импорту в ядро, связыванию MRE11, активации ATM, а также к снижению жизнеспособности клеток после ИИ Expression of these alleles in ILB1 fibrobalsts leads to synthesis of ~45 kDa protein, which is able to enter the nucleus, bind MRE11, activate ATM and confers reduced viability after IR	[21]
c.211_212insGA	p.Asn71fs	rs762664474	Fs	PTV	0,000014	П (СН) P (NBS)	Острый лимфобластный лейкоз, рак мочевого пузыря, молочной железы Acute lymphoblastic leukemia, bladder cancer, breast cancer		
c.330T>G	p.Tyr110Ter	rs1057519585	SNV	PTV	Н/д N/a	П (СН) P (NBS)	Нет клинических проявлений (СН, предрасположенность к опухолям) No clinical presentation (NBS, cancer predisposition)	Лимфобластоидные клетки со сложной гетерозиготностью по аллелям p.Tyr110Ter и p.Trp375Ter синтезируют ~74 кДа нибрин и демонстрируют ХН, радиоустойчивый синтез ДНК, гиперчувствительность к ИИ Lymphoblastoid cells compound heterozygous for p.Tyr110Ter and p.Trp375Ter produce ~74 kDa protein, demonstrate CI, radioresistant DNA synthesis and hypersensitivity to IR	[16, 29]

Продолжение табл. 1
Continuation of table 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
c.657_661del	p.Lys219fs	rs587776650	Fs	PTV	0,000207	П (СН, СНПР, различные опухоли) P (NBS, HCPS, different cancers)	Лимфома, рак молочной, предстательной железы, меланома, медуллобластома Lymphoma, breast cancer, prostate cancer, melanoma, medulloblastoma	В-лимфоциты, экспрессирующие этот аллель, демонстрируют замедленную репарацию ДНК, ХН, радиоустойчивый синтез ДНК, сниженную выживаемость после ИИ. Фибробласты ILB1, экспрессирующие этот аллель, имеют сниженную выживаемость после ИИ, но способны активировать ATM B-lymphocytes expressing this allele demonstrate slower DNA repair, CI, radioresistant DNA synthesis, reduced viability after IR. ILB1 fibroblasts which express this variant have reduced viability after IR but can activate ATM	[7, 16, 21–24]
c.698_701del	p.Lys233fs	rs587780100	Fs	PTV	0,000021	П (СН, СНПР, различные опухоли) P (NBS, HCPS, different cancers)	СН (обнаружен у пациентов с новообразованиями молочной железы, легкого, предстательной железы, яичника, кожи) NBS (found in patients with breast, lung, prostate, ovarian cancers, skin malignancies)	Н/д N/a	[30–34]
c.741_742dup	p.Glu248fs	rs864309670	Fs	PTV	Н/д N/a	П (СН), ВП (СНПР) P (NBS), LP (HCPS)	Мягкий фенотип СН Milder NBS phenotype	Лимфобластоидные клетки гомозиготного носителя демонстрируют ХН Lymphoblastoid cells of a homozygous carrier demonstrate CI	[16]
c.842dup	p.Leu281fs	rs864309669	Fs	PTV	Н/д N/a	П (СН, СНПР, различные опухоли) P (NBS, HCPS, different cancers)	СН (NBS)	Н/д N/a	[30]
c.976C>T	p.Gln326Ter	rs121908973	SNV	PTV	Н/д N/a	П (СН, СНПР, различные опухоли) P (NBS, HCPS, different cancers)	СН (NBS)	Н/д N/a	[30]

Продолжение табл. 1
Continuation of table 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
c.1089C>A	p.Tyr363Ter	rs121908974	SNV	PTV	0,000043	П (СН, апластическая анемия) P (NBS, aplastic anemia)	СН, анемия Фанкони NBS, Fanconi anemia	Гомозиготные по этому аллелю лимфобласты не синтезируют нибрин и демонстрируют чувствительность к митомицину С Lymphoblasts homozygous for this allele do not produce nibrin. These cells are hypersensitive to mitomycin C	[16, 35]
c.1124G>A	p.Trp375Ter	rs1394437421	SNV	PTV	0,000007	П (СН, СНПР) P (NBS, HCPS)	Нет клинических проявлений (СН, предрасположенность к опухолям) No clinical presentation (NBS, cancer predisposition)	См. описание rs1057519585 See rs1057519585	[16, 29]
c.1142del	p.Pro381fs	rs587781969	Fs	PTV	0,000021	П/ВП (СН), П (СНПР) P/LP (NBS), P (HCPS)	СН (обнаружен у пациентов с новообразованиями яичника и молочной железы) NBS (found in a patients with ovarian and breast cancers)	В клетках со сложной гетерозиготностью по этому аллелю и c.657_661del белок нибрин не определяется Nibrin is undetectable in cells which are compound heterozygous for this allele and c.657_661del	[30, 32, 36]
Миссенс-варианты **Missense variants**									
c.283G>A	p.Asp95Asn	rs61753720	SNV	Миссенс Missense	0,001883	Противореч. (СН), Д/ВД (СНПР) Conflict (NBS), B/LB (HCPS)	Не ассоциирован с предрасположенностью к развитию опухолей Not associated with cancer predisposition	В экспрессирующих этот аллель фибробластах ILB1 фокусы нибрина колокализуются с фокусами MRE11 в местах двунитевых разрывов ДНК Nibrin foci co-localize with MRE11 foci at the sites of DSBs in ILB1 fibroblasts which express this allele	[7, 27]

Окончание табл. 1
End of table 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
c.511A>G	p.Ile171Val	rs61754966	SNV	Мис-сенс Mis-sense	0,001455	П (апластическая анемия), ФР (острый лимфобластный лейкоз), противореч. (СН, СНПР), неясн. (острый лимфобластный лейкоз, рак молочной железы, синдром наследственного рака яичника и молочной железы, рак толстой кишки) P (aplastic anemia), RF (acute lymphoblastic leukemia), conflict (NBS, HCPS), uncertain (acute lymphoblastic leukemia, breast carcinoma, hereditary breast and ovarian cancer syndrome, carcinoma of colon)	Неоднозначные сообщения о влиянии на предрасположенность к развитию опухолей Conflicting reports on increased cancer risk	В СН-фибробластах, экспрессирующих этот аллель, нарушено рекрутирование MRN-комплекса к сайтам двунитевых разрывов. Мышиные эмбриональные фибробласты, клетки HeLa и HCT116, экспрессирующие NBN p.I171V, характеризуются повышенной ХН. Гетерозиготные по нему В-лимфоциты не отличаются от клеток дикого типа Recruitment of MRN-complex to the sites of DBSs is abrogated in NBS fibroblasts expressing this allele. Mouse embryonic fibroblasts, HeLa and HCT116 cells harbouring NBN p.I171V demonstrate higher CI. B-lymphocytes heterozygous for this allele demonstrate the wild-type phenotype	[7, 21–24, 27, 28]
c.553G>C	p.Glu185Gln	rs1805794	SNV	Мис-сенс Mis-sense	0,303285	Д (СН, СНПР, различные опухоли) B (NBS, HCPS, different cancers)	Не ассоциирован с предрасположенностью к развитию опухолей Not associated with cancer predisposition	Жизнеспособность гетерозиготных по этому аллелю фибробластов ILB1 после ИИ сопоставима с таковой у клеток дикого типа The viability of ILB1 fibrobalsts which express this allele after IR is comparable to wild-type cells	[21]
c.643C>T	p.Arg215Trp	rs34767364	SNV	Мис-сенс Mis-sense	0,002063	Противореч. (СН, СНПР) Conflict (NBS, HCPS)	Неоднозначные сообщения о влиянии на предрасположенность к развитию опухолей Conflicting reports on increased cancer risk	Гетерозиготные по этому аллелю В-лимфоциты не отличаются от клеток дикого типа B-lymphocytes heterozygous for this allele demonstrate the wild-type phenotype	[7, 21–23]

Примечание. *Координаты в комплементарной ДНК (кДНК) указаны для транскрипционного варианта 1 NBN (NM_002485.5), координаты белка – по последовательности NP_002476.2. Частоты минорных аллелей, основанные на данных gnomAD Genomes для общемировой популяции, получены из базы данных dbSNP (версия 156). Fs – сдвиг рамки считывания; PTV – укороченный вариант белка; SNV – однонуклеотидный вариант; н/д – нет данных; СН – синдром Неймегена; СНПР – синдром наследственной предрасположенности к раку; ИИ – ионизирующее излучение; ХН – хромосомная нестабильность. Аллели: П – патогенный; ВП – вероятно патогенный; Д – доброкачественный; ВД – вероятно доброкачественный; ФР – фактор риска; неясн. – неясное значение; противореч. – противоречия в классификациях патогенности.*

Note. *cDNA coordinates are given for NBN, transcript variant 1 (NM_002485.5), protein coordinates are based on NP_002476.2. Minor allele frequencies based on gnomAD Genomes global population data were obtained through dbSNP database (build 156). Fs – frameshift, PTV – protein truncating variant; SNV – single nucleotide variant; n/a – not available; NBS – nijmegen breakage syndrome; HCPS – hereditary cancer predisposing syndrome IR – ionizing radiation; CI – chromosome instability; DSBs – double-strand DNA breaks. Alleles: P – pathogenic; LP – likely pathogenic; B – benign; LB – likely benign; RF – risk factor; uncertain – uncertain significance; conflict – conflicting classifications of pathogenicity.*

синтезировать ДНК при внесении в нее повреждений, как и в случае с *NBN* p.Ile171Val, по сравнению с контролем не наблюдалось [22, 23].

Информация об упомянутых в настоящем обзоре, а также некоторых других ассоциированных с СН и предрасположенностью к ЗНО герминативных вариантах *NBN*, в отношении которых существуют данные исследований *in vitro*, приведена в табл. 1. Расположение мутаций относительно функциональных доменов белка представлено на рис. 1.

СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ *NBN*

Несмотря на то что при СН, в основе которого лежит нарушение функции нибрина, возрастает риск развития лимфом [16], ген *NBN* редко является мишенью соматических мутаций при гематологических заболеваниях [37].

По данным исследования MSK-impact, в первичных солидных опухолях 62 различных типа соматических мутаций в гене *NBN* обнаружены в 3 % из 10 945 случаев. Точечные мутации *NBN* и инделы выявлены лишь в 0,9 % опухолей, в то время как самым частым соматическим нарушением оказалась амплификация локуса этого гена. Чаще всего амплификация *NBN* регистрировалась при раке молочной железы, меланоме и раке предстательной железы (5,09; 4,46 и 3,77 % случаев соответственно), тогда как среди пациентов с раком поджелудочной железы и колоректальным раком она была выявлена в 0,6–0,7 % опухолей, а в некоторых когортах больных отсутствовала [37, 38].

По данным консорциума Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes, в рамках которого исследованы полные геномы 46 типов опухолей и прилежащих нормальных тканей, полученные для 2658 случаев, точечные мутации и инделы в гене *NBN* встречались в 0,7 % случаев, однако частота всех типов соматических нарушений, включая амплификацию, достигала 14 % [2, 37]. В то же время среди 10 245 случаев 41 различных типов опухолей, исследованных в рамках проекта «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA), доля опухолей, в которых выявлена амплификация локуса нибрина, составила около 49 % [39]. Увеличение числа копий гена *NBN* описано и при высокодифференцированном серозном (около 50 % случаев) и светлоклеточном (82 % случаев) раке яичника, а также в 11–14 % случаев рака предстательной железы [40, 41].

Анализ баз данных и литературы указывает на то, что делеции *NBN per se* не являются частым событием при канцерогенезе [21, 37, 42]. В то же время в опухолях носителей герминативных вариантов, приводящих к продукции укороченного белка NBN, а также вариантов, аннотированных как патогенные или потенциально патогенные, утрата *NBNwt* происходит чаще, чем в опухолях у носителей нейтральных герминативных вариантов. Тенденция к утрате гетерозиготности носит тканеспецифический характер и в большей степени характерна для рака легкого и поджелудочной железы, нежели для рака молочной железы или колоректального рака [21].

Таким образом, несмотря на неоднозначность результатов приведенных исследований относительно общей частоты соматических нарушений, способных влиять на экспрессию и функцию *NBN*, вероятно, обусловленную использованием различных методов и платформ для проведения экспериментов или подходов к анализу данных в различных когортах пациентов, амплификация является преобладающим соматическим нарушением, затрагивающим этот ген при ЗНО.

ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ГЕНЕ *NBN* НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

В зависимости от типа опухоли способность ее клеток к репарации путем гомологичной рекомбинации может быть ассоциирована с изменениями показателей общей (ОВ) или безрецидивной выживаемости. Например, дефицит гомологичной рекомбинации, который может быть вызван герминативными и соматическими мутациями или эпигенетической инактивацией генов, кодирующих белки, участвующие в этом пути репарации, связан с более благоприятным прогнозом для пациентов с раком яичника, трижды негативным раком молочной железы и глиобластомой, тогда как при раке надпочечника, хромофобной почечно-клеточной карциноме и тимоме прогноз является неблагоприятным [42]. Напротив, амплификация и гиперэкспрессия генов, определяющих ответ на повреждения ДНК, ассоциированы со снижением показателей выживаемости при многих онкологических заболеваниях [39].

Так, амплификация *NBN* коррелирует со снижением показателей ОВ пациентов с раком яичника, а также является значимым фактором для предсказания 5-летней биохимической безрецидивной выживаемости больных раком предстательной железы, прошедших лучевую терапию с визуальным контролем по изображению [39, 41]. Проведенный нами анализ ОВ пациентов из когорт TCGA по методу Каплана–Майера с использованием платформы Xenabrowser [43, 44] подтверждает наличие ассоциации между снижением показателей ОВ и увеличением числа копий гена *NBN* по результатам pan-cancer-исследования, а также для когорт пациентов с раком яичника, эндометрия, светлоклеточной карциномой почки, аденокарциномой поджелудочной железы и острым миелоидным лейкозом. Кроме того, тенденция к снижению показателей ОВ при амплификации *NBN* наблюдается среди больных раком молочной железы без разделения на подтипы и мезотелиомой. Наличие однонуклеотидных соматических мутаций и инделов ассоциировано с улучшением показателей ОВ пациентов с раком эндометрия, а также пациентов из когорты pan-cancer (табл. 2).

Таблица 2. *Общая выживаемость пациентов с различными типами опухолей по данным проекта «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas) в зависимости от копийности и мутационного статуса гена NBN*

Table 2. *Overall survival time in patients from The Cancer Genome Atlas cohorts depends on copy number variation of NBN gene and its mutational status*

Идентификатор проекта «Атлас ракового генома» The Cancer Genome Atlas ID	Тип опухоли Tumor type	Копийность NBN и ОВ NBN copy number and OS			Соматические мутации NBN (SNV, инделы) и ОВ Somatic NBN mutations (SNV, indels) and OS)		
		Число случаев, *n* Number of cases, *n*	Высокая копийность и снижение показателей ОВ High copy number and decrease in OS	*p*	Число случаев (мутантный NBN/NBN дикого типа), *n* Number of cases (mutant NBN/wild type NBN), *n*	Наличие мутаций и снижение показателей ОВ Presence of somatic mutations and decrease in OS	*p*
1	2	3	4	5	6	7	8
PAN-CAN	**Все типы опухолей** **All tumor types**	**10966**	**Да** **Yes**	**1,46E-10**	**9921 (162/9759)**	**Да** **Yes**	**3,26E-02**
BLCA	Уротелиальная карцинома мочевого пузыря Bladder urothelial carcinoma	410	Н/р N/d	6,20E-01	407 (12/395)	Н/р N/d	3,54E-01
BRCA	**Рак молочной железы** **Breast invasive carcinoma**	**1089**	**Тренд** **Trend**	**5,58E-02**	**967 (8/959)**	**Н/р** **N/d**	**8,58E-01**
CESC	Плоскоклеточный рак шейки матки и эндоцервикальная аденокарцинома Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma	284	Н/р N/d	3,19E-01	276 (4/272)	Н/р N/d	7,88E-01
COAD	Аденокарцинома толстой кишки Colon adenocarcinoma	442	Н/р N/d	3,12E-01	378 (12/366)	Н/р N/d	6,26E-01
DBCL	Крупноклеточная В-клеточная лимфома Lymphoid neoplasm diffuse large B-cell lymphoma	47	Н/р N/d	5,23E-01	Н/д N/a	Н/р N/d	Н/д N/a
ESCA	Рак пищевода Esophageal carcinoma	184	Н/р N/d	4,25E-01	183 (4/179)	Н/р N/d	3,31E-01
GBM	Глиобластома Glioblastoma multiforme	606	Обратная зависимость Inverse dependence	4,30E-02	389 (2/387)	Н/р N/d	5,75E-01
HNSC	Плоскоклеточный рак головы и шеи Head and neck squamous cell carcinoma	523	Н/р N/d	4,75E-01	508 (5/503)	Н/р N/d	6,20E-01
KIRC	**Светлоклеточная карцинома почки** **Kidney renal clear cell carcinoma**	**532**	**Да** **Yes**	**9,65E-03**	**332 (2/330)**	**Н/р** **N/d**	**6,20E-01**
LAML	**Острый миелоидный лейкоз** **Acute myeloid leukemia**	**175**	**Да** **Yes**	**3,58E-02**	**Н/д** **N/a**	**Н/р** **N/d**	**Н/д** **N/a**
LGG	Глиома мозга низкой степени злокачественности Brain lower grade glioma	528	Н/р N/d	3,86E-01	503 (3/500)	н.р. n.d.	1,26E-01
LIHC	Гепатоцеллюлярная карцинома Liver hepatocellular carcinoma	372	Н/р N/d	8,45E-01	358 (3/355)	Н/р N/d	6,43E-01

Окончание табл. 2
End of table 2

1	2	3	4	5	6	7	8
LUAD	Аденокарцинома легкого Lung adenocarcinoma	519	Н/р N/d	4,81E-01	502 (11/491)	Н/р N/d	3,86E-01
LUSC	Плоскоклеточная карцинома легкого Lung squamous cell carcinoma	495	Н/р N/d	6,16E-01	484 (5/479)	Н/р N/d	3,47E-01
MESO	**Мезотелиома** **Mesothelioma**	**85**	**Тренд** **Trend**	**5,10E-02**	**н.д. (n.a.)**	**Н/р** **N/d**	**Н/д** **N/a**
OV	**Серозная цистаденокарцинома яичников** **Ovarian serous cystadenocarcinoma**	**592**	**Да** **Yes**	**1,10E-02**	**432 (4/428)**	**Н/р** **N/d**	**3,32E-01**
PAAD	**Аденокарцинома поджелудочной железы** **Pancreatic adenocarcinoma**	**184**	**Да** **Yes**	**2,32E-02**	**Н/д** **N/a**	**Н/р** **N/d**	**Н/д** **N/a**
PRAD	Аденокарцинома предстательной железы Prostate adenocarcinoma	502	Н/р N/d	6,84E-01	495 (3/492)	Н/р N/d	8,01E-01
SARC	Саркома Sarcoma	261	Н/р N/d	8,10E-01	н.д. (n.a.)	Н/р N/d	Н/д N/a
SKCM	Меланома кожи Skin cutaneous melanoma	458	Н/р N/d	5,08E-01	453 (8/445)	Н/р N/d	1,98E-01
STAD	Аденокарцинома желудка Stomach adenocarcinoma	413	Н/р N/d	3,10E-01	409 (19/390)	Н/р N/d	3,81E-01
TGCT	Герминогенные опухоли яичка Testicular germ cell tumors	139	Н/р N/d	9,25E-01	Н/д N/a	Н/р N/d	Н/д N/a.
THCA	Рак щитовидной железы Thyroid carcinoma	511	Н/р N/d	6,33E-01	Н/д N/a	Н/р N/d	Н/д N/a
UCEC	**Эндометриоидная карцинома тела матки** **Uterine corpus endometrial carcinoma**	**541**	**Да** **Yes**	**5,25E-03**	**526 (46/480)**	**Да** **Yes**	**4,64E-02**

Примечание. *Анализ общей выживаемости по методу Каплана–Майера проведен с использованием платформы Xenabrowser. В качестве параметров для анализа выбрано число копий гена NBN или наличие соматических мутаций и общая выживаемость пациентов каждой когорты. Когорту для анализа делили на 2 группы по медианному значению копийности NBN или в зависимости от наличия в нем мутаций. «Да» – выявлена статистически значимая прямая зависимость между рассматриваемым параметром (высокая копийность, наличие соматических мутаций) и снижением показателей общей выживаемости пациентов; «тренд» – зависимость просматривается, но p-value находится в промежутке от 0,05 до 0,10; н/р – нет различий; н/д – нет данных. Жирным шрифтом выделены данные по когортам пациентов, для которых изменение копийности NBN или наличие в нем соматических мутаций ассоциировано с изменением показателей общей выживаемости.*

Note. *Kaplan–Meier overall survival analysis was performed using the Xenabrowser platform. The number of NBN copies, the presence of somatic mutations and the overall survival time in patients of each cohort were selected as parameters. Each cohort was divided into two groups according to the median NBN copy number or its mutational status. "Yes" – significant direct linear correlation between the parameter under consideration (high copy number, presence of somatic mutations) and reduction in patients' overall survival time has been revealed; "trend" – correlation is weaker with p-value between 0.05 and 0.10; n/d – no difference; n/a – not available. Data on cohorts of patients for which a change in NBN copy number or the presence of somatic mutations is associated with a change in overall survival rates are shown in bold*

РОЛЬ NBN В ПРИОБРЕТЕНИИ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ УСТОЙЧИВОСТИ К ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ И ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

Одним из подходов к противоопухолевой терапии является индукция повреждений ДНК с помощью лучевой терапии или терапии цитотоксическими препаратами, направленная на накопление таких повреждений и приводящая к сенесценции или программируемой клеточной гибели опухолевых клеток. В связи с тем что опухолевые клетки способны приобретать устойчивость как к ионизирующему излучению, так и к химиотерапевтическим препаратам, перспективным направлением в разработке подходов к противоопухолевой терапии является применение ингибиторов, вызывающих нарушение ответа на повреждения ДНК [45]. Так, ингибиторы PARP1, распознающей различные повреждения ДНК и рекрутирующей к ним белки, необходимые для репарации, уже применяются в качестве монотерапии или в сочетании с химиотерапевтическими препаратами в лечении рака яичников, предстательной, молочной и поджелудочной желез. Помимо этого, на разных стадиях клинических испытаний находятся ингибиторы чекпоинт-киназ, в частности WEE1, ATR, CHK1, PLK1, а также белков, участвующих в репарации двунитевых разрывов ДНК, например POLQ и RAD51 [4].

Исследование генетических детерминант, ассоциированных с дефицитом репарации ДНК, и других факторов, влияющих на эффективность репарации повреждений, может иметь практическое значение для выбора схем противоопухолевой терапии. Например, эффективность лечения ингибиторами PARP1 обусловлена наличием в ДНК опухолевых клеток мутаций, приводящих к дефициту гомологичной рекомбинации. Дефицит гомологичной рекомбинации также является прогностическим фактором, позволяющим предсказать эффективность терапии препаратами платины, а герминативные варианты в генах системы эксцизионной репарации оснований при назофарингеальной карциноме или инфекция вирусом папилломы человека 16-го типа при плоскоклеточной карциноме головы и шеи могут влиять на ответ опухолевых клеток на лучевую терапию [4, 45, 46].

Увеличение числа копий гена *NBN*, которое является частым событием при некоторых типах злокачественных опухолей, может приводить к повышению уровня транскрипции этого гена и продукции белка нибрин. Патогенные герминативные и соматические мутации *NBN*, например c.657del5, напротив, обусловливают частичную утрату белком функции и вследствие этого могут вызывать дефицит гомологичной рекомбинации.

Повышенная продукция белков MRN-комплекса, включая нибрин, предположительно может определять устойчивость опухолей прямой кишки к лучевой терапии, а также быть ассоциирована со снижением показателей как ОВ, так и безрецидивной выживаемости пациентов [47]. В панели культур клеток рака предстательной железы PrEC, LNCaP, 22RV1, PC-3 и DU-145 при повышении уровня экспрессии *NBN* также наблюдается тенденция к снижению радиочувствительности клеток [41].

По результатам клоногенных и МТТ-тестов гиперэкспрессия *NBN* в клетках культуры высокодифференцированной серозной карциномы яичника OVCAR4 и протоковой аденокарциномы молочной железы MCF-7 повышает устойчивость клеток к препарату платины цисплатину и ингибитору PARP олапарибу. Повышенный уровень экспрессии *NBN* в обеих культурах также ассоциирован со сниженным уровнем γH2A.X после инкубации клеток с олапарибом и увеличением количества фокусов RAD51, свидетельствующих о репарации путем гомологичной рекомбинации после инкубации клеток с ингибитором топоизомеразы I камптотецином [40]. Нокдаун *NBN* в клетках культур рака яичника A2780 и SKOV3 приводит к снижению количества жизнеспособных клеток и сокращению их клоногенного потенциала после инкубации с олапарибом по сравнению с контрольными культурами. Опухоли, полученные в результате подкожной инъекции мышам BALB/c культур с подавленной экспрессией *NBN*, достигают меньшего размера при введении олапариба, чем в контрольной группе [48]. Кроме того, в MCF-7 гиперэкспрессия *NBN* приводит к фосфорилированию чекпоинт-киназы ATM по S1981, которое необходимо для активации других белков, участвующих в репарации путем гомологичной рекомбинации, а также к возникновению устойчивости к AZD7762 – ингибитору чекпоинт-киназ CHK1/2, активируемых ATM [39].

Данные о влиянии патогенных мутаций в гене *NBN* на эффективность терапии ингибиторами PARP в настоящее время крайне ограничены. Например, сообщается, что во II фазе клинических испытаний олапариба и препарата для иммунотерапии дурвалумаба при кастрационно-резистентном раке предстательной железы в группе, продемонстрировавшей ответ на препараты, выявлен 1 носитель патогенного герминативного варианта *NBN* [49]. Кроме того, отмечено, что иммортализованные фибробласты, полученные от пациента с СН, характеризуются более высокой чувствительностью к ингибитору PARP KU0058948 по сравнению с фибробластами с экзогенной экспрессией *NBNwt* [50].

ДНК-алкилирующие агенты (например, темозоломид, применяемый при терапии глиобластом) индуцируют образование цитотоксического производного гуанина О6-метилгуанина, который в случае невозможности деметилирования О6-метилгуанина ферментом MGMT или репарации неспаренных оснований способствует образованию двунитевых разрывов ДНК. Экспрессия *NBNwt* также повышает устойчивость иммортализованных линий лимфобластоидных клеток и фибробластов человека к ДНК-алкилирующим агентам (например, темозоломиду) по сравнению с клетками, полученными от

пациентов с СН, а нокдаун *NBN* в клетках культуры меланомы D03, напротив, повышает их чувствительность к этому препарату [51].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что в литературе описано немало герминативных инделов и точечных мутаций *NBN*, которые ассоциированы с проявлениями геномной нестабильности и могут рассматриваться как потенциальные факторы риска развития ЗНО, оценка патогенности большинства герминативных вариантов *NBN* осложнена в связи с их огромным разнообразием и крайне низкой частотой встречаемости. Поскольку информация о таких вариантах может иметь значение для оценки наличия дефицита гомологичной рекомбинации, необходим полногеномный поиск ассоциаций на расширенных выборках пациентов с ЗНО и контрольных групп здоровых индивидов для статистической оценки предрасположенности носителей наиболее распространенных вариантов *NBN* к развитию опухолей, а для подтвержденных ассоциаций – экспериментов по определению функциональной значимости этих полиморфизмов *in vitro*. Еще более актуальным представляется вопрос о необходимости проведения исследований, направленных на оценку влияния амплификации *NBN*, являющейся частым событием при таких опухолях, как рак молочной, предстательной желез и яичника, на устойчивость опухолевых клеток к применяемым в терапии препаратам, поскольку существующие данные указывают на то, что оценка копийности *NBN* может иметь значение при выборе оптимальных схем лекарственного лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011;144(5):646–74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013
2. The ICGC/TCGA pan-cancer analysis of whole genomes consortium. Pan-cancer analysis of whole genomes. Nature 2020;578(7793):82–93. DOI: 10.1038/s41586-020-1969-6
3. McFarland C.D., Yaglom J.A., Wojtkowiak J.W. et al. The damaging effect of passenger mutations on cancer progression. Cancer Res 2017;77(18):4763–72. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3283-T
4. Li Q., Qian W., Zhang Y. et al. A new wave of innovations within the DNA damage response. Signal Transduct Target Ther 2023;8(1):338. DOI: 10.1038/s41392-023-01548-8
5. Toh M., Ngeow J. Homologous recombination deficiency: cancer predispositions and treatment implications. Oncologist 2021;26(9):e1526–37. DOI: 10.1002/onco.13829
6. Bertelsen B., Tuxen I.V., Yde C.W. et al. High frequency of pathogenic germline variants within homologous recombination repair in patients with advanced cancer. NPJ Genom Med 2019;4:13. DOI: 10.1038/s41525-019-0087-6
7. Gao P., Ma N., Li M. et al. Functional variants in NBS1 and cancer risk: evidence from a meta-analysis of 60 publications with 111 individual studies. Mutagenesis 2013;28(6):683–97. DOI: 10.1093/mutage/get048
8. Otahalova B., Volkova Z., Soukupova J. et al. Importance of germline and somatic alterations in human MRE11, RAD50, and NBN genes coding for MRN complex. Int J Mol Sci 2023;24(6):5612. DOI: 10.3390/ijms24065612
9. Takai K., Sakamoto S., Sakai T. et al. A potential link between alternative splicing of the NBS1 gene and DNA damage/environmental stress. Radiat Res 2008;170(1):33–40. DOI: 10.1667/RR1191.1
10. Bian L., Meng Y., Zhang M., Li D. MRE11-RAD50-NBS1 complex alterations and DNA damage response: implications for cancer treatment. Mol Cancer 2019;18(1):169. DOI: 10.1186/s12943-019-1100-5
11. Hari F.J., Spycher C., Jungmichel S. et al. A divalent FHA/BRCT-binding mechanism couples the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. EMBO Rep 2010;11(5):387–92. DOI: 10.1038/embor.2010.30
12. Stiff T., Cerosaletti K., Concannon P. et al. Replication independent ATR signalling leads to G2/M arrest requiring Nbs1, 53BP1 and MDC1. Hum Mol Genet 2008;17(20):3247–53. DOI: 10.1093/hmg/ddn220
13. Kim J.H., Grosbart M., Anand R. et al. The Mre11-Nbs1 interface is essential for viability and tumor suppression. Cell Rep 2017;18(2):496–507. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.035
14. Rai R., Hu C., Broton C. et al. NBS1 phosphorylation status dictates repair choice of dysfunctional telomeres. Mol Cell 2017;65(5):801–17.e4. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.01.016
15. Tseng S.F., Chang C.Y., Wu K.J., Teng S.C. Importin KPNA2 is required for proper nuclear localization and multiple functions of NBS1. J Biol Chem 2005;280(47):39594–600. DOI: 10.1074/jbc.M508425200
16. Varon R., Demuth I., Chrzanowska K.H. Nijmegen breakage syndrome. In: GeneReviews. Ed. by M.P. Adam, J. Feldman, G.M. Mirzaa et al. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1999. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1176/.
17. Sharapova S.O., Pashchenko O.E., Bondarenko A.V. et al. Geographical distribution, incidence, malignancies, and outcome of 136 Eastern slavic patients with Nijmegen Breakage Syndrome and NBN founder variant c.657_661del5. Front Immunol 2021;11:602482. DOI: 10.3389/fimmu.2020.602482
18. Cilli D., Mirasole C., Pennisi R. et al. Identification of the interactors of human nibrin (NBN) and of its 26 kDa and 70 kDa fragments arising from the NBN 657del5 founder mutation. PLoS One 2014;9(12):e114651. DOI: 10.1371/journal.pone.0114651
19. Maser R.S., Zinkel R., Petrini J.H. An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. Nat Genet 2001;27(4):417–21. DOI: 10.1038/86920
20. Lins S., Kim R., Krüger L. et al. Clinical variability and expression of the NBN c.657del5 allele in Nijmegen Breakage Syndrome. Gene 2009;447(1):12–7. DOI: 10.1016/j.gene.2009.07.013
21. Belhadj S., Khurram A., Bandlamudi C. et al. NBN pathogenic germline variants are associated with pan-cancer susceptibility and *in vitro* DNA damage response defects. Clin Cancer Res 2023;29(2):422–31. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-1703
22. Dzikiewicz-Krawczyk A., Mosor M., Januszkiewicz D., Nowak J. Impact of heterozygous c.657-661del, p.I171V and p.R215W mutations in NBN on nibrin functions. Mutagenesis 2012;27(3):337–43. DOI: 10.1093/mutage/ger084
23. Nowak J., Świątek-Kościelna B., Kałużna E.M. et al. Effect of irradiation on DNA synthesis, NBN gene expression and chromosomal stability in cells with NBN mutations. Arch Med Sci 2017;13(2):283–92. DOI: 10.5114/aoms.2017.65452

24. Yamamoto Y., Miyamoto M., Tatsuda D. et al. A rare polymorphic variant of NBS1 reduces DNA repair activity and elevates chromosomal instability. Cancer Res 2014;74(14):3707–15. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3037
25. Sherry S.T., Ward M.H., Kholodov M. et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. Nucleic Acids Res 2001;29(1):308–11. DOI: 10.1093/nar/29.1.308
26. Landrum M.J., Lee J.M., Riley G.R. et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. Nucleic Acids Res 2014;42:D980–5. DOI: 10.1093/nar/gkt1113
27. Cerosaletti K.M., Concannon P. Nibrin forkhead-associated domain and breast cancer C-terminal domain are both required for nuclear focus formation and phosphorylation. J Biol Chem 2003;278(24):21944–51. DOI: 10.1074/jbc.M211689200
28. Tomioka K., Miyamoto T., Akutsu S.N. et al. NBS1 I171V variant underlies individual differences in chromosomal radiosensitivity within human populations. Sci Rep 2021;11(1):19661. DOI: 10.1038/s41598-021-98673-7
29. Warcoin M., Lespinasse J., Despouy G. et al. Fertility defects revealing germline biallelic nonsense NBN mutations. Hum Mutat 2009;30(3):424–30. DOI: 10.1002/humu.20904
30. Varon R., Vissinga C., Platzer M. et al. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. Cell 1998;93(3):467–76. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81174-5
31. Gass J., Jackson J., Macklin S. et al. A case of contralateral breast cancer and skin cancer associated with NBN heterozygous pathogenic variant c.698_701delAACA. Fam Cancer 2017;16(4):551–3. DOI: 10.1007/s10689-017-9982-0
32. Ramus S.J., Song H., Dicks E. et al. Germline mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN genes in women with ovarian cancer. J Natl Cancer Inst 2015;107(11):djv214. DOI: 10.1093/jnci/djv214
33. Wu Y., Yu H., Li S. et al. Rare germline pathogenic mutations of DNA repair genes are most strongly associated with grade group 5 prostate cancer. Eur Urol Oncol 2020;3(2):224–30. DOI: 10.1016/j.euo.2019.12.003
34. Susswein L.R., Marshall M.L., Nusbaum R. et al. Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. Genet Med 2016;18(8):823–32. DOI: 10.1038/gim.2015.166
35. Nakanishi K., Taniguchi T., Ranganathan V. et al. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. Nat Cell Biol 2002;4(12):913–20. DOI: 10.1038/ncb879
36. Desmond A., Kurian A.W., Gabree M. et al. Clinical actionability of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer risk assessment. JAMA Oncol 2015;1(7):943–51. DOI: 10.1001/jamaoncol.2015.2690
37. Gao J., Aksoy B.A., Dogrusoz U. et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal 2013;6(269):pl1. DOI: 10.1126/scisignal.2004088
38. Zehir A., Benayed R., Shah R.H. et al. Mutational landscape of meta-static cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. Nat Med 2017;23(6):703–13. DOI: 10.1038/nm.4333
39. 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
40. Gan M., Tai Z., Yu Y. et al. Next-generation sequencing shows the genomic features of ovarian clear cell cancer and compares the genetic architectures of high-grade serous ovarian cancer and clear cell carcinoma in ovarian and endometrial tissues. Peer J 2023;11:e14653. DOI: 10.7717/peerj.14653
41. Berlin A., Lalonde E., Sykes J. et al. NBN gain is predictive for adverse outcome following image-guided radiotherapy for localized prostate cancer. Oncotarget 2014;5(22):11081–90. DOI: 10.18632/oncotarget.2404
42. Shi Z., Chen B., Han X. et al. Genomic and molecular landscape of homologous recombination deficiency across multiple cancer types. Sci Rep 2023;13(1):8899. DOI: 10.1038/s41598-023-35092-w
43. Goldman M.J., Craft B., Hastie M. et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. Nat Biotechnol 2020;38(6):675–8. DOI: 10.1038/s41587-020-0546-8
44. Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein J.N., Collisson E.A. et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. Nat Genet 2013;45(10):1113–20. DOI: 10.1038/ng.2764
45. Wang M., Chen S., Ao D. Targeting DNA repair pathway in cancer: mechanisms and clinical application. MedComm (2020) 2021;2(4):654–91. DOI: 10.1002/mco2.103
46. Stewart M.D., Merino Vega D., Arend R.C. et al. Homologous recombination deficiency: concepts, definitions, and assays. Oncologist 2022;27(3):167–74. DOI: 10.1093/oncolo/oyab053
47. Huang R.X., Zhou P.K. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. Signal Transduct Target Ther 2020;5(1):60. DOI: 10.1038/s41392-020-0150-x
48. Zhong A., Cheng C.S., Lu R.Q., Guo L. Suppression of NBS1 upregulates cyclinb to induce olaparib sensitivity in ovarian cancer. Technol Cancer Res Treat 2024;23:15330338231212085. DOI: 10.1177/15330338231212085
49. Risdon E.N., Chau C.H., Price D.K. et al. PARP inhibitors and prostate cancer: to infinity and beyond BRCA. Oncologist 2021;26(1):e115–29. DOI: 10.1634/theoncologist.2020-0697
50. McCabe N., Turner N.C., Lord C.J. et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. Cancer Res 2006;66(16):8109–15. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0140
51. Eich M., Roos W.P., Dianov G.L. et al. Nijmegen breakage syndrome protein (NBN) causes resistance to methylating anticancer drugs such as temozolomide. Mol Pharmacol 2010;78(5):943–51. DOI: 10.1124/mol.110.066076

Благодарность. Представленные в этом обзоре сведения частично основаны на данных, полученных в рамках проекта TCGA (https://www.cancer.gov/tcga).

Acknowledgment. The information presented in this review is partially based on data obtained within the framework of the TCGA project (https://www.cancer.gov/tcga).

Вклад авторов

О.М. Кривцова: написание текста статьи, проведение системного и биоинформатического анализов, анализ данных, редактирование;
Д.Д. Озерова: обзор литературы по теме статьи, проведение системного анализа, написание текста статьи;
Н.Л. Лазаревич: написание текста статьи, проведение системного анализа, анализ данных, редактирование.

Authors' contributions

O.M. Krivtsova: article writing, conducting systematic and bioinformatic analyses, data analysis, editing;
D.D. Ozerova: review of the literature on the topic of the article, conducting a system analysis, article writing;
N.L. Lazarevich: article writing, conducting system analysis, data analysis, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors
О.М. Кривцова / O.M. Krivtsova: https://orcid.org/0000-0002-0207-2724
Д.Д. Озерова / D.D. Ozerova: https://orcid.org/0009-0005-2450-8452
Н.Л. Лазаревич / N.L. Lazarevich: https://orcid.org/0000-0001-9560-1383

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

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

Статья поступила: 13.08.2024. **Принята к публикации:** 10.09.2024. **Опубликована онлайн:** 09.10.2024.
Article submitted: 13.08.2024. **Accepted for publication:** 10.09.2024. **Published online:** 09.10.2024.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-24-31

CC BY 4.0

Иммунологическая толерантность при раке молочной железы: некоторые причины развития

Е.В. Каюкова, Э.С. Болотов

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России; Россия, 672000 Чита, ул. Горького, 39А

Контакты: Элбэк Саянович Болотов *elbek1994@gmail.com*

Иммунологическая толерантность является одной из причин возникновения и прогрессирования злокачественных опухолей. Противоопухолевый иммунный цикл регулирует нормальный противоопухолевый иммунный ответ, а его нарушение вызывает развитие иммунологической толерантности. В статье представлен обзор отечественной и зарубежной литературы, опубликованной за последние 5 лет в базах PubMed, Medline, Cochrane, eLibrary и посвященной вопросам возникновения иммунологической толерантности при раке молочной железы с позиции нарушения регуляции фаз противоопухолевого иммунного цикла. В настоящее время выделяют следующие этапы противоопухолевого иммунного цикла: экспрессия антигенов на поверхности опухолевых клеток, созревание антигенпрезентирующих клеток и распознавание опухолевых антигенов, праймирование и активация Т-клеток, иммунная инфильтрация опухолевого очага, распознавание и уничтожение опухолевых клеток. Понимание механизмов, лежащих в основе противоопухолевого иммунного цикла, важно для выявления новых иммунопатогенетических звеньев развития рака молочной железы и таргетируемых мишеней с целью улучшения эффективности терапии распространенного рака молочной железы.

Ключевые слова: иммунологическая толерантность, рак молочной железы, противоопухолевый иммунный цикл, метаболом

Для цитирования: Каюкова Е.В., Болотов Э.С. Иммунологическая толерантность при раке молочной железы: некоторые причины развития. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(3):24–31.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-24-31

Immunological tolerance in breast cancer: some reasons for development

E.V. Kayukova, E.S. Bolotov

Chita State Medical Academy, Ministry of Health of Russia; 39A Gor'kogo St., Chita 672000, Russia

Contacts: Elbek Sayanovich Bolotov *elbek1994@gmail.com*

Immunological tolerance is one of the reasons for the development and progression of malignant tumors. The tumor immune cycle regulates the normal antitumor immune response, and it's disruption is responsible for the development of immunological tolerance. This article provides a review of russian and foreign literature published in databases such as PubMed, Medline, and Cochrane, eLibrary in the last 5 years, focusing on the emergence of immunological tolerance in breast cancer from the perspective of disrupted regulation of tumor immune cycle phases: expression of antigens on the surface of tumor cells, cancer antigen presentation, priming and activation T cells, immune infiltration of the tumor site, recognition, and elimination of tumor cells. Understanding the mechanisms underlying tumor immune cycle disruption is important for identifying new immunopathogenetic links in the development of breast cancer, as well as identifying targets to improve the effectiveness of therapy for advanced breast cancer.

Keywords: immune tolerance, breast cancer, tumor immune cycle, metabolome

For citation: Kayukova E.V., Bolotov E.S. Immunological tolerance in breast cancer: some reasons for development. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(3):24–31. (In Russ.).

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-24-31

ВВЕДЕНИЕ

Иммунопатогенез лежит в основе возникновения многих заболеваний (атеросклероза, аутоиммунных, аллергических заболеваний и др.), в том числе развития и прогрессирования злокачественных опухолей. Иммунноредактирование статуса опухолевых клеток и клеток иммунной системы рассматривается как главная причина развития иммунологической толерантности (ИТ) [1].

На иммунноредактирование опухолевого процесса влияют различные факторы: индивидуальные особенности пациента (возраст, пол, сопутствующая патология, предшествующее лечение, состояние местного микробиоценоза и др.), а также особенности опухоли и ее микроокружения [1, 2]. Противоопухолевый иммунный цикл (ПИЦ) лежит в основе противоопухолевого иммунного ответа, а нарушение любого его этапа – в основе формирования ИТ к этому ответу, что способствует прогрессированию опухолевого процесса.

В 2013 г. D. Chen и I. Mellman впервые описали механизмы ПИЦ как серию поэтапных событий, в результате которых происходит уничтожение опухолевых клеток: экспрессия антигенов на поверхности опухолевых клеток, созревание антигенпрезентирующих клеток (АПК) и распознавание опухолевых антигенов, праймирование и активация Т-клеток, иммунная инфильтрация опухолевого очага, распознавание и уничтожение опухолевых клеток [3]. Однако созданные самой опухолью механизмы ИТ препятствуют реализации ПИЦ на разных этапах, что формирует резистентность опухолевых клеток и способствует прогрессированию рака.

СЛАБАЯ ОПУХОЛЕВАЯ АНТИГЕННОСТЬ

Опухолевые неоантигены являются мишенями для клеток иммунной системы. Они представляют собой антигены, экспрессирующиеся на поверхности опухолевых клеток вследствие многочисленных соматических мутаций (опухолевая мутационная нагрузка – tumor mutational burden, TMB), а также при наличии микросателлитной нестабильности (MSI) из-за дефектов репарации ошибочно спаренных нуклеотидов [4].

Опухолевая мутационная нагрузка представляет собой числовой индекс, который выражает количество мутаций на мегабазу (мут/Мб), содержащихся в опухолевых клетках новообразования. В настоящее время TMB определяют с использованием полногеномного или таргетного секвенирования (next generation sequencing, NGS). Известно, что значение TMB варьирует в зависимости от наличия мутации в гене *POLE* (который кодирует каталитическую субъединицу ДНК-полимеразы эпсилон), уровня MSI, гистологического варианта опухоли, некоторых этиологических факторов канцерогенеза (курение, воздействие ультрафиолетового излучения). Среднее значение высокого показателя TMB составляет 17–20 мут/Мб [4].

Статус MSI (высокий или низкий) можно определить с помощью молекулярного анализа с использованием панели стандартных микросателлитных маркеров или иммуногистохимического исследования. Известно, что новообразования с высокими TMB и MSI-статусом лучше отвечают на иммунотерапию [5]. Исторически рак молочной железы (РМЖ) не считается высокоиммуногенной опухолью из-за низкой частоты мутаций в генах клеток РМЖ и ограниченной способности образовывать опухолевые неоантигены, в отличие от меланомы и немелкоклеточного рака легкого [6].

По уровню иммуногенности РМЖ занимает промежуточное положение среди всех солидных опухолей, медиана TMB составляет 2,63 мут/Мб. Только в 5 % всех случаев РМЖ TMB ≥10 мут/Мб, в метастатических опухолях высокое значение этого показателя встречается чаще (8,4 % против 2,9 %) [7]. По данным литературы, самый высокий показатель TMB зафиксирован при трижды негативном (ТНРМЖ) и HER2-положительном (HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа) РМЖ [7].

По данным исследования IMpassion 130, высокий показатель TMB наряду с положительным PD-L1-статусом (PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1) опухолевых клеток позволяет улучшить результаты лечения метастатического ТНРМЖ и снизить риск прогрессирования или смерти на 20 % [8].

Опубликованы данные о возможности использования уровня TMB в качестве предиктора полного патоморфологического ответа (pCR) опухоли на неоадъювантную иммунотерапию у больных с ранним ТНРМЖ. У пациенток с данной патологией и высоким значением TMB pCR составляет 82 %, тогда как у пациенток с низким значением TMB – 28 % [9]. У больных с метастатическим HER+-РМЖ высокое значение TMB рассматривается как маркер более длительной общей выживаемости на фоне химиотаргетной терапии (44,9 мес против 85,8 мес; $p = 0{,}016$) [10, 11].

Также большое значение для запуска следующего этапа противоопухолевого иммунного цикла имеют свойства неоантигена: аффинность, авидность с человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA), сходство последовательности с известными высокоиммуногенными эпитопами [12].

Важным компонентом изучения иммуногенности опухоли с целью последующего повышения иммуногенности и эффективности противоопухолевого иммунного ответа является таргетное или экзомное секвенирование генома опухолевых клеток.

НАРУШЕНИЕ ПРЕЗЕНТАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ АНТИГЕНОВ Т-ЛИМФОЦИТАМ

Антигенпрезентирующие клетки представлены макрофагами, дендритными клетками (ДК) и В-лимфоцитами. Роль ДК заключается в захвате опухолевых антигенов, его процессинге и представлении Т-лимфоцитам.

Антигенпрезентирующие клетки могут быть классифицированы на миелоидные и плазмоцитоидные, зрелые и незрелые. Последние имеют более низкую экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости HLA класса I (HLA-I), HLA класса II (HLA-II), молекул адгезии, не секретируют провоспалительные цитокины, но способны к миграции. Человеческие лейкоцитарные антигены классов I и II экспрессируются на поверхности любой клетки и важны для презентации неоантигена АПК и запуска Т-клеточного иммунного ответа. Человеческие лейкоцитарные антигены являются самым сложноустроенным участком генома человека, который насчитывает более 37 000 аллелей [13].

Имеются сведения, что экспрессия HLA определяется этнической принадлежностью [14]. Известно, что канцерогенез ассоциирован с утратой или нарушением экспрессии HLA, что является одним из механизмов развития ИТ. Установлено, что для клеток РМЖ характерна потеря экспрессии HLA-I на поверхности опухолевых клеток [15].

Преобладающим HLA-иммунофенотипом РМЖ является бинегативный фенотип (HLA-I–, HLA-DR), который чаще ассоциирован с Т4, рецепторнегативным статусом опухоли и N+ [16]. Субъединицей легкой цепи HLA I является β2-микроглобулин (β2-m). Нарушение его экспрессии – один из важных этапов нарушения презентации опухолевых антигенов, что лежит в основе опухолевой прогрессии при многих злокачественных опухолях, в том числе при РМЖ. В настоящее время β2-m рассматривается как таргетируемая мишень в лечении опухолей с учетом многообразия задействованных патофизиологических механизмов, в которых он участвует (эпителиально-мезенхимальный переход, ангиогенез, апоптоз, дифференцировка, рост клеток и др.) [17].

Человеческий лейкоцитарный антиген класса II регулирует антигенсвязывающую способность АПК, действует как рецептор для фактора ингибирования миграции цитокинов макрофагов (MIF). При солидных опухолях, в том числе при РМЖ, HLA-II может экспрессироваться и опухолевыми, и стромальными клетками, что способно опосредовать как стимулирующее, так и противоопухолевое действие. Нарушение экспрессии HLA клетками РМЖ ассоциировано со снижением инфильтрации опухолеваассоциированными лимфоцитами (TILs), частоты объективных ответов на противоопухолевую иммунную терапию и неблагоприятным прогнозом [18].

С целью улучшения презентирования опухолевых антигенов разрабатываются искусственные технологии: для активации ДК используют специфические пептиды, лизированные опухолевые клетки, пептиды, элюированные с поверхности опухолевых клеток, и др. [19]. Генетические манипуляции с ДК *in vivo* позволяют изменить экспрессию на их поверхности иммуностимуляторных (CD40, CD80, CD86), про- и противовоспалительных молекул.

НАРУШЕНИЕ ПРАЙМИРОВАНИЯ И АКТИВАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Презентация опухолеспецифических антигенов Т-клеткам запускает праймирование и активацию эффекторных Т-клеток путем взаимодействия опухолевого HLA-антигена с Т-клеточным рецептором (TCR). Антигены, связанные с HLA-II, активируют CD4+-Т-клетки, которые дифференцируются в подмножества Т-хелперных клеток, тогда как антигены, связанные с HLA-I, стимулируют дифференцировку CD8+-Т-клеток в цитотоксические Т-клетки. Распознавание большого количества антигенов TCR определяется многообразными последовательностями белковых цепей в его составе и называется репертуаром, что определяет противоопухолевый и противовирусный иммунные ответы. На репертуар TCR могут влиять возраст пациента, сопутствующие заболевания, иммуносупрессия и другие факторы [20]. Известно, что для метастатического РМЖ характерна дивпения (низкое разнообразие TCR – менее 33 %), что ассоциировано со снижением общей выживаемости (9,7 мес в группе пациентов с дивпенией против 21,7 мес в группе больных без нее) [21].

Химиорезистентность опухолевых клеток ассоциирована с изменением активности Т-клеточного ответа, а следовательно, с модификацией репертуара TCR. Опубликованы данные о том, что высокий репертуар TCR связан с чувствительностью опухоли к противоопухолевой иммунотерапии при меланоме, раке легкого, а также может быть фактором риска развития иммуноопосредованных нежелательных явлений [22]. Адоптивная Т-клеточная терапия является потенциальным терапевтическим подходом для преодоления недостаточной активации эффекторных Т-клеток путем реинфузии пациенту активированных Т-клеток: с использованием Т-лимфоцитов, модифицированных геном TCR, или Т-лимфоцитов, модифицированных геном химерного антигенного рецептора [23].

ИНГИБИРОВАНИЕ ЭФФЕКТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ В КРОВОТОКЕ

Активированные эффекторные Т-клетки должны попасть через кровоток в локальный участок ткани, содержащий опухолевые клетки. Однако уровень системных факторов, таких как провоспалительные цитокины – интерлейкины (IL) 6, 1, фактор некроза опухоли α (TNF-α), трансформирующий фактор роста β (TGF-β), С-реактивный белок – ассоциированы со снижением активности эффекторных Т-лимфоцитов, а также гиперэкспрессией PD-L1 на локальном уровне [3, 24].

Имеются данные о наличии прямых корреляционных связей между локальным содержанием ингибитора ПИЦ CTLA4 в эпителиальных клетках рака шейки матки и содержанием в сыворотке крови IL-6, TNF-α и воспалительным белком макрофагов 1β (MIP-1β), а также между локальным уровнем LAG3 и системным содержанием TNF-α [25].

Таким образом, ингибирование провоспалительных цитокинов может быть использовано для улучшения эффективности противоопухолевой иммунотерапии. Известно, что подавление IL-6 увеличивает эффективность терапии анти-PD-L1 в доклинических исследованиях.

ИММУННАЯ ИНФИЛЬТРАЦИЯ ОПУХОЛЕВОГО ОЧАГА

Опухолевое микроокружение (ОМ) имеет большое значение как для реализации противоопухолевого иммунного ответа, так и для прогрессии опухоли. Опухолевое микроокружение характеризуется гетерогенностью: TILs, сложные миелоидные клетки, липидассоциированные макрофаги, фибробласты и другие клетки способствуют росту и миграции клеток РМЖ [26].

Известно, что состав ОМ в нормальной ткани молочной железы при протоковом раке *in situ* и инвазивном РМЖ различен [27]. Так, в биоптате инвазивного РМЖ преобладают $CD8^+$- и $CD4^+$-лимфоциты с незначительными популяциями NK-клеток (NK – естественные киллеры) и В-лимфоцитов, тогда как в нормальной ткани молочной железы клетки миелоидного происхождения включают макрофаги, тучные клетки и нейтрофилы [28, 29]. Отличительными особенностями ОМ РМЖ по сравнению со здоровой тканью молочных желез являются гетерогенность клеток и фенотипическое разнообразие Т-клеток. Сложность состава иммунных клеток при РМЖ отражает связь компонентов врожденного иммунного ответа, поскольку он регулирует ОМ и полярность адаптивного иммунного ответа внутри этой опухоли. Опухолевое микроокружение создает условия для возможности инфильтрации Т-лимфоцитами клеток опухоли и гибели последних [29].

На клеточном уровне ТНРМЖ имеет значительно более высокую стромальную и внутриопухолевую инфильтрации CD8+- и CD4+-Т-клетками по сравнению с люминальным РМЖ. Для инвазивного протокового РМЖ характерна большая инфильтрация CD3+-Т-, CD8+-Т-лимфоцитами, CD68+- макрофагами, CD20+-В-лимфоцитами и FOXP3+-Т-регуляторными клетками [29].

Локальный уровень TILs у больных РМЖ рассматривается как прогностический маркер, показатель активности противоопухолевого Т-клеточного иммунитета, предиктор эффективности химиоиммунной и химиотаргетной терапии у пациенток с ранним ТНРМЖ и HER-положительным РМЖ и иммунотерапии – у больных метастатическим ТНРМЖ [30].

Поиск таргетных мишеней среди ОМ является перспективной стратегией улучшения эффективности лечения ТНРМЖ.

РАСПОЗНАВАНИЕ И УНИЧТОЖЕНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Регуляция активности Т-лимфоцитов по отношению к опухолевой клетке осуществляется белками ПИЦ (чекпоинтами), которые могут выполнять роль как стимуляторов (4-1BB, CD40, CD70), так и ингибиторов (рецептор программируемой клеточной гибели (PD-1), PD-L1, CTLA4, LAG3, Tim3) [25, 31].

Белок 4-1BB играет ключевую роль в контроле работы иммунной системы и обладает костимулирующим действием на активированные Т-клетки. Он усиливает функциональные возможности Т-клеток и способствует сохранению клеточной памяти. Экспрессия 4-1BB усиливается при активации Т-клеток, регулируя их состояние. Этот белок обнаружен на поверхности различных клеток, таких как NK-клетки, моноциты, макрофаги, ДК и регуляторные Т-клетки. Для осуществления своих функций 4-1BB взаимодействует с лигандом (4-1BBL), который экспрессируется на АПК. Экспрессия 4-1BB приводит к активации пути c-Jun, что регулирует активность Т-клеток [32]. Стимуляция 4-1BB может усиливать пролиферацию и выживание активированных Т-клеток, а также повышать их эффекторную функцию. Это приводит к усилению противоопухолевого иммунного ответа. Результаты многочисленных экспериментов на животных и клинических исследований показали, что агонисты 4-1BB могут иметь противоопухолевую активность и способствовать контролю роста опухоли. На основе этих результатов проводятся исследования для разработки новых терапевтических средств, нацеленных на рецептор 4-1BB [33]. Например, агонисты 4-1BB используются в комбинации с другими иммунотерапевтическими препаратами, такими как ингибиторы PD-1/PD-L1, для усиления иммунного ответа и повышения эффективности лечения РМЖ. При РМЖ костимулирующий фактор 4-1BB способствует миграции моноцитов/макрофагов в ОМ путем усиления экспрессии гена *Fra-1* [32]. В то же время он способствует и дифференцировке моноцитов/макрофагов в остеокласты, обеспечивая таким образом благоприятное микроокружение для колонизации и роста метастатических клеток РМЖ в костях [32]. Антитела к 4-1BB усиливают терапевтическую активность трастузумаба против HER2-положительного РМЖ [34].

CD40 – рецептор, принадлежащий к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), экспрессируется на различных АПК, включая ДК, В-клетки, макрофаги и моноциты. Он также присутствует на некоторых неиммунных клетках, таких как тромбоциты и эндотелиальные клетки, а также на различных типах опухолевых клеток. CD40 играет большую роль в стимуляции иммунных реакций. Эффект достигается через экспрессию молекул МСН, повы-

шенную экспрессию костимулирующих молекул CD86 и CD80, а также усиление экспрессии лигандов суперсемейства TNF на поверхности ДК. Кроме того, в результате этого взаимодействия ДК могут выделять IL-12, что способствует активации CD8+-Т-клеток. Взаимодействие CD40/CD40L также играет большую роль в контакте В- и Т-клеток. Это способствует активации и пролиферации В-клеток, а также презентации антигена, что является ключевым этапом иммунного ответа. Таким образом, CD40 и его взаимодействие с CD40L играют главную роль в активации иммунной системы и регуляции активности иммунных синапсов, что способствует эффективному иммунному ответу и борьбе с инфекциями и опухолями [35, 36]. Влияние CD40 на механизмы развития РМЖ изучено плохо.

CD70 – костимулирующая молекула, участвующая в иммунном ответе, а также в развитии и прогрессировании рака. Результаты недавних исследований показали, что высокая экспрессия CD70 в раковых клетках может подавлять противоопухолевый иммунный ответ. Экспрессия CD70 была обнаружена в метастатических образцах рака легкого, поджелудочной железы и остеосаркомы, что свидетельствует о важности CD70 в прогрессировании заболевания [35, 37]. Роль CD70 при РМЖ также остается неясной. D.K. Rhee и соавт. выявили, что экспрессия CD70 в клеточных линиях РМЖ ингибируется во время прогрессирования заболевания. Одна из гипотез заключается в том, что ингибирование экспрессии CD70 в опухолевых клетках позволило бы им избежать иммунного ответа [38].

J.P. Allison и соавт. в конце 1994 г. провели эксперимент, результаты которого показали, что блокирование рецептора CTLA-4 активизирует иммунную систему для борьбы с опухолевыми клетками. В 1992 г. T. Honjo обнаружил белок PD-1 на Т-лимфоцитах и показал, что его блокирование может активизировать противоопухолевый иммунный ответ. J.P. Allison и T. Honjo в 2018 г. были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытия в области иммунотерапии рака. Результаты их исследований продемонстрировали, что рецепторы CTLA-4 и PD-1 играют ключевую роль в негативной регуляции иммунного ответа, подавляя активность Т-клеток. Ингибирование этих рецепторов с помощью иммунотерапии может усилить иммунный ответ и облегчить борьбу организма с раковыми клетками. Эти открытия способствовали разработке новых лекарственных препаратов – ингибиторов CTLA-4 и PD-1/PD-L1, которые активно применяются в лечении онкологических заболеваний [39].

Белок PD-1 является рецептором иммунной контрольной точки, экспрессируется на поверхности иммунных эффекторных клеток, таких как Т-, В-, NK-клетки, моноциты и ДК. Он играет большую роль в регуляции иммунного ответа. Путь PD-1/PD-L1 является механизмом ИТ и контроля за воспалением [40]. Рецептор программируемой клеточной гибели 1 активируется главным образом через взаимодействие с PD-L1, который может быть экспрессирован на различных клетках организма, в том числе опухолевых. Это взаимодействие ослабляет активацию Т-клеток и подавляет их иммунный ответ. Высокая экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках является одним из механизмов ИТ. Блокирование PD-1 или PD-L1 с использованием специфических антител, таких как пембролизумаб или атезолизумаб, стало одной из основных стратегий иммунотерапии онкологических заболеваний. В случае РМЖ также продемонстрирован положительный эффект ингибирования PD-1 или PD-L1 [41]. Уровень экспрессии PD-1 был связан с показателями общей выживаемости у пациенток с РМЖ (отношение рисков 0,67; 95 % доверительный интервал 0,49–0,91; $p = 0,012$), в отличие от PD-L1 (не продемонстрировал прогностической значимости: отношение рисков 0,85; 95 % доверительный интервал 0,62–1,17; $p = 0,313$) [43]. Экспрессия PD-1 в лимфоцитах была благоприятным прогностическим фактором при ТНРМЖ. При этом высокая экспрессия PD-L1 ассоциирована с неблагоприятным прогнозом. Наилучшие результаты терапии ингибиторами PD-L1 выявлены у больных с метастатическим ТНРМЖ [42].

Известно, что около 70 % случаев ТНРМЖ ассоциированы с экспрессией CTLA-4, из них более чем в 50 % случаев отмечена высокая экспрессия этого маркера, при этом не установлено явной корреляции с распространенностью онкологического процесса. Использование ингибиторов CTLA-4 является перспективным направлением в терапии метастатического ТНРМЖ [44].

Белок LAG-3 идентифицирован в 1990 г. F. Triebel и соавт. при исследовании биомолекул, которые избирательно экспрессировались в клетках лимфоцитов, ДК и NK-клетках [45]. Взаимодействие молекул LAG-3 и главного комплекса гистосовместимости класса II приводит к подавлению пролиферации CD4+-Т-клеток и секреции цитокинов. LAG-3 обладает синергетическим действием с PD-1 [46]. Сведения об уровне экспрессии LAG-3 у больных РМЖ противоречивы. Экспрессия LAG-3 повышена в ткани РМЖ, особенно при трижды негативном его фенотипе, HER2-положительном и люминальном А подтипах, а также у пациентов РМЖ с опухолями высокой степени злокачественности [47]. При этом еще в одном исследовании получены противоположные данные: у больных РМЖ высокая экспрессия LAG-3 ассоциирована с более длительной безрецидивной и общей выживаемостью [48].

Белок TIM-3 идентифицирован в 2001 г. в ходе исследования генов предрасположенности к астме у конгенных инбредных мышей. Его активация усиливает активность транскрипционного ядерного фактора κB (NF-κB) посредством взаимодействия NF-κB с протеинкиназой 70, ассоциированной с ζ-цепью, и SLP-76 [49]. Исследования показывают, что молекула TIM-3 активируется сильнее в тканях РМЖ по сравнению

с нормальными тканями [50]. Результаты исследований, посвященных изучению уровня экспрессии TIM-3 у больных РМЖ, противоречивы. C. Solinas и соавт. установили, что уровень экспрессии TIM-3 при ТНР-МЖ и HER2-положительном РМЖ повышен [51]. Высокий уровень экспрессии TIM-3 коррелировал с молодым возрастом, большей долей TILs, распространенной стадией опухоли, а также повышенным уровнем экспрессии молекул PD-1 и PD-L1 [52]. L. Tu и соавт. сделали вывод об ассоциации высокого уровня TIM-3 с благоприятным прогнозом у больных РМЖ [53]. Результаты одного из исследований показали, что люминальный А и люминальный В РМЖ имели более сильную экспрессию TIM-3 по сравнению с HER2-позитивным РМЖ и ТНРМЖ. Однако это не оказывало влияния на безрецидивную выживаемость [54]. Эти данные указывают на важность рассмотрения экспрессии TIM-3 в разных подтипах РМЖ и ее связи с иммунным статусом и прогнозом пациентов. Дополнительные исследования могут быть необходимы для более глубокого понимания механизмов, связанных с активацией TIM-3, и его роли в канцерогенезе РМЖ.

Известно, что уровень экспрессии чекпоинтов ассоциирован с атипичным метаболизмом липидов, глюкозы, аминокислот как в опухолевых клетках, так и в клетках ОМ. В частности, известны корреляционные связи между лигандом рецептора программируемой клеточной гибели 2 (PD-L2) в суспензии клеток рака шейки матки, с одной стороны, и локальными величинами миристиновой, маргариновой и α-линолевой кислот, с другой, что указывает на метаболическую и иммунологическую обусловленность развития рака шейки матки [25, 31, 55].

Еще одним механизмом развития ИТ является нарушение метаболизма незаменимой аминокислоты триптофана. Индоламин 2,3-диоксигеназа (ИДО) катализирует превращение триптофана в кинуренин, иммуносупрессивный метаболит, участвующий в дифференцировке Т-регуляторных клеток. Индоламин 2,3-диоксигеназа экспрессируется при многих типах рака, включая РМЖ [56]. Истощение триптофана вызывает остановку в фазе G1 клеточного цикла, блокируя пролиферацию Т-лимфоцитов, и запускает реакцию, опосредованную активацией пути киназы GCN2, которая отвечает за анергию Т-клеток и их апоптоз [57]. Данные об активности ИДО у больных РМЖ противоречивы. Известно, что при люминальном РМЖ наблюдается более высокая экспрессия ИДО [58]. Но M.T. Isla Larrain и соавт. сообщили о максимальной активности этого фермента у больных ТНРМЖ [59]. Опубликованы данные о корреляции между экспрессией ИДО и PD-L1 у пациентов с РМЖ [60].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ИТ представляет собой не до конца изученный динамический феномен взаимодействия опухолевых клеток и клеток иммунной системы. Несмотря на то что РМЖ относится к опухолям со слабой иммуногенностью, устранение ИТ является перспективной стратегией лечения диссеминированного РМЖ.

Молекулярные механизмы, участвующие в формировании ИТ клеток РМЖ, многообразны, персонализированы и полностью не изучены. Развитие ИТ ассоциировано с молекулярными нарушениями, которые могут возникнуть на любой фазе ПИЦ, что ассоциировано с первичной или приобретенной химио- и иммунорезистентностью опухоли. Кроме того, известно, что изменение метаболизма опухолевой клетки также может быть связано с развитием ИТ с формированием иммунного фенотипа опухоли. Понимание механизмов, лежащих в основе ИТ, открывает новые перспективы для профилактики РМЖ и разработки эффективных методов терапии этого заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ghorani E., Swanton C., Quezada S.A. Cancer cell-intrinsic mechanisms driving acquired immune tolerance. Immunity 2023;56(10):2270–95. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.09.004
2. Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science 2011;331(6024):1565–70. DOI: 10.1126/science.1203486
3. Chen D.S., Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity 2013;39(1):1–10. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.07.012
4. Li M., Gao X., Wang X. Identification of tumor mutation burden-associated molecular and clinical features in cancer by analyzing multi-omics data. Front Immunol 2023;14:1090838. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1090838
5. Kikuchi T., Mimura K., Okayama H. et al. A subset of patients with MSS/MSI-low-colorectal cancer showed increased CD8(+) TILs together with up-regulated IFN-γ. Oncol Lett 2019;18(6):5977–85. DOI: 10.3892/ol.2019.10953
6. Liu K., Mao X., Li T. et al. Immunotherapy and immunobiomarker in breast cancer: current practice and future perspectives. Am J Cancer Res 2022;12(8):3532–47.
7. Barroso-Sousa R., Pacífico J.P., Sammons S., Tolaney S.M. Tumor mutational burden in breast cancer: current evidence, challenges, and opportunities. Cancers (Basel) 2023;15(15):3997. DOI: 10.3390/cancers15153997
8. Schmid P., Rugo H.S., Adams S. et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Oncol 2020;21(1):44–59. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30689-8

9. Emens L.A., Molinero L., Adams S. et al. Tumour mutational burden and clinical outcomes with first-line atezolizumab and nab-paclitaxel in triple negative breast cancer: exploratory analysis of the phase III Impassion130 trial. Ann Oncol 2020;31:360–1. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.08.398
10. Karn T., Denkert C., Weber K.E. et al. Tumor mutational burden and immune infiltration as independent predictors of response to neoadjuvant immune checkpoint inhibition in early TNBC in GeparNuevo. Ann Oncol 2020;31(9):1216–22. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.05.015
11. Park S.E., Park K., Lee E. et al. Clinical implication of tumor mutational burden in patients with HER2-positive refractory metastatic breast cancer. Oncoimmunology 2018;7(8):e1466768. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1466768
12. Narang P., Chen M., Sharma A.A. et al. The neoepitope landscape of breast cancer: implications for immunotherapy. BMC Cancer 2019;19(1):200. DOI: 10.1186/s12885-019-5402-1
13. Schaafsma E., Fugle C.M., Wang X., Cheng C. Pan-cancer association of HLA gene expression with cancer prognosis and immunotherapy efficacy. Br J Cancer 2021;125(3):422–32. DOI: 10.1038/s41416-021-01400-2
14. Degenhardt F., Wendorff M., Wittig M. et al. Construction and benchmarking of a multi-ethnic reference panel for the imputation of HLA class I and II alleles. Hum Mol Genet 2019;28(12):2078–92. DOI: 10.1093/hmg/ddy443
15. da Silva G.B., Silva T.G., Duarte R.A. et al. Expression of the classical and nonclassical HLA molecules in breast cancer. Int J Breast Cancer 2013;2013:250435. DOI: 10.1155/2013/250435
16. Чулкова С.В., Шолохова Е.Н., Поддубная И.В. и др. HLA-мономорфные детерминанты первичной опухоли у больных раком молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(2):56–66. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-56-66
Chulkova S.V., Sholokhova E.N., Poddubnaya I.V. et al. HLA-monomorphic determinants of the primary tumor in breast cancer patients. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(2):56–66. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-56-66. (In Russ.).
17. Li K., Du H., Lian X. et al. Characterization of β2-microglobulin expression in different types of breast cancer. BMC Cancer 2014;14:750. DOI: 10.1186/1471-2407-14-750
18. Zheng G., Jia L., Yang A.G. Roles of HLA-G/KIR2DL4 in breast cancer immune microenvironment. Front Immunol 2022;13:791975. DOI: 10.3389/fimmu.2022.791975
19. Mohanty R., Chowdhury C.R., Arega S. et al. CAR T cell therapy: a new era for cancer treatment (Review). Oncol Rep 2019;42(6):2183–95. DOI: 10.3892/or.2019.7335
20. Zagorulya M., Yim L., Morgan D.M. et al. Tissue-specific abundance of interferon-gamma drives regulatory T cells to restrain DC1-mediated priming of cytotoxic T cells against lung cancer. Immunity 2023;56(2):386–405.e10. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.01.010
21. Manuel M., Tredan O., Bachelot T. et al. Lymphopenia combined with low TCR diversity (divpenia) predicts poor overall survival in metastatic breast cancer patients. Oncoimmunology 2012;1(4):432–40. DOI: 10.4161/onci.19545
22. Chandran S.S., Klebanoff C.A. T cell receptor-based cancer immunotherapy: Emerging efficacy and pathways of resistance. Immunol Rev 2019;290(1):127–47. DOI: 10.1111/imr.12772
23. Azizi D., Carr A.J., Plitas G. et al. Single-cell map of diverse immune phenotypes in the breast tumor microenvironment. Cell 2018;174(5):1293–1308.e36. DOI: 10.1016/j.cell.2018.05.060.
24. Liu X., Si F., Bagley D. et al. Blockades of effector T cell senescence and exhaustion synergistically enhance antitumor immunity and immunotherapy. J Immunother Cancer 2022;10(10):e005020. DOI: 10.1136/jitc-2022-005020
25. Каюкова Е.В., Белокриницкая Т.Е., Мудров В.А. Молекулярные показатели клеток шейки матки в качестве диагностических маркеров цервикальной интраэпителиальной неоплазии третьей степени. Эффективная фармакотерапия 2022;18 (21): 14–9.
Kayukova E.V., Belokrinickaya T.E., Mudrov V.A. The Molecular indicators of cervical cells as diagnostic markers of cervical intraepithelial neoplasia III. Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy 2022;18(21):14–9. (In Russ.).
26. Li J., Wu J., Han J. et al. Analysis of tumor microenvironment heterogeneity among breast cancer subtypes to identify subtype-specific signatures. Genes (Basel) 2022;14(1):44. DOI: 10.3390/genes14010044
27. Onkar S., Cui J., Zou J. et al. Immune landscape in invasive ductal and lobular breast cancer reveals a divergent macrophage-driven microenvironment. Nat Cancer 2023;4(4):516–34. DOI: 10.1038/s43018-023-00527-w
28. Mittal S., Brown N.J., Holen I. et al. The breast tumor microenvironment: role in cancer development, progression and response to therapy. Expert Rev Mol Diagn 2018;18(3):227–43. DOI: 10.1080/14737159.2018.1439382
29. Yuan X., Wang J., Huang Y. et al. Single-cell profiling to explore immunological heterogeneity of tumor microenvironment in breast cancer. Front Immunol 2021;12:643692. DOI: 10.3389/fimmu.2021.643692
30. So J.Y., Ohm J., Lipkowitz S., Yang L. Triple negative breast cancer (TNBC): non-genetic tumor heterogeneity and immune microenvironment: emerging treatment options. Pharmacol Ther 2022;237:108253. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2022.108253
31. Loi S., Michiels S., Adams S. et al. The journey of tumor-infiltrating lymphocytes as a biomarker in breast cancer: clinical utility in an era of checkpoint inhibition. Ann Oncol 2021;32(10):1236–44. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.07.007
32. Jiang P., Gao W., Ma T. et al. CD137 promotes bone metastasis of breast cancer by enhancing the migration and osteoclast differentiation of monocytes/macrophages. Theranostics 2019;9(10):2950–66. DOI: 10.7150/thno.29617
33. Chester C., Sanmamed M.F., Wang J., Melero I. Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. Blood 2018;131(1):49–57. DOI: 10.1182/blood-2017-06-741041
34. Kohrt H.E., Houot R., Weiskopf K. et al. Stimulation of natural killer cells with a CD137-specific antibody enhances trastuzumab efficacy in xenotransplant models of breast cancer. J Clin Invest 2019;129(6):2595. DOI: 10.1172/JCI129688
35. Fang J., Chen F., Liu D. et al. Prognostic value of immune checkpoint molecules in breast cancer. Biosci Rep 2020;40(7):BSR20201054. DOI: 10.1042/BSR20201054
36. Yan C., Richmond A. Hiding in the dark: pan-cancer characterization of expression and clinical relevance of CD40 to immune checkpoint blockade therapy. Mol Cancer 2021;20(1):146. DOI: 10.1186/s12943-021-01442-3
37. Petrau C., Cornic M., Bertrand P. et al. CD70: a potential target in breast cancer? J Cancer 2014;5(9):761–4. DOI: 10.7150/jca.10360
38. Rhee D.K., Park S.H., Jang Y.K. Molecular signatures associated with transformation and progression to breast cancer in the isogenic MCF10 model. Genomics 2008;92(6):419–28. DOI: 10.1016/j.ygeno.2008.08.005
39. Teillaud J.L. L'immunothérapie des cancers couronnée avec l'attribution du prix Nobel de Physiologie ou Médecine à James Allison et Tasuku Honjo [Cancer immunotherapy crowned with Nobel Prize in Physiology or Medicine awarded to James Allison and Tasuku Honjo]. Med Sci (Paris) 2019;35(4):365–6. DOI: 10.1051/medsci/2019073
40. Ai L., Xu A., Xu J. Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond. Adv Exp Med Biol 2020;1248:33–59. PMID: 32185706. DOI: 10.1007/978-981-15-3266-5_3
41. Schütz F., Stefanovic S., Mayer L. et al. PD-1/PD-L1 pathway in breast cancer. Oncol Res Treat 2017;40(5):294–7. DOI: 10.1159/000464353

42. Sun W.Y., Lee Y.K., Koo J.S. Expression of PD-L1 in triple-negative breast cancer based on different immunohistochemical antibodies. J Transl Med 2016;14(1):173. DOI: 10.1186/s12967-016-0925-6
43. Vranic S., Cyprian F.S., Gatalica Z., Palazzo J. PD-L1 status in breast cancer: Current view and perspectives. Semin Cancer Biol 2021;72:146–54. PMID: 31883913. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.12.003
44. Zhang H., Mi J., Xin Q. et al. Recent research and clinical progress of CTLA-4-based immunotherapy for breast cancer. Front Oncol 2023;4;13:1256360. PMID: 37860188. DOI: 10.3389/fonc.2023.1256360.
45. Triebel F., Jitsukawa S., Baixeras E. et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. J Exp Med 1990;171(5):1393–405. DOI: 10.1084/jem.171.5.1393
46. Chocarro L., Blanco E., Zuazo M. et al. Understanding LAG-3 signaling. Int J Mol Sci 2021;22(10):5282. DOI: 10.3390/ijms22105282
47. Liu Q., Qi Y., Zhai J. et al. Molecular and clinical characterization of LAG3 in breast cancer through 2994 samples. Front Immunol 2021;12:599207. DOI: 10.3389/fimmu.2021.599207
48. Burugu S., Gao D., Leung S. et al. LAG-3+ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: clinical correlates and association with PD-1/PD-L1+ tumors. Ann Oncol 2017;28(12):2977–84. DOI: 10.1093/annonc/mdx557
49. Zeidan A.M., Komrokji R.S., Brunner A.M. TIM-3 pathway dysregulation and targeting in cancer. Expert Rev Anticancer Ther 2021;21(5):523–34. DOI: 10.1080/14737140.2021.1865814
50. Yasinska I.M., Sakhnevych S.S., Pavlova L. et al. The Tim-3-Galectin-9 pathway and its regulatory mechanisms in human breast cancer. Front Immunol 2019;10:1594. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01594
51. Solinas C., Garaud S., De Silva P. et al. Immune checkpoint molecules on tumor-infiltrating lymphocytes and their association with tertiary lymphoid structures in human breast cancer. Front Immunol 2017;8:1412. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01412
52. Cong Y., Liu J., Chen G., Qiao G. The emerging role of T-CELL immunoglobulin mucin-3 in breast cancer: a promising target for immunotherapy. Front Oncol 2021;11:723238. DOI: 10.3389/fonc.2021.723238
53. Tu L., Guan R., Yang H. et al. Assessment of the expression of the immune checkpoint molecules PD-1, CTLA4, TIM-3 and LAG-3 across different cancers in relation to treatment response, tumor-infiltrating immune cells and survival. Int J Cancer 2020;147(2):423–39. DOI: 10.1002/ijc.32785
54. Burugu S., Gao D., Leung S. et al. TIM-3 expression in breast cancer. Oncoimmunology 2018;7(11):e1502128. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1502128
55. Ашрафян Л.А., Белокриницкая Т.Е., Каюкова Е.В. и др. Локальный уровень белков контрольных точек иммунного цикла у больных раком шейки матки. Забайкальский медицинский вестник 2021;4:11–20. Ashrafyan L.A., Belokrinitskaya T.E., Kayukova E.V. et al. The local level of checkpoint proteins of the immune cycle in patients with cervical cancer. Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik = Transbaikal Medical Bulletin 2021;4:11–20. (In Russ.).
56. Peyraud F., Guegan J.P., Bodet D. et al. Targeting tryptophan catabolism in the era of cancer immunotherapy: challenges and perspectives. Front Immunol 2022;13:807271. DOI: 10.3389/fimmu.2022.807271
57. León-Letelier R.A., Dou R., Vykoukal J. et al. The kynurenine pathway presents multi-faceted metabolic vulnerabilities in cancer. Front Oncol 2023;13:1256769. DOI: 10.3389/fonc.2023.1256769
58. Soliman H., Rawal B., Fulp J. et al. Analysis of indoleamine 2-3 dioxygenase (IDO1) expression in breast cancer tissue by immunohistochemistry. Cancer Immunol Immunother 2013;62(5):829–37. DOI: 10.1007/s00262-013-1393-y
59. Isla Larrain M.T., Rabassa M.E., Lacunza E. et al. IDO is highly expressed in breast cancer and breast cancer-derived circulating microvesicles and associated to aggressive types of tumors by in silico analysis. Tumour Biol 2014;35(7):6511–9. DOI: 10.1007/s13277-014-1859-3
60. Alkhayyal N., Elemam N.M., Hussein A. et al. Expression of immune checkpoints (PD-L1 and IDO) and tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer. Heliyon 2022;8(9):e10482. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e10482

Вклад авторов
Е.В. Каюкова: научное редактирование, написание текста статьи;
Э.С. Болотов: написание текста статьи, обзор литературы по теме статьи.
Authors' contributions
E.V. Kayukova: scientific editing, article writing;
E.S. Bolotov: article writing, review of the literature on the topic of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors
Е.В. Каюкова / E.V. Kayukova: https://orcid.org/0000-0002-4682-1811
Э.С. Болотов / E.S. Bolotov: https://orcid.org/0009-0003-0622-5323

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

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

Статья поступила: 29.11.2023. **Принята к публикации:** 26.07.2024. **Опубликована онлайн:** 09.10.2024.
Article submitted: 29.11.2023. **Accepted for publication:** 26.07.2024. **Published online:** 09.10.2024.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-32-40

BY 4.0

Молекулярно-генетический и биохимический профили злокачественных новообразований на фоне беременности

А.Л. Чернышова[1, 2], А.А. Черняков[3], Ю.М. Трущук[3], Н.В. Юнусова[3, 4], Н.В. Севостьянова[4], Я.И. Архипова[4], О.С. Диль[1], А.Е. Чернышова[5]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России; Россия, 630055 Новосибирск, ул. Речкуновская, 15;
[2]ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 630091 Новосибирск, Красный пр-кт, 52;
[3]Научно-исследовательский институт онкологии ФГНУ «Томский национальный медицинский исследовательский центр Российской академии наук»; Россия, 634009 Томск, пер. Кооперативный, 5;
[4]ФГБУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2;
[5]ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; Россия, 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

Контакты: Алена Леонидовна Чернышова *alacher@list.ru*

В статье представлен обзор современных данных литературы о молекулярно-генетических и биохимических профилях злокачественных новообразований различных локализаций. Показано, что молекулярно-генетический и транскрипционный профили злокачественных опухолей, ассоциированных с беременностью, являются системами, включающими различные компоненты, многие из которых к настоящему моменту остаются малоизученными. Также рассмотрены морфологические и биохимические особенности плаценты и опухолевой ткани. В последние годы наблюдается повышенный интерес отдельных исследователей и групп ученых к данному вопросу, что, несомненно, в скором времени приведет к более глубокому и четкому пониманию механизмов метастазирования и прогрессирования онкологических заболеваний на фоне беременности. Знание закономерностей нормального эмбриогенеза как процесса внутриутробного развития зародыша в полости матки во время беременности, а также изучение молекулярных основ патогенеза состояний спонтанного прерывания беременности, без сомнения, будут способствовать выявлению новых мишеней и созданию биотерапевтических молекул для лечения рака.

Ключевые слова: рак, беременность, плацента, молекулярно-генетический фактор, биохимический маркер, прогноз

Для цитирования: Чернышова А.Л., Черняков А.А., Трущук Ю.М. и др. Молекулярно-генетический и биохимический профили злокачественных новообразований на фоне беременности. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(3):32–40.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-32-40

Molecular genetic and biochemical profiles of malignant neoplasms during pregnancy

A.L. Chernyshova[1, 2], A.A. Chernyakov[3], Yu.M. Truschuk[3], N.V. Yunusova[3, 4], N.V. Sevostyanova[4], Ya.I. Arkhipova[4], O.S. Dil[1], A.E. Chernyshova[5]

[1]E.N. Meshalkin National Medical Center, Ministry of Health of Russia; 15 Rechkunovskaya St., Novosibirsk 630055, Russia;
[2]Novosibirsk State Medical University, Ministry of Health of Russia; 52 Krasnyy Prospekt, Novosibirsk 630091, Russia;
[3]Scientific Research Institute of Oncology, Tomsk National Medical Research Center, Russian Academy of Sciences; 5 Kooperativnyy Pereulok, Tomsk 634009, Russia;
[4]Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moskovskiy Trakt, Tomsk 634050, Russia;
[5]Saint-Petersburg State University; 7/9 Universitetskaya Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

Contacts: Elena Leonidovna Chernyshova *alacher@list.ru*

The article presents a review of modern literature data on molecular-genetic and biochemical profiles of malignant tumors of varying locations. It is shown that molecular-genetic and transcription profiles of pregnancy-associated malignant tumors are systems consisting of various components, many of which remain poorly researched. Additionally, morphological

and biochemical characteristics of the placenta and tumor tissue are discussed. In the recent years, individual researchers and research groups have demonstrated heightened interests in this problem which undoubtedly soon will lead to a deeper and stronger understanding of mechanisms of progression and metastasis of oncological diseases during pregnancy. The knowledge of the principles of normal embryogenesis as a process of intrauterine development of a fetus, as well as investigation of molecular basis of pathogenesis of spontaneous abortion will undoubtedly help in determination of new targets and development of new therapeutical molecules for cancer treatment.

Keywords: cancer, pregnancy, placenta, molecular genetic factor, biochemical marker, prognosiss

For citation: Chernyshova A.L., Chernyakov A.A., Truschuk Yu.M. et al. Molecular genetic and biochemical profiles of malignant neoplasms during pregnancy. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(3):32–40. (In Russ.).

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-32-40

ВВЕДЕНИЕ

Беременность, как и любое другое состояние организма, характеризуется естественными физиологическими сдвигами во многих органах и системах. В период гестации происходят качественные и количественные изменения гормонального фона. В то же время четко прослеживается взаимосвязь риска возникновения различных видов злокачественных новообразований (ЗНО) во время беременности. В последнее время ученых все больше интересует транскрипционный профиль опухолевых клеток в организме беременной женщины, а также другие молекулярно-генетические факторы.

СХОДСТВО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ И БЕРЕМЕННОСТИ

Несмотря на то что на первый взгляд беременность и онкологические заболевания являются довольно разнородными и не связанными друг с другом процессами, между ними есть немало общего. Особый интерес представляют механизмы плацентации и метастазирования. Первые работы, в которых детально описаны сходства опухолевой ткани и плаценты, были опубликованы в прошлом десятилетии [1–3].

На биохимическом уровне их общность объясняется следующим.

Во-первых, как ЗНО, так и плаценту можно рассматривать в качестве персистирующего повреждения, которое длительно не заживает. Фактор проницаемости сосудов (VPF) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) инициируют последовательность событий в опухолях, ранах, плацентарном микроокружении, которая включает повышенную проницаемость сосудов, экстравазацию плазмы, фибриногена и других белков плазмы, активацию системы свертывания крови вне сосудистой системы, отложение внесосудистого фибринового геля, который служит временной стромой и благоприятным матриксом для миграции клеток, индукцию ангиогенеза, последующую деградацию фибрина и его замещение грануляционной тканью и, наконец, резорбцию сосудов и синтез коллагена, приводящие к образованию плотной волокнистой соединительной ткани при ранах и так называемой десмоплазии при раке. Аналогичная последовательность событий наблюдается при множестве воспалительных заболеваний, которые включают клеточный иммунитет [4, 5].

Во-вторых, клеточные популяции трофобласта и раковые клетки обладают способностью ускользать от иммунологического надзора, а также способны проникать в окружающую их строму. Общеизвестно, что опухолевые клетки экспрессируют лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1), который взаимодействует с этим рецептором на Т-лимфоцитах. Данный механизм способствует выживаемости опухолевых клеток в условиях иммунного окружения [6, 7]. Результаты недавних исследований показали, что во время деления опухолевые клетки секретируют трансформирующий фактор роста β (TGF-β), простагландин E2 (PGE2), индоламин 2,3-диоксигеназу (IDO) и интерлейкин 10 (IL-10) для ингибирования цитотоксичности NK-клеток (NK – естественные киллеры) [8–10]. Если говорить о механизмах физиологической иммуносупрессии, используемых трофобластами, то прежде всего следует упомянуть об инвазивных вневорсинчатых трофобластах (EVT), а также об экспрессируемым ими уникальном паттерне молекул HLA-C класса IA и неклассических молекул HLA класса Ib, а также HLA-E, HLA-F и HLA-G (HLA – человеческие лейкоцитарные антигены) [11]. Антигены HLA-G, HLA-C и HLA-F экспрессируются EVT в I триместре беременности; по мере ее продолжения их экспрессия ослабевает. Антиген HLA-E экспрессируется EVT только в I триместре [12]. Антигены HLA-G и HLA-E подавляют иммунные реакции, взаимодействуя с рецепторами, ингибирующими лейкоциты, а именно иммуноглобулиноподобными лейкоцитарными рецепторами (LILR) на макрофагах и NK-клетках, и с рецепторами Т-клеток на $CD8^+$-клетках. В результате этих взаимодействий киллерные функции NK-клеток и макрофагов ослабевают [13]. Инвазивные EVT способствуют превращению антигенпрезентирующих клеток в толерогенные децидуальные NK-клетки, которые секретируют IL-10 и способствуют индукции сниженного иммунного ответа, что свидетельствует о некоторой

общности иммуносупрессивных механизмов опухолевых клеток и трофобласта [14, 15].

В-третьих, как в процессе плацентации, так и при злокачественном росте клетки проникают в окружающую их строму. В случае беременности основными молекулами, контролирующими данный процесс, являются инсулиноподобные факторы роста 1 (IGF-1) и 2 (IGF-2), IL-1β, -6, -8, а также многие другие. Они опосредуют прикрепление к базальной мембране путем связывания с ее компонентами по большей части с ламинином, отделение от матрицы базальной мембраны до ее проникновения и разрушение компонентов базальной мембраны производными трофобласта с помощью металлопротеазы и сериновых протеаз [16, 17]. При ЗНО основным объектом изучения в настоящее время является рецептор активированной С-киназы 1 (RACK1). Результаты ряда исследований продемонстрировали, что при некоторых онкологических заболеваниях его экспрессия связана с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП), что в значительной степени способствует клеточной инвазии и приводит к распространению опухолевых клеток. RACK1 интегрирует также передачу сигналов между рецептором IGF-1 и интегрином β1 путем образования сигнального комплекса, который содержит оба рецептора, а также другие сигнальные молекулы, способствующие миграции [18].

Чтобы плацента могла адекватно выполнять свою функцию поддержки роста эмбриона и в последующем плода, трофобласты должны надлежащим образом проникать в эндометрий и реконструировать спиральные артерии в нем. Этот процесс напоминает экстра- и интравазационный компоненты метастазирования ЗНО. Таким образом, неудивительно, что плацентация и онкогенез имеют некоторые общие физиологические характеристики, которые можно наблюдать на генетическом и эпигенетическом уровнях. Однако существуют и различия. Наиболее важное из них заключается в том, что инвазия трофобластов регулируется в пространстве и времени. Главенствующая роль в данном случае принадлежит децидуальным NK-клеткам, секретирующим интерферон γ (IFN-γ), который ограничивает миграцию трофобласта в эндометрий. Ингибирующий эффект IFN-γ происходит за счет снижения экспрессии матриксных металлопротеиназ 2 (MMP-2) и 9 (MMP-9) [19, 20].

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕННЫХ МОЛЕКУЛ И СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ

В последние годы появляется все больше исследований, в которых определенная молекула, признанная важной для поведения и функционирования опухолевых клеток, впоследствии оказывалась связанной с функционированием трофобластов и гестационными заболеваниями [21–33].

Избыточная экспрессия усилителя белка гомолога цесте 2 (EZH2) (гистонметилтрансферазы) связана с агрессивностью некоторых видов рака. В плаценте он индуцирует трофобластическую инвазию и обнаруживается в сниженных концентрациях в плаценте при повторных выкидышах [23]. Количество белков, ремоделирующих хроматин, а именно гистонодеацетилаз (HDACs), значительно увеличивается при различных видах рака у человека и способствует их прогрессированию. Одна из таких деацетилаз – HDAC9 – вызывает миграцию и инвазию клеток трофобласта путем ингибирования экспрессии TIMP3 (тканевого ингибитора металлопротеиназ 3) посредством гипоацетилирования ее промоторного гистона. В преэкламптических плацентах экспрессия HDAC9 также была снижена [24].

Уридиндифосфат (UDP)-GalNAc трансфераза 3 (GALNT3), инициирующая гликозилирование многих белков (включая Е-кадгерин) в аппарате Гольджи, обладает защитной функцией в трофобласте, его стволовых клетках, бластоцистах и эпителиальных клетках молочной железы человека. Считается, что в эпителиальных клетках молочной железы человека GALNT3 сохраняет эпителиальный фенотип, поскольку потеря его экспрессии снижает гликозилирование и экспрессию Е-кадгерина, индуцирует ЭМП и ассоциирована с более агрессивным течением рака [25].

МикроРНК Let-7 ингибируют пролиферацию и инвазию при многих видах рака (раке толстой кишки, легкого, желудка, поджелудочной железы, яичников, предстательной железы, меланомы, гепатоцеллюлярном раке) и оказывают аналогичное действие на клетки трофобласта. Снижение экспрессии Let-7 приводит к усилению пролиферации, миграции и инвазии EVTs посредством усиления регуляции белка MDM4, который действует как инактиватор белка p53. В преэкламптических плацентах отмечено снижение уровня микроРНК Let-7, а также металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9 и их ингибиторов [26]. В отличие от микроРНК Let-7, микроРНК 34a-5p уменьшает миграцию и инвазию трофобластов через Smad4 (медиатор передачи сигнала TGF-β), который связан с инвазивностью и метастазированием. Снижение содержания микроРНК 34a-5p стимулирует инвазию и миграцию трофобластов, повышая уровни Smad4 [27].

Важно не только то, какие ткани или клетки проникают в ткани-мишени, но и где происходит данный процесс и какой тип связи существует между инвазивными тканями и тканями-мишенями. Многие исследователи отмечают приобретение злокачественными опухолевыми клетками фенотипических и функциональных признаков трофобласта, таких как аутокринный рост, метаболизм посредством адаптивных ферментативных путей, способность выживать в экстремальных условиях, антиапоптотические факторы, скрытые мезенхимальные признаки, амебоидное движение, экспрессия

мезенхимных маркеров, образование гигантских клеток, ацитокинетическая репликация ДНК, изменения в организме хозяина (ангиогенез), иммунологическая толерантность и секреция хорионического гонадотропина человека β (β-ХГЧ) [28].

Ключевую роль в успешной плацентации играет клеточный столбик закрепляющихся ворсинок, где эпителиальные клетки трофобластов (расположенных в проксимальном отделе хориона) дифференцируются в дистальные инвазивные и мигрирующие клетки мезенхимального фенотипа [30].

В ноябре 2022 г. опубликована статья, в которой описано протективное влияние беременности в отношении рака эндометрия и яичников. Традиционно считается, что у многородящих женщин наблюдается не только снижение частоты развития рака эндометрия и яичников, но и отсрочка дебюта данных патологий [34]. Эти данные с конца 1990-х годов неоднократно подтверждались результатами эпидемиологических исследований [35, 36].

Механизм, лежащий в основе взаимосвязи многоплодия и защиты от рака яичников и эндометрия, обусловлен отсутствием овуляции и изменением баланса половых гормонов при снижении уровня эстрогена и повышении уровня прогестерона во время беременности. Общепризнано, что длительная стимуляция эстрогеном без противодействия прогестерону является наиболее распространенным фактором риска развития эстрогензависимого рака. Например, у женщин в постменопаузе, которые когда-либо получали эстрогенотерапию, наблюдается больший относительный риск развития рака эндометрия, чем у женщин, которые никогда не принимали экзогенный эстроген. Кроме того, риск развития рака яичников у женщин в постменопаузе значительно увеличивает использование заместительной гормональной терапии на основе эстрогенов [37].

Однако, как оказалось, истинные механизмы онкосупрессии опосредованы в том числе и фетальными антигенами. Существуют определенные белки, которые высвобождаются во время беременности в материнский кровоток из клеток плаценты/плода. Они аналогичны белкам, содержащимся в некоторых раковых клетках. Считается, что эти антигены плода стимулируют иммунную систему матери для выработки долговременной защиты или естественной иммунизации против опухолей, экспрессирующих те же антигены. В исследовании C. Main и соавт. обнаружено, что в сыворотке крови неоднократно рожавших женщин содержатся перекрестно реагирующие антитела, которые распознают множественные белки, экспрессируемые опухолями яичников. Два из них – эукариотический фактор элонгации 1-α-1 (eEF1α1) и нуклеофозмин – обычно экспрессируются клеточными линиями рака яичников. Данные белки играют большую роль в росте клеток. Это позволило предположить, что антитела, вырабатываемые иммунной системой матери в ответ на беременность, могут предотвращать рост злокачественных клеток, экспрессирующих данные антигены [38]. Результаты данного исследования показали, что уникальное перекрестное взаимодействие, возникающее между плодом/плацентой и иммунной системой матери для облегчения выживания фетального аллотрансплантата, может способствовать снижению риска развития рака яичников, эндометрия и, возможно, других видов рака, наблюдаемых у женщин после беременности.

Ассоциированный с беременностью протеин А плазмы (PAPP-A) относится к цинксодержащим ферментам (металлопротеиназам). Во время беременности он в больших количествах вырабатывается фибробластами в наружном слое плаценты и децидуальной оболочке и обнаруживается в материнском кровотоке в виде высокомолекулярной белковой фракции. Данный фермент расщепляет и инактивирует белки, связывающие инсулиноподобные факторы роста 4 (IGFBP-4) и 5 (IGFBP-5), для увеличения локальной концентрации лиганда IGF, доступного для связывания с IGF-1R. Его содержание в крови увеличивается с развитием беременности. Оно существенно не зависит от таких параметров, как пол и масса тела ребенка.

При хромосомной аномалии с пороками развития плода концентрация PAPP-A в крови значительно уменьшается с 8-й по 14-ю неделю беременности. Наиболее резкое ее снижение отмечается при трисомиях по 21-й, 18-й и 13-й хромосомам. При синдроме Дауна показатель PAPP-A на порядок ниже, чем в норме. Еще более резко уровень PAPP-A в сыворотке крови матери падает при наличии у плода генетической патологии с множественными пороками развития. Известно, что ингибирование этого белка, связанного с беременностью, – первичного активатора пути IGF – повышает чувствительность к химиотерапии на основе платины [39, 40].

Значение эстрогенов в развитии различных онкологических патологий неоднократно и убедительно показано в первую очередь для рака молочной железы, эндометрия, яичников, а также множества других патологий [41–43]. Однако наиболее любопытным в отношении канцерогенеза является участие β-ХГЧ, которому в последнее время отводят главенствующую роль в этом процессе. Недавно показано, что его повышенные уровни в сыворотке крови, моче или ткани опухоли коррелируют с плохим прогнозом, агрессивностью и устойчивостью к терапии при различных опухолях, таких как рак мочевого пузыря, толстой кишки, легкого и яичек. Более того, β-ХГЧ также эктопически экспрессируется при многочисленных ЗНО женской репродуктивной системы, таких как рак яичников, карцинома эндометрия и шейки матки [41–44].

Определение роли β-ХГЧ в регуляции пролиферации опухоли все еще остается актуальным. Некоторые ученые подтвердили, что он способствует пролиферации в нетрофобластных солидных опухолях, таких как

карцинома мочевого пузыря, аденома гипофиза, хориокарцинома и рак эндометрия [45]. Ряд исследователей, напротив, утверждают, что β-ХГЧ значительно подавляет жизнеспособность клеток рака молочной железы *in vitro*, ингибирует рост опухоли и ослабляет образование опухолевых сосудов *in vivo* [46]. Кроме того, подтверждено, что β-ХГЧ не оказывает влияния на пролиферацию клеток колоректального рака [46, 47]. Получены также данные о том, что β-ХГЧ способствует пролиферации и прогрессированию клеточного цикла, ослабляет апоптоз и благоприятствует канцерогенезу в поверхностных эпителиальных клетках [48]. Есть также сведения о том, что β-ХГЧ имеет структуру цистеинового узла; эта структура схожа со структурой TGF-β и, таким образом, по-видимому, может активировать соответствующие рецепторы и, как следствие, опосредованно влиять на канцерогенез в соответствии с описанными ранее механизмами [33, 49].

Сигнальный путь ERK (внеклеточная сигнал-регулируемая киназа)/MMP-2 является одним из ключевых триггеров метастазирования при онкологических заболеваниях [50, 51]. При стимуляции ERK превращается в фосфорилированную ERK, затем активируются и транслируются активатор протеина 1 (AP-1) и промотор ERK-нижестоящих целевых MMPs. Как следствие, внеклеточный матрикс претерпевает деградацию, и постепенно обеспечивается необходимое внеклеточное микроокружение для метастазирования опухолевых клеток. Данный механизм наиболее хорошо изучен на примере рака молочной железы, желчевыводящих путей и предстательной железы [52–55].

Повсеместно экспрессируемый цитокин TGF-β является, пожалуй, в наиболее полной мере охарактеризованным промотором ЭМП. Активирующие лиганды TGF-β инициируют передачу сигналов, а тесно связанные с этим процессом Smad-зависимые пути, включая фосфоинозитид-3-киназу (PI3K)/Akt, и различные ферменты, такие как киназа фокальной адгезии (FAK), митоген-активируемая протеинкиназа p38 (p38 MAPK) и внеклеточная сигнал-регулируемая киназа (ERK), играют большую роль в ЭМП [56]. Во время ЭМП эпителиальные клетки реорганизуют свой цитоскелет, устраняют межклеточные соединения и нивелируют экспрессию эпителиальных маркеров, в том числе мезенхимальных генов, кодирующих такие белки, как E-кадгерин, виментин, N-кадгерин, β-катенин, клаудин, ZO-1 и др. [57]. Обнаружено, что избыточная экспрессия β-ХГЧ в клеточных линиях рака яичников индуцировала морфологические изменения эпителиальных раковых клеток с тесно расположенных на более свободно расположенные. Это демонстрирует, что β-ХГЧ играет большую роль в регуляции экспрессии генов, связанных с ЭМП [58].

Ключевую роль в ангиогенном процессе играют представители семейства VEGF, в частности фактор роста эндотелия сосудов A (VEGF-A) и плацентарный фактор роста (PlGF), которые могут высвобождаться самой опухолевой клеткой. Фактор роста эндотелия сосудов A взаимодействует с двумя мембранными рецепторами: VEGFR-1 и VEGFR-2. Плацентарный фактор роста связывается только с VEGFR-1, способствуя миграции, пролиферации и выживанию эндотелиальных клеток. При многих ЗНО человека, включая рак молочной железы, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточные опухоли головы и шеи, рак предстательной железы, яичников, толстой кишки, мочевого пузыря, а также гемобластозы, показана высокая белковая экспрессия VEGFR-1. При раке молочной железы и немелкоклеточном раке легкого ранней стадии она была связана с более низкими показателями выживаемости.

Плацентарный фактор роста по своей структуре является гликопротеином, вырабатываемым эндотелиоцитами сосудов в различных тканях и органах. Он выступает одним из важнейших регуляторов формирования плаценты и васкуляризации ее ворсин. Основными функциями PlGF являются обеспечение ангиогенеза – процесса образования новых сосудов во время эмбрионального развития, стимуляция развития коллатерального кровообращения при сосудистых патологиях, а также ангиогенез, ассоциированный с опухолевыми процессами. Экспрессия PlGF повышена при нескольких типах рака человека и связана с плохим прогнозом. Плацентарный фактор роста способен передавать свои сигналы посредством фосфорилирования остатков тирозина в VEGFR-1. Более того, PlGF способствует инвазии опухолевых клеток в экстрацеллюлярный матрикс и усиливает активность отдельных MMPs, что увеличивает метастатический потенциал ЗНО [59].

Логично, что должны присутствовать противодействующие ангиогенезу агенты. Во многих зарубежных и отечественных исследованиях прослеживается прямая зависимость между осложненным преэклампсией течением беременности и высокой экспрессией антиангиогенных факторов [41, 52, 60].

Для нормального протекания беременности необходим баланс между уже упомянутыми выше проангиогенными факторами (VEGF, PlGF) и антиангиогенными факторами (растворимыми fms-подобной тирозинкиназой 1 (sFlt1) и эндоглином (sEng)). Растворимая fms-подобная тирозинкиназа 1 – белок, способный связывать VEGF и PlGF, лимитируя при этом их биодоступность и проявляя, таким образом, упомянутый выше антиангиогенный эффект. Что касается sEng, то он действует как ингибитор ангиогенеза, конкурирущий по действию с TGF-β, что приводит к нарушению формирования капилляров эндотелиальными клетками.

Дисбаланс в отношении факторов антиангиогенеза способствует появлению преэклампсии. Уровни антиангиогенных факторов повышаются и достигают более высоких значений при беременности, отягощенной этой патологией (особенно при ранней тяжелой преэклампсии), чем при нормальной беременности. Ряд исследователей отмечают факт длительной персистенции

антиангиогенных факторов в организме матери, что может в теории значимо снизить риск возникновения многих видов ЗНО [61, 62]. Сравнительно недавно авторы из Дании опубликовали работу, в которой сравнивался риск возникновения солидных опухолей у женщин с преэклампсией в анамнезе и у женщин с нормально протекающей беременностью. Оказалось, что в группе пациенток с осложненной беременностью риск развития солидных опухолей был значимо ниже. Помимо этого установлено, что степень выраженности преэклампсии не коррелирует с уменьшением такого риска. Иными словами, протективный эффект проявляется при преэклампсии любой степени тяжести и остается одинаковым в течение длительного времени [63].

Говоря о связи преэклампсии с ЗНО в период гестации, уместно также упомянуть и о нейрокининах, изучению которых уделяется крайне пристальное внимание. У женщин с преэклампсией обнаруживаются значительно повышенные уровни нейрокинина B (NKB) в периферической и пуповинной крови. Этот нейропептид обеспечивает правильное функционирование женского организма во время беременности благодаря его существенной роли в регуляции притока крови к плаценте. Нейрокинин B принадлежит к семейству нейропептидов тахикининов, в которое также входят нейрокинин A (NKA) и субстанция P (SP). Они взаимодействуют с рецепторами нейрокинина 1 (NK1R), 2 (NK2R) и 3 (NK3R) [64]. При преэклампсии пептиды, связанные с геном тахикинина, идентифицированы как факторы, секретируемые в избыточных количествах из плаценты. Нейрокинины и их рецепторы также важны в процессе канцерогенеза. Показано, что высокая экспрессия гена *NK2R* коррелирует с низкими показателями выживаемости пациентов с колоректальным раком, а введение антагониста NK2R вызывает ингибирование онкогенеза [65, 66]. Кроме того, полиморфизм NK2R предсказывает метастазирование в лимфатические узлы у пациентов с колоректальным раком [67]. Рецептор нейрокинина 1 сверхэкспрессируется в опухолях и благодаря связыванию с SP активирует пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез и миграцию опухолевых клеток для инвазии и метастазирования. Более того, NK1R способствует прогрессированию немелкоклеточного рака легкого посредством трансактивации рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) [68].

Интерес к иммунологии беременности был вызван осознанием того, что экспрессия чужеродных антигенов плодом и плацентой должна вызывать реакцию отторжения тканей, подобную той, которая наблюдается после трансплантации органов. Аминопептидаза 2 эндоплазматического ретикулума (ERAP2) нейтрализует пептиды, связывающие HLA класса I, определяя пептидный репертуар, представленный для иммунного распознавания. Изменение аминокислотной последовательности ERAP2 напрямую влияет на способность плода и опухолей избегать иммунного ответа материнского организма. Дефицит ERAP2 может способствовать уклонению опухолевых клеток от иммунологического надзора *in vivo*. Потеря этого белка наблюдалась при раке почек, аденокарциноме толстой кишки, меланоме и раке яичников, что позволяет предположить, что недостаток ERAP2 способствует росту и/или поддержанию злокачественной опухоли [69]. Раковые клетки могут избежать индукции иммунного ответа с помощью ингибирования транспорта опухолевого антигена в эндоплазматический ретикулум (ЭР), неправильной обрезки пептидов в ЭР или неадекватной презентации пептида молекуле HLA [70].

Особое внимание на протяжении нескольких десятков лет уделяется также галектинам (GALs), представляющим семейство эволюционно сохраненных лектинов, которые преимущественно связываются с содержащими β-галактозу гликоконъюгатами через свои домены распознавания углеводов, состоящие примерно из 130 аминокислот. У людей идентифицированы 12 GALs. Сегодня опубликованы тысячи исследований о роли GALs в развитии рака. Они модулируют прогрессирование опухоли (положительно или отрицательно), проявляя свою внеклеточную активность на двух основных уровнях. Усиление канцерогенеза основано на их врожденной способности регулировать иммунный ответ, нейтрализуя или функцию иммунных клеток, оказывающих цитотоксическое действие на клетки опухоли, или факторы, которые привлекают иммунные клетки в микроокружение опухоли [71–73]. Галектины также могут способствовать прогрессированию рака с помощью других механизмов, в первую очередь путем связывания с растворимыми гликозилированными иммунными медиаторами. Типичным примером этого является способность GAL-3 нейтрализовывать активность IFN-γ и других цитокинов, которые благоприятствуют миграции и инфильтрации иммунных клеток в опухолевый очаг [73, 74]. Еще один механизм проопухолевой активности GALs заключается в их действии на гликорецепторы клеточной поверхности или мембран опухолевых клеток. Это достигается с помощью множества внутриклеточных механизмов, таких как формирование устойчивости к лекарственно-индуцированной гибели раковых клеток, активация инвазивного поведения раковых клеток, индуцирование генов, стимулирующих опухоль, или увеличение скорости пролиферации раковых клеток [75]. Так, показано, что связывание GAL-1 с рецепторами VEGF может преодолеть устойчивость клеток опухоли к ангиогенным ингибиторам [76].

Концепция плацентарных GALs (также известных как кластерные галектины Chr19) появилась много лет назад. Ее суть заключается в том, что GAL-13 (плацентарный белок 13, или PP13), -14 и -16 расположены в кластере генов на 19-й хромосоме и преимущественно экспрессируются плацентой. Транскрипты, коди-

рующие GAL-16, обнаружены при многих типах рака, включая рак молочной железы, яичников, легкого и уротелия. В ходе анализа частоты развития опухолей, экспрессирующих GAL-13, обнаружено повышение его уровня почти у 50 % пациенток с раком щитовидной железы. При раке молочной железы примерно у 40 % больных отмечена экспрессия GAL-13, в то время как экспрессия GAL-16 выявлена в очень небольшом числе случаев. Однако у пациенток с положительным GAL-16-статусом уровни экспрессии данного маркера оказались значительно более высокими. Одним из наиболее поразительных результатов было то, что почти у 75 % больных раком легкого отмечена экспрессия GAL-14 [77]. Исходя из полученных данных, исследователи указывают на высокий риск агрессивного течения и, соответственно, прогрессирования различных видов ЗНО, экспрессирующих определенные GALs, в период гестации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, молекулярно-генетический и транскрипционный профили злокачественных опухолей, ассоциированных с беременностью, являются системами, включающими различные компоненты, многие из которых к настоящему моменту остаются малоизученными. В последние годы наблюдается повышенный интерес отдельных исследователей и групп ученых к данному вопросу, что, несомненно, в скором времени приведет к более глубокому и четкому пониманию механизмов метастазирования и прогрессирования онкологических заболеваний на фоне беременности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Louwen F., Muschol-Steinmetz C., Reinhard J. et al. A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in preeclampsia. Oncotarget 2012;3(8):759–73. DOI: 10.18632/oncotarget.595
2. Costanzo V., Bardelli A., Siena S., Abrignani S. Exploring the links between cancer and placenta development. Open Biol 2018;8(6):180081. DOI: 10.1098/rsob.180081
3. Novakovic B., Saffery R. Placental pseudo-malignancy from a DNA methylation perspective: unanswered questions and future directions. Front Genet 2013;4:285. DOI: 10.3389/fgene.2013.00285
4. Dvorak H.F. Tumors: wounds that do not heal-redux. Cancer Immunol Res 2015; 3(1):1–11. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0209
5. Nancy P., Siewiera J., Rizzuto G. et al. H3K27me3 dynamics dictate evolving uterine states in pregnancy and parturition. J Clin Investig 2018;128(1):233–47. DOI: 10.1172/JCI95937
6. Daassi D., Mahoney K.M., Freeman G.J. The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion. Nat Rev Immunol 2020;20(4):209–15. DOI: 10.1038/s41577-019-0264-y
7. Kornepati A.V.R., Vadlamudi R.K., Curiel T.J. Programmed death ligand 1 signals in cancer cells. Nat Rev Cancer 2022;22(3):174–89. DOI: 10.1038/s41568-021-00431-4
8. Ge Z., Wu S., Zhang Z., Ding S. Mechanism of tumor cells escaping from immune surveillance of NK cells. Immunopharmacol Immunotoxicol 2020;42(3):187–98. DOI: 10.1080/08923973.2020.1742733
9. López-Soto A., Gonzalez S., Smyth M.J., Galluzzi L. Control of metastasis by NK cells. Cancer Cell 2017;32(2):135–54. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.06.009
10. Mohme M., Riethdorf S., Pantel K. Circulating and disseminated tumour cells – mechanisms of immune surveillance and escape. Nat Rev Clin Oncol 2017;14(3):155–67. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.144
11. Ferreira L.M.R., Meissner T.B., Tilburgs T., Strominger J.L. HLA-G: at the interface of maternal-fetal tolerance. Trends Immunol 2017;384:272–86. DOI: 10.1016/j.it.2017.01.009
12. Hackmon R., Pinnaduwage L., Zhang J. et al. Definitive class I human leukocyte antigen expression in gestational placentation: HLA-F, HLA-E, HLA-C, and HLA-G in extravillous trophoblast invasion on placentation, pregnancy, and parturition. Am J Reprod Immunol 2017;77(6). DOI: 10.1111/aji.12643
13. Yang F., Zheng Q., Jin L. Dynamic function and composition changes of immune cells during normal and pathological pregnancy at the maternal-fetal interface. Front Immunol 2019;10:2317. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02317
14. Gregori S., Amodio G., Quattrone F., Panina-Bordignon P. HLA-G orchestrates the early interaction of human trophoblasts with the maternal niche. Front Immunol 2015;6:128. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00128
15. Xu L., Li Y., Sang Y. et al. Crosstalk between trophoblasts and decidual immune cells: the cornerstone of maternal-fetal immunotolerance. Front Immunol 2021;12:642392. DOI: 10.3389/fimmu.2021.642392
16. Soares M.J., Varberg K.M., Iqbal K. Hemochorial placentation: development, function, and adaptations. Biol Reprod 2018;99(1):196–211. DOI: 10.1093/biolre/ioy049
17. Wagner G.P., Kshitiz, Dighe A., Levchenko A. The coevolution of placentation and cancer. Annu Rev Anim Biosci 2022;10:259–79. DOI: 10.1146/annurev-animal-020420-031544
18. Duff D., Long A. Roles for RACK1 in cancer cell migration and invasion. Cell Signal 2017;35:250–5. DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.03.005
19. Chen J., Khalil R.A. Matrix metalloproteinases in normal pregnancy and preeclampsia. Prog Mol Biol Transl Sci 2017;148:87–165. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.04.001
20. Fabijanovic D., Serman L. Epigenetic control of cell invasion – the trophoblast model. Biomol Concepts 2012;3(6):487–94. DOI: 10.1515/bmc-2012-0019
21. Kreis N.N., Friemel A., Ritter A. et al. Function of p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in migration and invasion of cancer and trophoblastic cells. Cancers 2019;11(7):989. DOI: 10.3390/cancers11070989
22. Xu Y., Sui L., Qiu B. et al. ANXA4 promotes trophoblast invasion via the PI3K/Akt/eNOS pathway in preeclampsia. Am J Physiol Cell Physiol 2019;316(4):481–91. DOI: 10.1152/ajpcell.00404.2018
23. Lv S., Wang N., Lv H. et al. The attenuation of trophoblast invasion caused by the downregulation of EZH2 is involved in the pathogenesis of human recurrent miscarriage. Mol Ther Nucleic Acids 2019;14:377–87. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.12.011
24. Xie D., Zhu J., Liu Q. et al. Dysregulation of HDAC9 represses trophoblast cell migration and invasion through TIMP3 activation in preeclampsia. Am J Hypertens 2019;32(5):515–23. DOI: 10.1093/ajh/hpz006
25. Raghu D., Mobley R.J., Shendy N.A.M. et al. GALNT3 maintains the epithelial state in trophoblast stem cells. Cell Rep 2019;26(13):3684–97.e7. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.02.093

26. Zhang L., Wang K., Wu Q. et al. Let-7 inhibits the migration and invasion of extravillous trophoblast cell via targeting MDM4. Mol Cell Probes 2019;45:48–56. DOI: 10.1016/j.mcp.2019.05.002
27. Xue F., Yang J., Li Q., Zhou H. Down-regulation of microRNA-34a-5p promotes trophoblast cell migration and invasion via targetting Smad4. Biosci Rep 2019;39(2):BSR20181631. DOI: 10.1042/BSR20181631
28. Piechowski J. Plausibility of trophoblastic-like regulation of cancer tissue. Cancer Manag Res 2019;11:5033–46. DOI: 10.2147/CMAR.S190932
29. Knofler M., Haider S., Saleh L. et al. Human placenta and trophoblast development: Key molecular mechanisms and model systems. Cell Mol Life Sci 2019;76(18):3479–96. DOI: 10.1007/s00018-019-03104-6
30. Davies J.E., Pollheimer J., Yong H.E. et al. Epithelial-mesenchymal transition during extravillous trophoblast differentiation. Cell Adhes Migr 2016;10(3):310–21. DOI: 10.1080/19336918.2016.1170258
31. Gamage T., Schierding W., Hurley D. et al. The role of DNA methylation in human trophoblast differentiation. Epigenetics 2018;13(12):1154–73. DOI: 10.1080/15592294.2018.1549462
32. Pollheimer J., Vondra S., Baltayeva J. et al. Regulation of placental extravillous trophoblasts by the maternal uterine environment. Front Immunol 2018;9:2597. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02597
33. Novakovic B., Stunnenberg H.G. I Remember you: epigenetic priming in epithelial stem cells. Immunity 2017;47(6):1019–21. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.12.005
34. Chen Q., Tong M., Guo F. et al. Parity correlates with the timing of developing endometrial cancer, but not subtype of endometrial cancer. J Cancer 2015;6(11):1087–92. DOI: 10.7150/jca.12736
35. Adami H.O., Hsieh C.C., Lambe M. et al. Parity, age at first childbirth, and risk of ovarian cancer. Lancet 1994;344(8932):1250–4. DOI: 10.1016/s0140-6736(94)90749-8
36. Wentzensen N., Poole E.M., Trabert B. et al. Ovarian cancer risk factors by histologic subtype: an analysis from the ovarian cancer cohort consortium. J Clin Oncol 2016;34(24):2888–98. DOI: 10.1200/JCO.2016.66.8178
37. Troisi R., Bjørge T., Gissler M. et al. The role of pregnancy, perinatal factors and hormones in maternal cancer risk: a review of the evidence. J Intern Med 2018;283(5):430–45. DOI: 10.1111/joim.12747
38. Main C., Chen X., Zhao M. et al. Understanding how pregnancy protects against ovarian and endometrial cancer development: fetal antigens may be involved. Endocrinology 2022;163(11):bqac141. DOI: 10.1210/endocr/bqac141
39. Torres D., Hou X., Bale L. et al. Overcoming platinum resistance in ovarian cancer by targeting pregnancy-associated plasma protein-A. PLoS One 2019;14(11):e0224564. DOI: 10.1371/journal.pone.0224564
40. Conover C.A., Oxvig C. PAPP-A and cancer. J Mol Endocrinol 2018; 61(1):T1–10. DOI: 10.1530/JME-17-0236
41. Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A. et al. Molecular targets for the therapy of cancer associated with metabolic syndrome (transcription and growth factors). Asia-Pac J Clin Oncol 2018;14(3):134–40. DOI: 10.1111/ajco.12780
42. Коломиец Л.А., Чернышева А.Л., Суходоло И.В., Крицкая Н.Г. Критерии прогноза онкологического риска при пролиферативных процессах эндометрия. Сибирский онкологический журнал 2007;S1.
Kolomiets L.A., Chernysheva A.L., Sukhodolo I.V., Kritskaya N.G. Prognostic criteria of oncologic risk in endometrial proliferative processes. Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Oncologic Journal 2007;S1. (In Russ.).
43. Онкогинекология: национальное руководство. Под ред. А.Д. Каприна, Л.А. Ашрафяна, И.С. Стилиди. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 384 с.
Oncogynecology: national guidelines. Eds.: A.D. Kaplin, L.A. Ashrafyan, I.S. Stilidi. Moscow: GEOTAR-Media, 2019. 384 p. (In Russ.).
44. Khare P., Bose A., Singh P. et al. Gonadotropin and tumorigenesis: direct and indirect effects on inflammatory and immunosuppressive mediators and invasion. Mol Carcinog 2017;56(2):359–70. DOI: 10.1002/mc.22499
45. Lempiäinen A., Stenman U.H., Blomqvist C., Hotakainen K. Free beta-subunit of human chorionic gonadotropin in serum is a diagnostically sensitive marker of seminomatous testicular cancer. Clin Chem 2008;54(11):1840–3. DOI: 10.1373/clinchem.2008.108548
46. Jankowska A.G., Andrusiewicz M., Fischer N., Warchol P.J. Expression of hCG and GnRHs and their receptors in endometrial carcinoma and hyperplasia. Int J Gynecol Cancer 2010;20(1):92–101. DOI: 10.1111/IGC.0b013e3181bbe933
47. Mustafa A., Bozdag Z., Tepe N.B., Ozcan H.C. An unexpected reason for elevated human chorionic gonadotropin in a young woman. Cervical squamous carcinoma. Saudi Med J 2016;37(8):905–7. DOI: 10.15537/smj.2016.8.14529
48. Konstantinopoulos P.A., Matulonis U.A. Current status and evolution of preclinical drug development models of epithelial ovarian cancer. Front Oncol 2013;3:296. DOI: 10.3389/fonc.2013.00296
49. Wu W., Gao H., Li X. et al. β-hCG promotes epithelial ovarian cancer metastasis through ERK/MMP2 signaling pathway. Cell Cycle 2019;18(1):46–59. DOI: 10.1080/15384101.2018.1558869
50. Li J., Yin M., Song W. et al. B subunit of human chorionic gonadotropin promotes tumor invasion and predicts poor prognosis of early-stage colorectal cancer. Cell Physiol Biochem 2018;45(1):237–49. DOI: 10.1159/000486770.
51. Guo X., Liu G., Schauer I.G. et al. Overexpression of the β subunit of human chorionic gonadotropin promotes the transformation of human ovarian epithelial cells and ovarian tumorigenesis. Am J Pathol 2011;179(3):1385–93. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.05.018
52. Liu N., Peng S.M., Zhan G.X. et al. Human chorionic gonadotropin β regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis in human ovarian cancer. Oncol Rep 2017;38(3):1464–72. DOI: 10.3892/or.2017.5818
53. Чернышова А.Л., Коломиец Л.А., Синилкин И.Г. и др. Оптимизация подходов к выбору объема хирургического лечения у больных раком шейки матки (роль исследования сторожевых лимфоузлов). Вопросы онкологии 2016;62(6):807–11.
Chernyshova A.L., Kolomiets L.A., Sinilkin I.G. et al. Optimization of approaches to choosing the scope of surgical treatment in patients with cervical cancer (the role of sentinel lymph node research). Voprosy onkologii = Oncology Issues 2016;62(6):807–11. (In Russ.).
54. Li Z., Li C., Du L. et al. Human chorionic gonadotropin β induces migration and invasion via activating ERK1/2 and MMP-2 in human prostate cancer DU145 cells. PLoS One 2013;8(2):e54592. DOI: 10.1371/journal.pone.0054592
55. Wu Z., Wang T., Fang M. et al. MFAP5 promotes tumor progression and bone metastasis by regulating ERK/MMP signaling pathways in breast cancer. Biochem Biophys Res Commun 2018;498(3):495–501. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.03.007
56. Guan H., Guo Z., Liang W. et al. Trop2 enhances invasion of thyroid cancer by inducing MMP2 through ERK and JNK pathways. BMC Cancer 2017;17(1):486. DOI: 10.1186/s12885-017-3475-2
57. Qin H., Liu X., Li F. et al. PAD1 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in triple-negative breast cancer cells by regulating MEK1-ERK1/2-MMP2 signaling. Cancer Lett 2017;409:30–41. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.08.019
58. Wang J.L., Yang M.Y., Xiao S. et al. Downregulation of castor zinc finger 1 predicts poor prognosis and facilitates hepatocellular carcinoma progression via MAPK/ERK signaling. J Exp Clin Cancer Res 2018;37(1):45. DOI: 10.1186/s13046-018-0720-8
59. Jung H.Y., Fattet L., Yang J. Molecular pathways: linking tumor microenvironment to epithelial-mesenchymal transition in metastasis. Clin Cancer Res 2015;21(5):962–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3173

60. Peixoto P., Etcheverry A., Aubry M. et al. EMT is associated with an epigenetic signature of ECM remodeling genes. Cell Death Dis 2019;10(3):205. DOI: 10.1038/s41419-019-1397-4
61. Helmo F.R., Lopes A.M.M., Carneiro A.C.D.M. et al. Angiogenic and antiangiogenic factors in preeclampsia. Pathol Res Pract 2018;214(1):7–14. DOI: 10.1016/j.prp.2017.10.021
62. Al Darwish F.M., Meijerink L., Coolen B.F. et al. From Molecules to imaging: assessment of placental hypoxia biomarkers in placental insufficiency syndromes. Cells 2023;12(16):2080. DOI: 10.3390/cells12162080
63. Башмакова Н.В., Цывьян П.Б., Чистякова Г.Н. и др. Ангиогенные ростовые факторы и патогенез преэклампсии. Российский вестник акушера-гинеколога 2017;17(5):7–12. DOI: 10.17116/rosakush20171757-12
Bashmakova N.V., Tsyv'ian P.B., Chistiakova G.N. et al. Angiogenic growth factors and the pathogenesis of preeclampsia. Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist 2017;17(5):7–12. (In Russ.). DOI: 10.17116/rosakush20171757-12
64. Sandvik M.K., Leirgul E., Nygård O. et al. Preeclampsia in healthy women and endothelial dysfunction 10 years later. Am J Obstet Gynecol 2013;209(6):569.e1–10. DOI: 10.1016/j.ajog.2013.07.024
65. Gaugler-Senden I.P.M., Tamsma J.T., van der Bent C. et al. Angiogenic factors in women ten years after severe very early onset preeclampsia. PLoS One 2012;7(8):e43637. DOI: 10.1371/journal.pone.0043637
66. Behrens I., Basit S., Jensen A. et al. Hypertensive disorders of pregnancy and subsequent risk of solid cancer – a nationwide cohort study. Int J Cancer 2016;139(1):58–64. DOI: 10.1002/ijc.30065
67. Navarro V.M. Interactions between kisspeptins and neurokinin B. Adv Exp Med Biol 2013;784:325347. DOI: 10.1007/978-1-4614-6199-9_15/FIGURES/00155
68. Wang T., Chen S., Wang S. et al. Targeting neurokinin-3 receptor: a novel anti-angiogenesis strategy for cancer treatment. Oncotarget 2017;8(25):40713. DOI: 10.18632/oncotarget.17250
69. Xiang H., Toyoshima Y., Shen W. et al. IFN-α/β-mediated NK2R expression is related to the malignancy of colon cancer cells. Cancer Sci 2022;113(8):2513–25. DOI: 10.1111/cas.15397
70. Fang W., Fu C., Chen X. et al. Neurokinin-2 receptor polymorphism predicts lymph node metastasis in colorectal cancer patients. Oncol Lett 2015;9(5):2003–6. DOI: 10.3892/ol.2015.3016
71. Zhang X.W., Li L., Hu W.Q. et al. Neurokinin-1 receptor promotes non-small cell lung cancer progression through transactivation of EGFR. Cell Death Dis 2022;13(1):41. DOI: 10.1038/s41419-021-04485-y
72. Lee E.D. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2, a common immunological link to adverse pregnancy outcomes and cancer clearance? Placenta 2017;56:40–3. DOI: 10.1016/j.placenta.2017.03.012
73. Tai W., Chen Z., Cheng K. Expression profile and functional activity of peptide transporters in prostate cancer cells. Mol Pharm 2013;10(2):477–87. DOI: 10.1021/mp300364k
74. Farhadi S.A., Hudalla G.A. Engineering galectin–glycan interactions for immunotherapy and immunomodulation. Exp Biol Med 2016;241(10):1074–83. DOI: 10.1177/1535370216650055
75. Huang Y., Wang H.-C., Zhao J. et al. Immunosuppressive roles of galectin-1 in the tumor microenvironment. Biomolecules 2021;11(10):1398. DOI: 10.3390/biom11101398
76. Gordon-Alonso M., Bruger A.M., van der Bruggen P. Extracellular galectins as controllers of cytokines in hematological cancer. Blood 2018;132(5):484–91. DOI: 10.1182/blood-2018-04-846014
77. Gordon-Alonso M., Hirsch T., Wildmann C., van der Bruggen P. Galectin-3 captures interferon-gamma in the tumor matrix reducing chemokine gradient production and T-cell tumor infiltration. Nat Commun 2017;8(1):793. DOI: 10.1038/s41467-017-00925-6

Вклад авторов
А.Л. Чернышова, Н.В. Юнусова: написание текста статьи, внесение ценных замечаний;
А.А. Черняков, Ю.М. Трущук, Я.И. Архипова: написание текста статьи, обзор литературы по теме статьи;
Н.В. Севостьянова: написание текста статьи, обзор литературы по теме статьи;
О.С. Диль: обзор литературы по теме статьи;
А.Е. Чернышова: перевод зарубежной литературы.
Authors' contributions
A.L. Chernyshov, N.V. Yunusova: article writing, making valuable comments;
A.A. Chernyakov, Yu.M. Trushchuk, Ya.I. Arkhipova: article writing, literature review on the topic of the article;
N.V. Sevostyanova: article writing, reviewing the literature on the topic of the article;
O.S. Dil: literature review on the topic of the article;
A.E. Chernyshova: translation of foreign literature.

ORCID авторов / ORCID of authors
А.Л. Чернышова / A.L. Chernyshova: https://orcid.org/0000-0002-8194-2811
А.А. Черняков / A.A. Chernyakov: https://orcid.org/0000-0003-0829-0340
Ю.М. Трущук / Yu.M. Truschuk: https://orcid.org/0000-0001-5926-2601
Н.В. Юнусова / N.V. Yunusova: https://orcid.org/0000-0003-4595-4177
Н.В. Севостьянова / N.V. Sevostyanova: https://orcid.org/0009-0005-0529-5631
Я.И. Архипова / Ya.I. Arkhipova: https://orcid.org/0009-0002-1062-7344
О.С. Диль / O.S. Dil: https://orcid.org/0000-0001-6562-7574

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

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

Статья поступила: 24.12.2023. **Принята к публикации:** 09.07.2024. **Опубликована онлайн:** 09.10.2024.
Article submitted: 24.12.2023. **Accepted for publication:** 09.07.2024. **Published online:** 09.10.2024.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-41-55

CC BY 4.0

Двуликий Янус: к 150-летию открытия ДДТ

О.В. Морозова[1], А.Ю. Букина[1, 2], В.Г. Попова[1], Г.И. Хайриева[3], Г.Р. Сагитова[3], Г.А. Белицкий[1], М.Г. Якубовская[1], К.И. Кирсанов[1, 4], В.П. Максимова[1]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;
[2]ФГБУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»; Россия, 119454 Москва, пр-кт Вернадского, 78;
[3]ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;
[4]ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Контакты: Варвара Павловна Максимова *lavarvar@gmail.com*

Одним из факторов, ассоциированных с ростом заболеваемости злокачественными новообразованиями, является загрязнение окружающей среды канцерогенными соединениями, в том числе пестицидами. Стойкий органический загрязнитель инсектицид дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) до недавнего времени был безальтернативным средством для борьбы с переносчиками малярии. Несмотря на многочисленные доказательства негативного действия на здоровье человека, ДДТ и в настоящее время используется в некоторых странах.
Цель обзора – всесторонний анализ динамики применения пестицида ДДТ и влияния последствий его использования на сферу глобального здравоохранения, а также исследование механизмов его действия на организм человека, включая влияние на эндокринную систему и канцерогенные эффекты.
При подготовке обзора использованы базы биомедицинской литературы PubMed (2853 публикации), Elsivier (3139 публикаций), eLibrary (784 публикации), а для получения полнотекстовых документов – электронные ресурсы PubMed Central (PMC), Science Direct, Research Gate, КиберЛенинка.

Ключевые слова: дихлордифенилтрихлорэтан, дихлордифенилдихлорэтилен, ДДТ, ДДЭ, эндокринный дизраптор, канцероген

Для цитирования: Морозова О.В., Букина А.Ю., Попова В.Г. и др. Двуликий Янус: к 150-летию открытия ДДТ. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(3):41–55.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-41-55

Two-faced Janus: on the 150th anniversary of the discovery of DDT

O.V. Morozova[1], A.Yu. Bukina[1, 2], V.G. Popova[1], G.I. Khairieva[3], G.R. Sagitova[3], G.A. Belitsky[1], M.G. Yakubovskaya[1], K.I. Kirsanov[1, 4], V.P. Maksimova[1]

[1]N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;
[2]MIREA – Russian Technological University; 78 Vernadskogo Prospekt, Moscow 119454, Russia;
[3]Sechenov University, Ministry of Health of Russia; Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;
[4]Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

Contacts: Varvara Pavlovna Maksimova *lavarvar@gmail.com*

One of the factors associated with increased morbidity of malignant neoplasms is environmental pollution with cancerogenic compounds including pesticides. Until recently, stable organic pollutant insecticide dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) was the single tool for fighting malaria carriers. Despite vast evidence of its negative effect on human health, DDT is still used in some countries.
Aim. To perform a comprehensive analysis of the dynamics of DDT pesticide use and the consequences of its use on the global healthcare as well as to investigate the mechanism of its action on the human body including the endocrine system and cancerogenic effects.
The review was composed using the PubMed (2853 publications), Elsevier (3139 publications), eLibrary (784 publications) biomedical literature databases. Full-text articles were retrieved through PubMed Central (PMC), Science Direct, Research Gate, CyberLeninka electronic resources.

Keywords: dichlorodiphenyltrichloroethane, dichlorodiphenyldichloroethylene, DDT, DDE, endocrine disruptor, carcinogen

For citation: Morozova O.V., Bukina A.Yu., Popova V.G. et al. Two-faced Janus: on the 150th anniversary of the discovery of DDT. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(3):41–55. (In Russ.).

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-41-55

ВВЕДЕНИЕ

Этиология злокачественных новообразований (ЗНО) является многофакторной и обусловлена как генетически детерминированными особенностями, так и влиянием факторов окружающей среды. Более 90 % ЗНО являются ненаследственными и возникают в результате действия экзогенных факторов, таких как химические канцерогены, ионизирующее и ультрафиолетовое излучение, хронические инфекции и поведенческие факторы риска [1].

В последние десятилетия появляется все больше данных о ключевой роли загрязнения окружающей среды как фактора, способствующего росту онкологической заболеваемости [2, 3]. Эпидемиологические исследования убедительно демонстрируют взаимосвязь экспозиции к широкому спектру промышленных и сельскохозяйственных химических агентов, включая тяжелые металлы, пестициды, полихлорированные бифенилы и другие стойкие органические загрязнители, и высокого риска развития различных типов ЗНО [4].

Особое беспокойство вызывает неблагоприятное воздействие эндокринных дизрапторов – химических веществ, нарушающих функцию эндокринной системы и негативно влияющих на развитие и здоровье организма [5]. Многие промышленные и сельскохозяйственные химикаты, в том числе пластификаторы, пестициды, огнестойкие добавки и косметические соединения, проявляют свойства эндокринных дизрапторов, что связывают с высоким риском гормонозависимых патологий, включая рак молочной (РМЖ), предстательной желез, яичек и др. [6].

Стремительный рост объемов производства синтетических веществ в современном мире, обладающих высокой устойчивостью к биодеградации, обусловливает их накопление в окружающей среде и биоаккумуляцию в живых организмах [7]. Некоторые из этих веществ, созданные для улучшения жизни людей, могут привести к катастрофическим последствиям.

Ярким примером стойкого химического загрязнителя служит пестицид дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ), широко применявшийся в середине XX века для борьбы с переносчиками малярии. Несмотря на то что использование ДДТ способствовало сокращению заболеваемости, его накопление в экосистемах вызвало серьезную обеспокоенность в связи с влиянием на здоровье человека и окружающую среду, что в итоге привело к запрету этого вещества во многих странах в 1970-х годах [8]. Тем не менее данный пестицид до сих пор применяется в ограниченном режиме для борьбы с малярией в некоторых регионах мира.

В первой части статьи представлены исторический обзор применения ДДТ, современное состояние борьбы с малярией, а также альтернативы этого пестицида. Во второй части дан комплексный анализ механизмов воздействия ДДТ на организм человека, в частности сообщается о его роли как эндокринного дизраптора и канцерогена. Рассматриваются такие ключевые аспекты, как влияние ДДТ и его метаболитов на женские и мужские половые гормоны, гормоны щитовидной железы, а также его эпигенетические свойства и канцерогенные эффекты. Такой всесторонний подход позволил сформировать целостное понимание роли ДДТ и его значения для здравоохранения в исторической ретроспективе, а также выявить ключевые закономерности и уроки, важные для совершенствования регуляторной политики и профилактики негативных последствий применения пестицидов.

Цель обзора – всесторонний анализ влияния пестицида ДДТ на сферу глобального здравоохранения, включая анализ динамики использования и запрета ДДТ в разное время в мировом масштабе и исследование механизмов его действия на организм человека, в частности влияния на эндокринную систему и канцерогенных эффектов.

ИСТОРИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ДДТ

Общая информация. Дихлордифенилтрихлорэтан представляет собой хлорорганический пестицид контактного действия (рис. 1). Коммерческий препарат ДДТ является смесью изомеров, в составе которой присутствует около 65–80 % пара,ппара'-ДДТ (п,п'-ДДТ) (см. рис. 1, *а*), 15–21 % орто,пара'-ДДТ (о,п'-ДДТ) (см. рис. 1, *б*) и до 4 % пара,пара'-дихлордифенилдихлорэтана (п,п'-ДДД) (см. рис. 1, *г*) [9]. Механизм инсектицидного действия ДДТ заключается в нарушении функции нейронов насекомых за счет задержки закрытия натриевых каналов и препятствия открытию калиевых каналов во время реполяризации [10].

Дихлордифенилтрихлорэтан был синтезирован в 1874 г. Отмаром Цайдлером (Othmar Zeidler), однако его инсектицидные свойства были обнаружены только в 1939 г. швейцарским химиком Паулем Германом Мюллером (Paul Hermann Müller), получившим за открытие свойств ДДТ Нобелевскую премию [11]. В 1942 г. началось промышленное производство ДДТ [12]. Поскольку синтез и сырье были дешевы и доступны, этот пестицид быстро начали производить во многих странах мира. С 1940-х годов ДДТ широко использовался в качестве хлорорганического инсектицида для сельскохозяйственных культур, а также

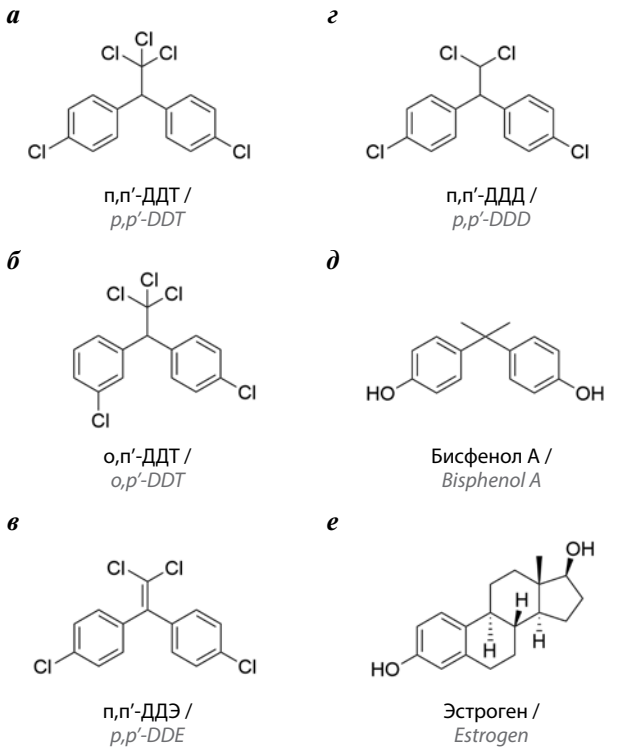


Рис. 1. *Химические структуры дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) и его основных метаболитов (а–г); ксеноэстрогена бисфенола А (д) и эстрогена (е). п,п'-ДДТ – пара,пара'-ДДТ; о,п'-ДДТ – орто,пара'-ДДТ; п,п'-ДДД – пара,пара'-дихлордифенилдихлорэтан; п,п'-ДДЭ – пара,пара'-дихлордифенилдихлорэтилен*

Fig. 1. *Chemical structures of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and its main metabolites (a–g); xenoestrogen bisphenol A (d) and estrogen (e). p,p'-DDT – para,para'-DDT; o,p'-DDT – ortho,para'-DDT; p,p'-DDD – para,para'-dichlorodiphenyldichloroethane; p,p'-DDE – para,para'-dichlorodiphenyldichloroethylene*

для борьбы с трансмиссивными болезнями, такими как малярия, тиф, сонная болезнь и речная слепота. Также его применяли в производстве пестицида дикофола и краски против обрастания подводной части рыболовных судов [13].

Борьба с малярией. В 1955 г. в рамках инициативы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по ликвидации малярии ДДТ был предложен в качестве основного инсектицида для борьбы с переносчиками болезни. В программе приняли участие более 37 стран [14]. Основная стратегия заключалась в том, чтобы ликвидировать переносчиков малярии за 7 лет до достижения полной устойчивости комаров к ДДТ. В связи с этим тонны этого вещества были отправлены в пострадавшие страны. К 1960 г. программа осуществлялась в 66 странах, а еще в 17 находилась на стадии планирования. К 1965 г. были достигнуты успехи в борьбе с малярией в Европе и Северной Америке, на островных территориях – на Тайване, Ямайке и в Занзибаре [15], а также на Шри-Ланке и в Индии. Распыление ДДТ в помещениях снизило заболеваемость малярией на Шри-Ланке с 1–2 млн случаев в год в 1950-е годы до 17 случаев к 1963 г. [16]. В Индии число случаев малярии сократилось с 75 млн в 1952 г. до 20 млн в 1956 г. [17]. В начале 1960-х годов ежегодное мировое потребление ДДТ составляло 400 тыс. тонн, из них 70–80 % этого пестицида использовалось в сельском хозяйстве [8, 13]. В целом за период 1950–1972 гг. оно составило 4,5 млн тонн [18].

Запрет ДДТ. В 1962 г. после публикации книги морского биолога Рэйчел Карсон (Rachel Carson) «Безмолвная весна» к ДДТ было привлечено внимание общественности. В своей работе Р. Карсон, в частности, ссылается на данные орнитолога Джеймса ДэУитта (James DeWitt), согласно которым воздействие этого вещества и других инсектицидов приводит к нарушению репродуктивной функции фазанов и перепелов, а также на результаты исследований профессоров Джорджа Уоллеса (George Wallace), Джозефа Хики (Joseph Hickey) и доктора Роя Баркера (Roy Barker), которые доказали влияние ДДТ на сокращение популяции малиновок [19]. Результаты дальнейших многочисленных исследований продемонстрировали чрезмерное распространение ДДТ в окружающей среде. Высокое содержание данного вещества и его метаболитов зарегистрировано в почве, сточных водах и питьевой воде. Кроме того, ДДТ обнаружен в тканях млекопитающих, рыб, рептилий и птиц, в частности в жировой ткани, печени, головном мозге, мышцах и яйцах. Анализ содержания этого пестицида и его основного метаболита дихлордифенилдихлорэтилена (ДДЭ) в овощах и фруктах также выявил контаминацию пестицидом. Также ДДТ был обнаружен в молоке кормящих женщин [12].

На основе полученных данных в 1969 г. Министерство сельского хозяйства США начало процесс по запрету использования ДДТ на различных культурах, а в 1972 г. Агентство по охране окружающей среды США (United States Environmental Protection Agency, EPA) окончательно запретило применение этого инсектицида. С начала 1970-х годов, вплоть до 1984 г., производство и использование ДДТ были прекращены в Швеции, Великобритании, Советском Союзе и частично Китае [8, 20]. С 1996 г. EPA участвовала в международных переговорах по контролю за использованием ДДТ и других стойких органических загрязнителей (СОЗ), используемых во всем мире [9]. В 2001 г. в Швеции под эгидой Программы Организации Объединенных Наций (ООН) по окружающей среде страны объединились и заключили договор о введении глобальных запретов или ограничений на СОЗ, включая ДДТ [21]. Стокгольмская конвенция о СОЗ вступила в силу в 2004 г.

Возврат к применению ДДТ. Хотя запрет на использование ДДТ не оказал большого влияния на сельское хозяйство, он значительно отразился на борьбе с малярией. Несмотря на многообещающие результаты программы 1950–1970 гг. по уничтожению этого заболевания, в некоторых странах вследствие сокращения поставок ДДТ произошли резкое увеличение числа

переносчиков малярии и рост заболеваемости. На Шри-Ланке в 1969 г. зарегистрированы 500 тыс. случаев заболевания, в то время как в Индонезии с 1965 по 1968 г. заболеваемость малярией выросла в 4 раза [16, 22]. Индия, располагающаяся на материке и граничащая с другими зараженными регионами, получила еще больший урон. Из-за полной утраты иммунитета к малярии в 1975 г. заболеваемость в Индии составила 25 млн человек [15]. Причинами возвращения эпидемии считают занос паразита в результате миграции людей, реинтродукцию переносчика, его поведенческие изменения и появление резистентности к инсектицидам у многих видов насекомых-вредителей [13]. Кроме того, в начале 1980-х годов ВОЗ прекратила использование ДДТ для остаточного распыления в помещениях (indoor residual spraying, IRS), сосредоточившись на применении лекарственных препаратов и обработанных инсектицидами противомоскитных сеток. Несмотря на принимаемые меры, в течение следующих нескольких десятилетий смертность от малярии неуклонно росла [23]. Из-за отсутствия инфраструктуры менее развитые страны оказались в невыгодном положении; самым проблемным регионом оставалась Африка.

В 2006 г. ВОЗ пересмотрела свою позицию в отношении ДДТ после исследований, которые продемонстрировали, что это химическое вещество представляет небольшую опасность для дикой природы и людей при условии надлежащего исполнения программ IRS. Всемирная организация здравоохранения поддержала применение ДДТ в странах Южной Африки и Индии, где малярия оставалась серьезной проблемой, сославшись на то, что преимущества использования этого пестицида перевешивают вред для окружающей среды и здоровья людей. Данные по странам, применяющим ДДТ, показали, что при правильном использовании IRS может снизить передачу малярии до 90 % [24].

В 2008 г. в перечень стран, ратифицировавших Стокгольмскую конвенцию о СОЗ, вошли 163 государства [25]. В рамках конвенции запрещалось применение ДДТ в сельском хозяйстве, в то время как его использование в качестве агента против малярии ограничивалось 15 странами (Ботсвана, Китай, Эфиопия, Индия, Мадагаскар, Маршалловы Острова, Маврикий, Марокко, Мозамбик, Мьянма, Сенегал, ЮАР, Свазиленд (ныне Эсватини), Уганда и Йемен). Кроме того, Индия использовала это вещество для борьбы с переносчиками паразитов, вызывающих лейшманиоз. Количество стран, производящих ДДТ, было сокращено до трех (до 2008 г. – Эфиопия, Китай и Индия, после 2009 г. – Китай, Индия и Северная Корея) [21]. В настоящее время единственным производителем и экспортером ДДТ остается Индия.

Альтернативы ДДТ. Тем не менее международные организации под эгидой Глобального экологического фонда (ГЭФ) были настроены на максимальное сокращение использования ДДТ в мире. В связи с этим ГЭФ совместно с ВОЗ разработал программу комплексной борьбы с переносчиками малярии, которую успешно реализовывали с 2003 по 2020 г. более чем в 30 странах Африки, Центральной Америки и Ближнего Востока [26]. В целом в рамках проекта удалось сократить число случаев малярии на 63 %, а случаев, связанных с паразитами, вызывающими самый высокий уровень смертности в мире, – более чем на 86 %. За указанный период зарегистрировано сокращение мирового производства ДДТ на 32 %. За период 2001–2014 гг. глобальное использование ДДТ для борьбы с трансмиссивными болезнями снизилось на 30 %. Сообщается, что 25 (80,6 %) стран из 31 прекратили использование этого вещества к 2018 г. [27]. На саммите ООН, посвященном 20-летию Стокгольмской конвенции, экспертная группа запланировала прекратить производство и использование ДДТ до конца 2022 г.

Главным фактором окончательного отказа от ДДТ может стать широкое распространение вакцины от малярии в странах Африки, Южного Кавказа и Индии. В 2021 г. ВОЗ одобрила к использованию вакцину против малярии RTS,S/AS01 (Mosquirix®) (GlaxoSmithKline, Великобритания). Основаниями для этого послужили результаты пилотной программы, реализуемой в Гане, Кении и Малави, в которой с 2019 г. приняли участие более 800 тыс. детей. Клинические испытания показали, что данная вакцина обладает высокой эффективностью как при первичной инфекции, так и при повторном заболевании [28, 29]. По состоянию на 2023 г. 1,5 млн детей в Гане, Кении и Малави получили, по крайней мере, 1 инъекцию вакцины, при этом более 4,5 млн ее доз введено в ходе реализации программ плановой иммунизации этих стран [30]. В течение следующих 2 лет вакцину получат еще 9 стран: Бенин, Буркина-Фасо, Бурунди, Камерун, Демократическая Республика Конго, Либерия, Нигер, Сьерра-Леоне и Уганда [30, 31].

ДЕЙСТВИЕ ДДТ НА ЧЕЛОВЕКА

Активное применение ДДТ привело к масштабному загрязнению окружающей среды, последствия которого до сих пор оказывают негативное влияние на здоровье людей. Население может подвергаться воздействию этого вещества и его метаболитов в результате потребления зараженных пищевых продуктов из районов, где ДДТ все еще используется, или содержащих биоаккумулированные остатки [32]. В организм человека ДДТ в основном попадает пероральным способом через пищу. В результате биотрансформации этого пестицида происходит последовательное образование различных метаболитов, включая ДДЭ, ДДД, 1-хлор-2,2-бис-(4-хлорфенил)этан (DDMU, ХДДЭ), бис(хлорфенил)-1-хлорэтан (DDMS, ДМДС), 2,2-бис(4-хлорфенил)этилен (DDNU, ДХФЭ), бис(4-хлорфенил)этанол (DDOH, БХФЭ), бис(хлорфенил) уксусную кислоту (DDA, ДДА), дихлордифенилметан (DDM, ДДМ), бис(4-хлорфенил)ацетонитрил (DDCN, ДХФАН) и дихлорбензофенон (DCBP,

ДХБФ) [33]. Дихлордифенилдихлорэтилен устойчив к дальнейшей биотрансформации, в связи с чем, как правило, является компонентом, наиболее широко обнаруживаемым в окружающей среде. Дихлордифенилтрихлорэтан, ДДЭ и ДДД сильно адсорбируются в почве, при этом слабо растворяются в воде, что обусловливает низкую степень их вымывания в нижние слои почвы и грунтовые воды. В зависимости от типа почвы период полураспада ДДТ составляет от 2 до 25 лет [34]. В настоящее время идет активная работа по удалению ДДТ и его метаболитов из почвы, в том числе с помощью различных микроорганизмов, растений и дождевых червей [35].

При попадании в организм человека ДДТ, поступая в лимфу и кровь, легко распределяется по всем тканям организма и в конечном счете сохраняется пропорционально содержанию липидов в ткани. Продукты метаболизма этого вещества выводятся с желчью и частично с мочой [32]. В исследовании M. Koureas и соавт. содержатся статистические данные о географическом распределении уровней ДДЭ в крови. Общие мировые концентрации ДДЭ снизились с 5207 мкг/кг липидов в период с 1951 по 1969 г. до 207 мкг/кг липидов после 2000 г. [36]. Высокая липофильность ДДТ обусловливает его депонирование в жировых тканях человека [37]. Период полураспада этого вещества в тканях человека составляет от 5 до 10 лет. Метаболиты ДДТ передаются новорожденным с молоком матери, а также проникают через плаценту [38]. При этом период полураспада данного вещества у кормящих женщин в 2 раза меньше, чем у нелактировавших [39].

Как острое, так и хроническое действие ДДТ на человека вызывает различные негативные последствия. По структуре это вещество является аналогом селективных нестероидных модуляторов половых рецепторов, таких как бисфенол А (см. рис. 1, *д*) и диэтилстильбестрол [40, 41]. Изомеры и метаболиты ДДТ проявляют плейотропные эндокринные эффекты.

Влияние ДДТ на женские половые гормоны. Для п,п'-ДДТ, о,п'-ДДТ, о,п'-ДДД и о,п'-ДДЭ продемонстрирована способность связываться с рецептором эстрогена (ER) [42, 43]. Для метаболитов ХДДЭ, ДМДС и ДХФАН показана способность активировать экспрессию гена эстроген-респонсивного элемента вителлогенина (*VTG1*) *in vitro*, что говорит о запуске эстрогенового сигналинга. При этом для метаболита ДДА продемонстрирована антиэстрогенная активность [44]. Результаты исследования L. Wang и соавт. показали, что способность производных ДДТ связываться с ERα и ERβ убывает в следующем порядке: БХФЭ (концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) 0,43 мкМ), о,п'-ДДТ (IC_{50} 3 мкМ), о,п'-ДДЭ (IC_{50} 10 мкМ), п,п'-ДДТ (IC_{50} 16 мкМ), п,п'-ДДД (IC_{50} 32 мкМ), ДХБФ (IC_{50} 41 мкМ), п,п'-ДДЭ (IC_{50} 53 мкМ), о,п'-ДДД (IC_{50} 66 мкМ) [45]. Продемонстрировано, что ДДТ усиливает взаимодействие ER с его респонсивными элементами, в частности с транскрипционным фактором AP-1, что приводит к активации пролиферации клеток и стимуляции роста эстрогензависимых тканей [45, 46]. Также для ДДТ характерно взаимодействие с эстрогенсвязанным рецептором γ (ERRγ) [47]. Результаты исследования *in vitro* показали, что аффинность изомеров и метаболитов ДДТ к ERRγ убывает в следующем порядке: БХФЭ (IC_{50} 1,5 мкМ), о,п'-ДДД (IC_{50} 4,3 мкМ), п,п'-ДДД (IC_{50} 4,8 мкМ), п,п'-ДДТ (IC_{50} 19 мкМ), о,п'-ДДТ (IC_{50} 35 мкМ), ДХБФ (IC_{50} 351 мкМ), п,п'-ДДЭ (IC_{50} >400 мкМ) [48]. В исследовании A.K. Wojtowicz и соавт. выявлена интересная закономерность: при однократном действии ДДТ и его метаболитов, за исключением о,п'-ДДТ, на фолликулы яичников наблюдались сильные эстрогенные эффекты, в то время как после повторного воздействия ДДТ зарегистрировано антиэстрогенное действие [49].

Эстрогеноподобный эффект ДДТ показан на различных моделях *in vivo* [50]. На модели овариэктомированных мышей, для которых характерен пониженный уровень эстрадиола, продемонстрированы утеротрофные эффекты ДДТ, выраженные в виде увеличения массы матки и развития псевдоэструса [51]. Метаболиты о,п'-ДДТ, о,п'-ДДЭ и БХФЭ также могут связываться с прогестероном (IC_{50} ~4 мкМ), который в норме ингибирует сигналинг ER. В результате повышенная экспрессия ER в сочетании с эстрогенным действием ДДТ оказывает более сильное эстрогенное влияние на гормонально-чувствительные органы [52]. Результаты исследований *in vivo* на модели крыс продемонстрировали, что метаболит о,п'-ДДТ снижает экспрессию специфичных для яичников генов: *PR* (ген рецептора прогестерона), *P450scc* и *StAR* (гены синтеза прогестерона), *SULT1E1* (ген метаболизма эстрогенов), *EREG* (ген пролиферации гранулезных клеток), а также гена *COX-2*, ответственного за биосинтез простагландинов, и гена транскрипционного фактора *RUNX1* [53]. У потомства мышей, хронически подвергавшихся воздействию п,п'-ДДТ, наблюдались преждевременные роды и повышенная смертность до отъема [54].

Наличие ДДТ и его метаболитов в сыворотке крови женщин репродуктивного возраста ассоциировано с уменьшением длительности лютеиновой фазы, а также со снижением уровня ER и прогестерона в периовуляторной и лютеиновой фазах менструального цикла, критически важных для протекания овуляции и поддержания беременности на ранних сроках [55, 56]. Метаболиты п,п'-ДДЭ, п,п'-ДДД и о,п'-ДДТ ассоциированы с повышенным уровнем гомоцистеина у беременных женщин, что увеличивает риск развития осложнений [57]. Высокий уровень ДДЭ в сыворотке беременных женщин коррелировал с риском преждевременных и патологических родов, сниженной массы плода, а также мертворождением [58–60]. Общее содержание ДДТ в молоке кормящих женщин в 1950 г. составило 5000 мкг/кг, к 1990 г. оно снизилось до 300 мкг/кг, к 1999 г. – до 160 мкг/кг при разрешенной ВОЗ дозе

этого вещества 5–10 мкг/кг [61, 62]. В 2000-х годах в различных районах, где ранее применялся ДДТ, его метаболиты обнаруживались в материнском молоке, плаценте и пуповинной крови в концентрациях, превышающих допустимые [63, 64]. В ходе исследования 2021 г. в когорте кормящих женщин из Эфиопии выявлено, что содержание метаболитов ДДТ в материнском молоке почти в 100 раз превышает рекомендуемые ВОЗ концентрации этого вещества [65]. Таким образом, воздействие ДДТ на младенцев в районах, где применяется или до недавнего времени применялся IRS, является актуальной проблемой.

У матерей, в грудном молоке которых обнаружен ДДТ (1-я группа), в 2 раза чаще рождались дети с малой массой тела и недоношенные, чем у матерей, в молоке которых этот инсектицид не обнаружен (2-я группа). Все случаи рождения детей с пороками развития относились только к 1-й группе [66]. Высокий риск неблагоприятного влияния на здоровье младенцев ДДТ обусловлен в основном не полностью сформированными механизмами детоксикации и высокой чувствительностью молодых организмов. Младенцы подвергаются воздействию высоких уровней ДДТ из-за потребления большего по сравнению со взрослыми количества пищи по отношению к массе тела [67].

Исследования, проведенные E. Coker и соавт. в провинции Лимпопо (ЮАР), где используется IRS, позволили выявить ассоциацию между наличием п,п'-ДДТ и о,п'-ДДТ в крови матери и повышением индекса массы, длины тела и размера головы у новорожденных девочек [68, 69]. Для той же когорты исследуемых показана ассоциация влияния ДДТ и его метаболитов во время беременности с развитием поведенческих проблем у детей до 2 лет, таких как замкнутость (п,п'-ДДТ), оппозиционно-вызывающее поведение (п,п'-ДДТ) и синдром дефицита внимания и гиперактивности (п,п'-ДДЭ) [70].

Дихлордифенилдихлорэтилен является конкурентным ингибитором ароматазы, в связи с чем может происходить нарушение синтеза эстрогенов из андрогенов. Он индуцирует повышение активности микросомальной ароматазы у самцов крыс *in vivo*, а также в стромальных клетках эндометрия *in vitro* [71, 72]. Пренатальные уровни ДДЭ значимо связаны с повышенной экспрессией генов ароматазы [73]. С учетом того что активность ароматазы важна для поддержания беременности и регуляции родов на поздних сроках беременности, ингибирование активности этого фермента может ухудшить исход беременности.

Влияние ДДТ на мужские половые гормоны. В исследованиях *in vitro* показано, что метаболиты п,п'-ДДТ, п,п'-ДДД, п,п'-ДДЭ и о,п'-ДДТ могут связываться с андрогеновым рецептором (AR). При этом аффинность п,п'-ДДТ, п,п'-ДДД, п,п'-ДДЭ к AR в 200 раз более выраженная, чем к ER. В свою очередь, о,п'-ДДТ связывается с AR в 40 раз слабее, чем с ER [74]. Соединения о,п'-ДДТ, о,п'-ДДЭ, п,п'-ДДЭ, о,п'-ДДД, п,п'-ДДТ и п,п'-ДДД действуют как антагонисты AR, при этом основную антиандрогенную роль при действии ДДТ отводят наиболее стойкому метаболиту – п,п'-ДДЭ [75, 76]. Механизм действия п,п'-ДДЭ заключается в специфическом взаимодействии с сайтом AR BF3, что вызывает дестабилизацию связанного с рецептором дигидротестостерона и приводит к его высвобождению из лигандсвязывающего домена AR [77].

In vivo также было показано, что п,п'-ДДЭ представляет собой антагонист AR и при этом оказывает влияние на андрогензависимые гены [78, 79]. У самцов крыс, подвергшихся перинатальному действию п,п'-ДДЭ, наблюдаются сокращение аногенитального расстояния, гипоспадия, а также крипторхизм, что соответствует появлению симптомов дисгенезии яичек [77, 80]. Введение п,п'-ДДЭ отъемышам приводило к задержке наступления пубертатного периода и увеличению массы тела. У взрослых самцов крыс при введении п,п'-ДДЭ снижался вес семенных пузырьков и предстательной железы [74]. Результаты экспериментов на крысах показали, что перинатальное введение ДДЭ вызывает феминизацию у самцов и изменяет чувствительность предстательной железы при дальнейшем воздействии этого вещества на взрослых самцов. Кроме того, отмечен хронический гнойный простатит [81]. Влияние п,п'-ДДЭ на самцов крыс пубертатного возраста приводило к пороку развития сперматозоидов, а также к снижению их плотности и параметров подвижности, которые на молекулярном уровне сопровождались индукцией апоптоза через митохондриальный сигнальный путь, а также уменьшением экспрессии антиоксидантного белка PHGPx [82]. У самцов крыс препубертатного и пубертатного возраста после воздействия ДДЭ наблюдалось значительное снижение циркулирующего сывороточного тестостерона [83]. Результаты исследования S.E. Brien и соавт. показали, что однократное воздействие п,п'-ДДЭ вызывает эректильную дисфункцию у самцов крыс [84]. Данные, полученные в ходе ряда исследований *in vivo*, свидетельствуют о том, что небольшие дозы ДДЭ более эффективны, чем высокие [83].

Результаты большинства эпидемиологических исследований демонстрируют противоречия между внутриутробным воздействием ДДТ/ДДЭ и аногенитальным расстоянием, гипоспадией или размерами полового члена у новорожденных мальчиков [85–87]. Также выявлено, что пренатальное воздействие ДДЭ на новорожденных девочек приводит к увеличению аногенитального расстояния, что соответствует эффекту маскулинизации [86]. В то же время результаты исследования L. Torres-Sanchez и соавт. показали, что действие ДДЭ в сыворотке крови беременных женщин в течение I триместра беременности связано со статистически значимым снижением аногенитального расстояния у новорожденных мальчиков [88]. Недостатком данного исследования может быть небольшая выборка испытуемых. Показано, что влияние ДДТ

приводит к нарушению сперматогенеза. Анализ спермы более чем 300 мужчин в возрасте от 18 до 40 лет, проживающих в районе, где проводится IRS, показал положительную корреляцию между уровнем п,п'-ДДТ/п,п'-ДДЭ и наличием таких патологий, как тератозоо-, астенозоо- и олигозооспермия [89]. Также получены данные о негативном влиянии п,п'-ДДТ/п,п'-ДДЭ на морфологию и подвижность сперматозоидов, ассоциированных с повреждениями ДНК и, в меньшей степени, дефектами хроматина [90]. Воздействие ДДТ неблагоприятно влияет на мужские половые гормоны. В исследовании M. Bornman и соавт. проведено сравнение уровня различных гормонов и концентрации ДДТ/ДДЭ в крови мужчин, живущих в условиях IRS, с показателями мужчин, не подвергающихся воздействию пестицидов. Выявлена ассоциация между концентрацией ДДТ и ДДЭ в сыворотке крови с повышением уровней общего, свободного и биодоступного тестостерона и снижением уровня фолликулостимулирующего гормона. Также показана связь содержания ДДТ в крови с уменьшением уровня лютеинизирующего гормона и увеличением уровня эстрадиола [91]. Выявлена корреляция между мужским бесплодием и уровнями о,п'-ДДТ и п,п'-ДДТ в моче и сыворотке крови [92]. E. Regidor и соавт. установили, что производственное воздействие пестицидов (в том числе ДДТ) на отцов приводит к высокому риску гибели плода из-за врожденных аномалий [93]. В ходе исследования A. Lismer и соавт. проведен сравнительный анализ эпигенетических изменений в сперматозоидах мужчин из провинции Лимпопо, где проводится IRS, и мужчин, проживающих в Гренландии и не контактирующих с ДДТ. В результате идентифицированы геномные области с измененным метилированием ДНК и дифференциальным обогащением модификацией H3K4me3 в сайтах генома, содержащих мобильные элементы и области, регулирующие процессы фертильности, нервно-психического развития, нарушения в которых ассоциированы с формированием ЗНО [94].

Влияние ДДТ на гормоны щитовидной железы. Выявлено, что метаболиты ДДТ также влияют на гормоны щитовидной железы. Результаты исследования *in vivo* продемонстрировали снижение уровня общего и свободного тироксина и транстиретина под воздействием п,п'-ДДЭ [95]. Анализ влияния СОЗ в организме беременных женщин на развитие ребенка выявил отрицательную связь между концентрацией п,п'-ДДЭ и уровнем тиреотропного гормона в крови матери, а также уровнем свободного трийодтиронина в крови ребенка. Кроме того, наличие п,п'-ДДЭ в сыворотке крови матери положительно коррелировало с послеродовым увеличением массы тела и меньшей длиной тела ребенка [96]. Результаты похожего исследования, проведенного в Университете Хоккайдо (Япония), показали отрицательную связь между уровнями п,п'-ДДЭ и о,п'-ДДТ и уровнем свободного Т4 в крови матери [97]. В ходе исследования VHEMBE (Venda Health Examination of Mothers, Babies and their Environment) в регионе, где используется IRS (Лимпопо), обнаружена обратная корреляция между уровнями о,п'-ДДТ в крови/моче матери и Т4 в пяточной пробе крови новорожденных мальчиков [98]. Важной особенностью данной работы является размер исследуемой когорты – более 700 матерей и младенцев. Внутриутробное действие ДДТ может приводить к изменению гомеостаза гормонов щитовидной железы за счет эпигенетических механизмов. Результаты исследования S. Kim и соавт. показали, что наличие ДДЭ в сыворотке матерей, родивших девочек, ассоциировано с метилированием гена *DIO3* в плаценте, а уровень ДДТ в сыворотке женщин, родивших мальчиков, – гена *MCT8* [99].

Эпигенетические эффекты ДДТ. При внутриутробном действии ДДТ формируется наследуемый эпигенетический профиль, который включает изменение паттернов экспрессии некодирующих РНК, а также нарушения уровня метилирования ДНК по всему геному [100]. Для метаболитов ХДДЭ и ДДА показана способность связываться с ДНК-метилтрансферазой DNMT1, что приводило к гипометилированию генома в тестах *in vitro*. Кроме того, метаболиты изменяли уровень метилирования ДНК в промоторных областях генов, связанных с половым развитием, и экспрессию генов *SOX9* и *OCT4* в эмбриональных стволовых клетках [101]. В исследовании E. Nilsson и соавт. в гранулезных клетках самок крыс поколения F3, чьи предки из поколения F1 подвергались внутриутробному действию ДДТ, обнаружены изменения профилей геномного метилирования и некодирующих РНК, относящихся к сайтам расположения генов передачи сигналов, транскрипции, рецепторов и цитоскелета, в том числе генов, связанных с заболеванием яичников [102]. По данным M.K. Skinner и соавт., влияние ДДТ на разные поколения различается. *In vivo* на крысах обнаружено, что максимальная степень различий метилирования ДНК сперматозоидов характерна для поколения F2, но не для поколения F3. Также в поколении F2 наблюдалось значительное снижение количества дифференциально экспрессируемых длинных и малых некодирующих РНК, включая miRNA, piRNA и stRNA, по сравнению с поколениями F1 и F3. Анализ изменений гистоновых модификаций не выявил значительных различий между поколениями, однако обнаружены трансгенерационные изменения в местах удержания гистонов в хроматине [103]. Результаты еще одного исследования показали, что у самок крыс поколения F3 п,п'-ДДТ вызывает нарушения в яичниках, выраженные в потере примордиальных фолликулов, которая обусловлена эпигенетическими изменениями примордиальных фолликулов. У самцов крыс п,п'-ДДТ продемонстрировал трансгенерационные патологические эффекты в яичках и предстательной железе, также выявлена тенденция к заболеваниям почек. Для самцов из поколения F2 характерен более ранний

пубертат по сравнению с контролем, в то время как для поколения F3 наблюдалась обратная зависимость. В когорте самцов и самок F3 отмечено значительное повышение степени ожирения [104]. Влияние ДДТ способствует значительному увеличению количества miRNA в сперме самцов крыс, в частности miRNA-10b, ассоциированной с развитием клеток, тканей, органов и эмбрионов, и дифференцировкой клеток, а также связанной с аномальным развитием кроветворной и иммунной систем у эмбрионов. Кроме того, введение РНК из спермы самцов, подвергшихся действию ДДТ, в эмбрионы интактных родителей приводило к увеличению частоты возникновения и объема опухолей при РМЖ, индуцированных 7,12-диметилбенз[а]антраценом [105].

Канцерогенные эффекты ДДТ. С 1950-х годов в литературе появляются данные о возможном канцерогенном действии ДДТ. На настоящий момент насчитывается более 1000 исследований канцерогенных эффектов этого вещества. В 1991 г. ДДТ и его метаболиты были классифицированы Международным агентством по изучению рака (МАИР) как возможные канцерогены (группа 2B), что свидетельствует о канцерогенности ДДТ в отношении животных и отсутствии адекватных данных для человека [12]. В 2015 г. МАИР на основе накопленных за последние 20 лет эпидемиологических, экспериментальных и механистических данных включило ДДТ и ДДЭ в группу вероятных канцерогенов (группу 2A), что означает ограниченное доказательство канцерогенности для человека и достаточное – для животных. Больше всего информации имеется по РМЖ и лимфоме. Совокупность эпидемиологических, экспериментальных и механистических данных указывает на положительную корреляцию между воздействием ДДТ и риском развития рака печени, яичек и неходжкинской лимфомы (НХЛ) [9].

Результаты вложенных исследований «случай – контроль», проведенных в Линьсяне и Хаймене (Китай), продемонстрировали сильную связь между гепатоцеллюлярной карциномой и концентрацией метаболита п,п'-ДДТ, но не п,п'-ДДЭ, в образцах крови. Более высокий риск возникновения гепатоцеллюлярной карциномы характерен для лиц с меньшей концентрацией метаболита п,п'-ДДЭ, что говорит о прямом воздействии ДДТ [106, 107]. Результаты многочисленных исследований *in vivo* указывают на способность ДДТ вызывать образование опухолей печени у мышей [54, 108, 109]. Вывод о влиянии этого вещества на возникновение рака яичников был сделан на основе вложенных исследований «случай – контроль» K.A. McGlynn и соавт. и M.P. Purdue и соавт. В рамках первого исследования проведен анализ корреляции между возникновением опухоли зародышевых клеток яичек и концентрациями п,п'-ДДТ, п,п'-ДДЭ и других хлорорганических соединений. В анализе использовали сыворотку крови 739 мужчин с опухолью зародышевых клеток яичек и 915 контрольных проб. Развитие данной опухоли статистически значимо ассоциировалось с повышением уровня п,п'-ДДЭ [110]. Результаты исследования M.P. Purdue и соавт., в которое вошли 49 пациентов с новообразованиями и 51 участник группы контроля, показали связь возникновения герминальных опухолей яичек с концентрациями п,п'-ДДЭ в крови [111]. Более чем в 30 работах оценен риск развития лимфогемопоэтических ЗНО в зависимости от воздействия ДДТ [9]. В когортных исследованиях с использованием метода «случай – контроль» связь между НХЛ и ДДТ, ДДЭ не обнаружена или выявлены слабые ассоциации с п,п'-ДДЭ. Результаты обширного исследования датских эпидемиологов с использованием предиагностических образцов из жировой ткани показали более высокий риск возникновения НХЛ при повышенных уровнях ДДТ, что не было характерно для п,п'-ДДЭ [112]. Также проведены эпидемиологические исследования в когорте лиц, работавших в сельском хозяйстве в годы интенсивного использования ДДТ. В группе фермеров и коммерческих пользователей пестицидов в США (n = 54 306) выявлены 523 случая НХЛ. Для всех морфологических типов НХЛ отмечены статистически значимые положительные тенденции воздействия ДДТ во время его использования [9, 113]. В ходе работ шведских авторов с использованием метода «случай – контроль» и биологических образцов обнаружена положительная связь между повышенным уровнем п,п'-ДДЭ в крови и риском развития НХЛ. Кроме того, посмертные измерения ДДТ и ДДЭ в жировой ткани показали увеличение риска возникновения данной патологии при высоких уровнях ДДЭ [114].

Одной из наиболее исследуемых нозологий в контексте влияния ДДТ является РМЖ. Влияние ДДТ на развитие данной патологии обусловлено его эстрогеноподобным эффектом: это вещество взаимодействует с ER, что приводит к активации транскрипции через эстроген-респонсивные элементы [115]. Результаты исследований *in vitro* и *in vivo* показали, что о,п'-ДДТ и п,п'-ДДТ усиливают взаимодействие ER с генами, стимулирующими рост клеток в ткани молочной железы. Кроме того, о,п'-ДДТ может синергически взаимодействовать с эстрогеном, что вызывает усиленный эстрогенный ответ. Показано, что ДДТ и ДДЭ стимулируют образование 16-α-гидроксиэстрона, который обладает выраженным эстрогенным эффектом и генотоксичностью, а также является фактором риска развития РМЖ [116].

До 1990-х годов эпидемиологические данные о риске развития РМЖ, связанном с влиянием ДДТ, были весьма противоречивы, что объясняется несовершенством методологических подходов и методов статистического анализа, а также зачастую малым числом пациентов в выборке. В основном исследования были направлены на оценку содержания хлорорганических пестицидов, в том числе ДДТ (в форме его метаболитов п,п'-ДДТ и п,п'-ДДЭ), в сыворотке крови [117]. С течением времени, когда лица, подвергавшиеся дейст-

вию ДДТ во время его пикового применения в середине прошлого века, достигли зрелого и пожилого возраста, появились новые данные о влиянии этого вещества на их здоровье.

Способность соединения накапливаться в жировой ткани и его медленное выведение из организма использованы для анализа содержания метаболических производных ДДТ спустя несколько десятилетий после его воздействия. Подход, основанный на одновременной количественной оценке 3 основных метаболитов ДДТ (п,п'-ДДТ, п,п'-ДДЭ, о,п'-ДДТ), предложенный B. Cohn и соавт., позволил оценить возможные различия в эффектах этих соединений. Использование многокомпонентного анализа обусловлено тем, что п,п'-ДДТ является основным метаболитом ДДТ; п,п'-ДДЭ – наиболее стойкое производное ДДТ, которое может как образовываться в организме человека, так и попадать в него непосредственно из пищевых источников; о,п'-ДДТ – метаболит примеси коммерческого ДДТ, наиболее быстро разлагаемый в организме, что делает возможным его использование в качестве маркера недавнего воздействия [118, 119]. Таким образом, абсолютные и относительные уровни изомеров ДДТ могут представлять разные периоды воздействия пестицида. Кроме того, эти соединения обладают разной эндокринной активностью [74], что предполагает вероятность их различного воздействия на человека.

Как было отмечено выше, наиболее критично для развития РМЖ попадание ДДТ в организм в препубертатный период в связи с тем, что именно в это время происходит накопление жировой ткани в области молочной железы и яичников [120]. В данный период ксеноэстрогены могут увеличивать период роста протоков и развития ацинарных структур во время каждого менструального цикла и способствовать аномальной организации ткани, что впоследствии может стать причиной канцерогенеза. Так, в образцах жировой ткани пациенток с РМЖ обнаружены более высокие концентрации ДДТ и ДДЭ по сравнению с женщинами, у которых было доброкачественное заболевание молочной железы [121]. B.A. Cohn и соавт. провели исследование на выборке образцов крови, полученных в 1959–1967 гг. от молодых женщин, и выявили, что воздействие п,п'-ДДТ до наступления половой зрелости связано с 5-кратным повышением риска развития РМЖ в пременопаузе (до 50 лет), при этом наибольший риск наблюдался у женщин, подвергшихся воздействию еще раньше, к 14 годам. В то же время у женщин этого же возраста, не подвергавшихся воздействию п,п'-ДДТ до 14 лет, не выявлено связи между ДДТ и РМЖ [120]. Результаты исследования B.A. Cohn и соавт., опубликованного в 2019 г., продемонстрировали прямую корреляцию между риском развития РМЖ во время ранней постменопаузы (50–54 года) и воздействия ДДТ в младенчестве [122]. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что первоначальное воздействие п,п'-ДДТ в критический период раннего возраста более значимый фактор возникновения РМЖ, чем хроническое воздействие его метаболита п,п'-ДДЭ.

Результаты приведенных исследований демонстрируют, что риск развития РМЖ зависит от времени первого воздействия ДДТ, причем основной период чувствительности к действию пестицида начинается в раннем возрасте. Также авторы предполагают, что ДДТ как эндокринный дизраптор может влиять на молочную железу от внутриутробного развития до менопаузы.

Благодаря подходу B.A. Cohn удалось эпидемиологически показать трансгенерационные эффекты ДДТ и его метаболитов. Продемонстрировано, что воздействие ДДТ на матерей (F0) в значительной степени связано с повышенным риском развития ожирения у их дочерей (F1) и внучек (F2) [123, 124]. Перинатальное влияние ДДТ также связывают с факторами риска возникновения РМЖ в последующих поколениях. В исследовании B.A. Cohn и соавт. выявлена ассоциация повышенного уровня о,п'-ДДТ в сыворотке крови матерей (F0) с 4-кратным увеличением риска развития РМЖ у дочерей (F1). Кроме того, обнаружена корреляция между повышенным уровнем о,п'-ДДТ и поздней стадией онкологического заболевания на момент постановки диагноза (с регионарными и отдаленными метастазами), а также с возникновением HER2-положительных опухолей (HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа), независимо от наличия избыточной массы тела у матери, РМЖ в анамнезе и концентрации п,п'-ДДЭ [125]. Совместное воздействие п,п'-ДДТ и п,п'-ДДЭ больше ассоциировано с увеличением плотности соединительной ткани молочной железы, в то время как о,п'-ДДТ действует в основном на неплотную жировую ткань [126].

Канцерогенные соединения обладают специфическим профилем молекулярного действия, который предполагает такие ключевые характеристики (KX), как электрофильность или влияние на метаболические пути генотоксичности (KX2), способность воздействовать на репарацию ДНК и геномную нестабильность (KX3), эпигенетическая активность (KX4), способности индуцировать окислительный стресс (KX5), воспаление (KX6), иммуносупрессивные свойства (KX7), модулировать активность рецепторов (KX8), вызывать иммортализацию (KX9), влиять на пролиферацию, гибель и питание клеток (KX10) [127]. Дихлордифенилтрихлорэтан не является электрофилом, однако может оказывать множественные эффекты на биохимические процессы в клетке, нарушая клеточный метаболизм (KX1). Результаты исследования D. Theile и соавт. показали, что при воздействии метаболитов о,п'-ДДТ и о,п'-ДДЭ происходит индукция экспрессии генов цитохромов P450 *CYP1A1*, *CYP1A2* и *CYP3A4*, а также генов УДФ-глюкуронозилтрансфераз *UGT1A3*, *UGT1A9* и *UGT2B7 in vitro*. С помощью ферментативного анализа продемонстрирована способность метаболитов о,п'-ДДТ и о,п'-ДДЭ ингибировать

экспрессию гена *CYP2C19* – кодирующий фермент, который метаболизирует среди других субстратов циклофосфамид и фенобарбитал [70]. В ходе исследования *in vivo* выявлено, что воздействие ДДТ на крыс приводит к значительной индукции цитохромов P450 CYP2B1/2B2 и CYP3A2, но не влияет на активность CYP2E1 и P450-редуктазы. Поскольку CYP3A2 участвует в метаболизме андрогенов, было высказано предположение, что ДДТ может модулировать половой метаболический диморфизм [128]. Данных о генотоксических свойствах ДДТ и его способности влиять на репарацию (КХ2 и КХ3) в литературе не представлено. Дихлордифенилтрихлорэтан индуцирует изменения в механизмах эпигенетической регуляции транскрипции (КХ4), включая влияние на метилирование ДНК, некодирующие РНК, а также проявляет трансгенерационные эффекты, как было описано выше. Это вещество вызывает окислительный стресс и воспаление, что соответствует КХ5 и КХ6. Результаты исследования L. Song и соавт. на клетках колоректальной аденокарциномы DLD1, гепатоцеллюлярной карциномы Hep G2 и мышиных моделях продемонстрировали, что п,п'-ДДТ способствует увеличению количества активных форм кислорода, а также ингибирует активность антиоксидантного белка SOD, в результате чего происходит значительное увеличение уровня экспрессии β-катенина и нижестоящих мишеней (c-Myc и циклина D1), а также ингибирование активности GSK3β [129, 130]. По данным M. Zhao и соавт., рацемат о,п'-ДДТ (в основном за счет активности R-энантиомера) вызывает окислительный стресс в нейронных клетках PC12, на что указывают высвобождение внеклеточной лактатдегидрогеназы, повышенная ферментативная активность супероксиддисмутазы и накопление окисленного малонового диальдегида [131]. Дихлордифенилтрихлорэтан может вызывать повышенную секрецию таких провоспалительных цитокинов, как интерферон γ (IFN-γ), фактор некроза опухоли α (TNF-α) и интерлейкины 1β и 6 в моноцитах и лимфоцитах периферической крови [132]. При этом стимуляция гиперэкспрессии интерлейкинов контролируется через сигналинг p38 MAPK [133]. Результаты исследования E.H. Han и соавт. продемонстрировали, что о,п'-ДДТ индуцирует повышенную экспрессию воспалительного медиатора COX-2 в мышиных макрофагах за счет активации сигнальных молекул путей MAPK и PI3K/Akt. Полученные данные указывают на то, что ДДТ опосредует фосфорилирование белков Akt, ERK, p38 и JNK, в результате чего происходят активация транскрипционных факторов AP-1 и CRE и последующая экспрессия COX-2. Еще одним из последствий окислительного стресса, индуцированного действием ДДТ, является активация сигнального пути Wnt/β-катенин [134].

Иммуносупрессивных эффектов (КХ7) для ДДТ зарегистрировано не было. Благодаря своему химическому строению ДДТ обладает высокой активностью в отношении различных рецепторов (КХ8), включая ER, AR, арильный углеводородный рецептор (AhR), фарнезоидный X рецептор (FXR), рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом (PPAR), прегнан X рецептор (PXR) и рецептор ретиноевой кислоты (RAR) [9]. Основные механизмы действия ДДТ, направленные на модулирование гормонов, были описаны выше. Способность ДДТ вызывать иммортализацию (КХ9) не выявлена. Дихлордифенилтрихлорэтан может влиять на пролиферацию, гибель и питание клеток (КХ10). Также показано пролиферативное действие этого вещества на различных моделях *in vitro* [130, 135]. Под влиянием ДДТ происходит опосредуемая активными формами кислорода активация апоптоза [136]. Результаты исследований Y. Shi и соавт. продемонстрировали, что п,п'-ДДЭ может индуцировать апоптоз клеток Сертоли как через митохондриальный путь, так и посредством FasL-зависимого пути [136, 137]. Активность p38 MAPK, индуцированная ДДТ, вызывает высвобождение цитохрома C из митохондрий и последующую активацию нижестоящей эффекторной каспазы-3/7, в результате чего запускается апоптоз [138]. Метаболит о,п'-ДДТ активирует экспрессию генов различных проапоптотических белков, среди которых члены семейства TNF (TNF, Tnfsf12, Faslg и др.), каспаза-2, -8, -12, -5, члены семейства Bcl-2 (Bcl-2L1, Bcl-2L2 и Bcl-2), белок p53 и транскрипционный ядерный фактор κB (NF-κB) [131]. Таким образом, существуют убедительные механистические доказательства того, что ДДТ обладает 6 ключевыми характеристиками канцерогенных соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкомасштабное применение ДДТ на протяжении нескольких десятилетий сыграло ключевую роль в борьбе с малярией и другими трансмиссивными заболеваниями, обеспечив значительное снижение заболеваемости и смертности. Однако со временем данные о масштабной экологической и биологической аккумуляции ДДТ, а также его негативном воздействии на репродуктивную функцию животных и человека инициировали глобальные дебаты и привели к его запрету во многих странах.

Представленный в настоящем обзоре комплексный анализ механизмов действия ДДТ раскрывает его способность нарушать функционирование эндокринной системы на различных уровнях. Так, ДДТ и его метаболиты способны имитировать действие половых гормонов, связываясь с соответствующими рецепторами и вызывая гормональный дисбаланс. Кроме того, ДДТ оказывает влияние на синтез, транспорт и метаболизм тиреоидных гормонов, что может привести к нарушению работы щитовидной железы. Выявлены эпигенетические эффекты этого вещества, которые за счет модуляции экспрессии генов способны передаваться из поколения в поколение, пролонгируя вредное воздействие инсектицида. Отдельного внимания

заслуживает статус канцерогенности ДДТ. По классификации МАИР ДДТ относится к группе 2А, что характеризуется наличием ограниченных доказательств канцерогенности в отношении людей. Однако был выявлен ряд ЗНО, возникновение которых ассоциировано с действием этого вещества, в том числе рак печени, НХЛ, семинома. Кроме того, трансгенерационное возникновение РМЖ также связывают с действием ДДТ. Вероятно, в скором времени возможна реклассификация канцерогенности этого агента.

Данные о многогранных механизмах негативного влияния ДДТ на организм человека имеют принципиальное значение для всесторонней оценки и минимизации рисков, связанных с экспозицией к этому соединению.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Parsa N. Environmental factors inducing human cancers. Iran J Public Health 2012;41(11):1–9.
2. Schug T.T., Johnson A.F., Birnbaum L.S. et al. Minireview: endocrine disruptors: past lessons and future directions. Mol Endocrinol 2016;30(8):833–47. DOI: 10.1210/me.2016-1096
3. Guyton K.Z., Loomis D., Grosse Y. et al. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. Lancet Oncol 2015;16(5):490–1. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70134-8
4. Lewandowska A.M., Rudzki M., Rudzki S. et al. Environmental risk factors for cancer – review paper. Ann Agric Environ Med 2019;26(1):1–7. DOI: 10.26444/aaem/94299
5. Endocrine disruptors – the lessons (not) learned. Lancet Oncol 2021;22(11):1483. DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00597-0
6. Bergman A., Heindel J.J., Kasten T. et al. The impact of endocrine disruption: a consensus statement on the state of the science. Environ Health Perspect 2013;121(4):A104–6. DOI: 10.1289/ehp.1205448
7. Guidance on chemicals and health. Compendium of WHO and other UN guidance on health and environment. World Health Organization. 2021. Available at: https://www.who.int/tools/compendium-on-health-and-environment/chemicals.
8. Turusov V., Rakitsky V., Tomatis L. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks. Environ Health Perspect 2002;110(2):125–8. DOI: 10.1289/ehp.02110125
9. DDT, lindane, and 2,4-D. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer, 2018.
10. Vijverberg H.P., van der Zalm J.M., van der Bercken J. Similar mode of action of pyrethroids and DDT on sodium channel gating in myelinated nerves. Nature 1982;295(5850):601–3. DOI: 10.1038/295601a0
11. Läuger P., Martin H., Müller P. Über Konstitution und toxische. Wirkung von natürlichen und neuen synthetischen insektentötenden Stoffen 1944;27(1):892–928. DOI: 10.1002/hlca.194402701115
12. Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC, 1991.
13. Mansouri A., Cregut M., Abbes C. et al. The Environmental issues of DDT pollution and bioremediation: a multidisciplinary review. Appl Biochem Biotechnol 2017;181(1):309–39. DOI: 10.1007/s12010-016-2214-5
14. Resolving the DDT dilemma: protecting biodiversity and human health: World Wildlife Fund, 1998. Available at: https://www.wwf.eu/?4107/Resolving-the-DDT-Dilemma-Protecting-Biodiversity-and-Human-Health-June-1998-Executive-summary.
15. Dagen M. History of malaria and its treatment. In: Antimalarial agents. Ed. by G.L. Patrick. Elsevier, 2020. Pp. 1–48.
16. Karunaweera N.D., Galappaththy G.N., Wirth D.F. On the road to eliminate malaria in Sri Lanka: lessons from history, challenges, gaps in knowledge and research needs. Malar J 2014;13:59. DOI: 10.1186/1475-2875-13-59
17. Choudhury D.S. Malaria in India: past, present and future. Indian J Pediatr 1985;52(416):243–8. DOI: 10.1007/BF02754849
18. Мельников Н.Н. Пестициды: химия, технология и применение. М.: Химия, 1987. Melnikov N.N. Pesticides: chemistry, technology and application. Moscow: Khimiya, 1987. (In Russ.).
19. Carson R. Silent spring: 40th anniversary edition. Boston: Houghton Mifflin, 2002.
20. Loomis D., Guyton K., Grosse Y. et al. Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Lancet Oncol 2015;16(8):891–2. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00081-9
21. Stockholm convention on persistent organic pollutants. 2001. Available at: http://chm.pops.int/portals/0/repository/convention_text/unep-pops-cop-convtext-full.english.pdf.
22. Sitohang V., Sariwati E., Fajariyani S.B. et al. Malaria elimination in Indonesia: halfway there. Lancet Glob Health 2018;6(6):e604–6. DOI: 10.1016/S2214-109X(18)30198-0
23. World malaria report. Geneva, 2022. Available at: https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023.
24. Rehwagen C. WHO recommends DDT to control malaria. BMJ 2006;333(7569):622. DOI: 10.1136/bmj.333.7569.622-b
25. Regulation (EC) No 850/2004 of the European Parliament and of the Council on persistent organic pollutants and amending (Directive 79/117/EEC), 2004. Available at: https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:229:0005:0022:EN:PDF.
26. GEF. Projects database. Available at: https://www.thegef.org/projects-operations/database.
27. WHO guidelines for malaria. Geneva, 2023. Available at: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/373339/WHO-UCN-GMP-2023.01-Rev.1-eng.pdf.
28. Ndikumukiza C., Yunusa I., Nkurunziza J. et al. Adoption of RTS, S malaria vaccine for children younger than 5 years in Rwanda: a budget impact analysis. Explor Res Clin Soc Pharm 2021;3:100063. DOI: 10.1016/j.rcsop.2021.100063
29. Moon J.E., Greenleaf M.E., Regules J.A. et al. A phase IIA extension study evaluating the effect of booster vaccination with a fractional dose of RTS,S/AS01(E) in a controlled human malaria infection challenge. Vaccine 2021;39(43):6398–406. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.09.024
30. Devi S. 12 countries to get first doses of malaria vaccine. Lancet 2023;402(10397):172. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)01456-3
31. Daubenberger C.A., Moncunill G. Next-generation malaria subunit vaccines to reduce disease burden in African children. Lancet Infect Dis 2022;22(12):1655–6. DOI: 10.1016/S1473-3099(22)00523-0
32. Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2022.
33. Zhu X., Dsikowitzky L., Kucher S. et al. Formation and fate of point-source nonextractable DDT-related compounds on their

environmental aquatic-terrestrial pathway. Environ Sci Technol 2019;53(3):1305–14. DOI: 10.1021/acs.est.8b06018
34. Chattopadhyay S., Chattopadhyay D. Remediation of DDT and its metabolites in contaminated sediment. Current Pollution Reports 2015;1(4):248–64. DOI: 10.1007/s40726-015-0023-z
35. Xu H.J., Bai J., Li W. et al. Mechanisms of the enhanced DDT removal from soils by earthworms: identification of DDT degraders in drilosphere and non-drilosphere matrices. J Hazard Mater 2021;404(Pt. B):124006. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124006
36. Koureas M., Rousou X., Haftiki H. et al. Spatial and temporal distribution of p,p'-DDE (1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl) ethylene) blood levels across the globe. A systematic review and meta-analysis. Sci Total Environ 2019;686:440–51. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.261
37. Truong K.M., Cherednichenko G., Pessah I.N. Interactions of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and dichlorodiphenyldi chloroethylene (DDE) with skeletal muscle ryanodine receptor type 1. Toxicol Sci 2019;170(2):509–24. DOI: 10.1093/toxsci/kfz120
38. Chavez-Almazan L.A., Saldarriaga-Norena H.A, Díaz-González L. et al. Relationship between DDT concentrations with multiparity and breastfeeding history. Bull Environ Contam Toxicol 2023;111(3):27. DOI: 10.1007/s00128-023-03785-7
39. Lopez-Carrillo L., Torres-Sanchez L., Moline J. et al. Breast-feeding and serum p,p'DDT levels among Mexican women of childbearing age: a pilot study. Environ Res 2001;87(3):131–5. DOI: 10.1006/enrs.2001.4296
40. Wang H., Li J., Gao Y. et al. Xeno-oestrogens and phyto-oestrogens are alternative ligands for the androgen receptor. Asian J Androl 2010;12(4):535–47. DOI: 10.1038/aja.2010.14
41. Matsushima A. A novel action of endocrine-disrupting chemicals on wildlife; DDT and its derivatives have remained in the environment. Int J Mol Sci 2018;19(5):1377. DOI: 10.3390/ijms19051377
42. Danzo B.J. Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. Environ Health Perspect 1997;105(3):294–301. DOI: 10.1289/ehp.97105294
43. Roszko M.L., Kaminska M., Szymczyk K. et al. Endocrine disrupting potency of organic pollutant mixtures isolated from commercial fish oil evaluated in yeast-based bioassays. PLoS One 2018;13(5):e0197907. DOI: 10.1371/journal.pone.0197907
44. Wetterauer B., Ricking M., Otte J.C. et al. Toxicity, dioxin-like activities, and endocrine effects of DDT metabolites – DDA, DDMU, DDMS, and DDCN. Environ Sci Pollut Res Int 2012;19(2):403–15. DOI: 10.1007/s11356-011-0570-9
45. Wang L., Zhou L., Liu L. et al. Comparative in vitro and in silico study on the estrogenic effects of 2,2-bis(4-chlorophenyl)ethanol, 4,4'-dichlorobenzophenone and DDT analogs. Sci Total Environ 2023;876:162734. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.162734
46. Frigo D.E., Burow M.E., Mitchell K.A. et al. DDT and its metabolites alter gene expression in human uterine cell lines through estrogen receptor-independent mechanisms. Environ Health Perspect 2002;110(12):1239–45. DOI: 10.1289/ehp.021101239
47. Zhuang S., Zhang J., Wen Y. et al. Distinct mechanisms of endocrine disruption of DDT-related pesticides toward estrogen receptor alpha and estrogen-related receptor gamma. Environ Toxicol Chem 2012;31(11):2597–605. DOI: 10.1002/etc.1986
48. Wang L., Qie Y., Yang Y., Zhao Q. Binding and activation of estrogen-related receptor gamma: a novel molecular mechanism for the estrogenic disruption effects of DDT and its metabolites. Environ Sci Technol 2022;56(17):12358–67. DOI: 10.1021/acs.est.1c08624
49. Wojtowicz A.K., Gregoraszczuk E.L., Ptak A., Falandysz J. Effect of single and repeated in vitro exposure of ovarian follicles to o,p'-DDT and p,p'-DDT and their metabolites. Pol J Pharmacol 2004;56(4):465–72.
50. Stancel G.M., Ireland J.S., Mukku V.R., Robison A.K. The estrogenic activity of DDT: *in vivo* and *in vitro* induction of a specific estrogen inducible uterine protein by o,p'-DDT. Life Sci 1980;27(12):1111–7. DOI: 10.1016/0024-3205(80)90037-5
51. Morozova O.V., Riboli E., Turusov V.S. Estrogenic effect of DDT in CBA female mice. Exp Toxicol Pathol 1997;49(6):483–5. DOI: 10.1016/S0940-2993(97)80144-3
52. Klotz D.M., Ladlie B.L., Vonier P.M. et al. o,p'-DDT and its metabolites inhibit progesterone-dependent responses in yeast and human cells. Mol Cell Endocrinol 1997;129(1):63–71. DOI: 10.1016/s0303-7207(96)04041-5
53. Liu J., Zhao M., Zhuang S. et al. Low concentrations of o,p'-DDT inhibit gene expression and prostaglandin synthesis by estrogen receptor-independent mechanism in rat ovarian cells. PLoS One 2012;7(11):e49916. DOI: 10.1371/journal.pone.0049916
54. Turusov V.S., Day N.E., Tomatis L. et al. Tumors in CF-1 mice exposed for six consecutive generations to DDT. J Natl Cancer Inst 1973;51(3):983–97. DOI: 10.1093/jnci/51.3.983
55. Windham G.C., Lee D., Mitchell P. et al. Exposure to organochlorine compounds and effects on ovarian function. Epidemiology 2005;16(2):182–90. DOI: 10.1097/01.ede.0000152527.24339.17
56. Perry M.J., Ouyang F., Korrick S.A. et al. A prospective study of serum DDT and progesterone and estrogen levels across the menstrual cycle in nulliparous women of reproductive age. Am J Epidemiol 2006;164(11):1056–64. DOI: 10.1093/aje/kwj329
57. Yin S., Wei J., Wei Y. et al. Organochlorine pesticides exposure may disturb homocysteine metabolism in pregnant women. Sci Total Environ 2020;708:135146. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135146
58. Guo H., Jin Y., Cheng Y. et al. Prenatal exposure to organochlorine pesticides and infant birth weight in China. Chemosphere 2014;110:1–7. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.017
59. Tyagi V., Garg N., Mustafa M.D. et al. Organochlorine pesticide levels in maternal blood and placental tissue with reference to preterm birth: a recent trend in North Indian population. Environ Monit Assess 2015;187(7):471. DOI: 10.1007/s10661-015-4369-x
60. Anand M., Singh L., Agarwal P. et al. Pesticides exposure through environment and risk of pre-term birth: a study from Agra city. Drug Chem Toxicol 2019;42(5):471–7. DOI: 10.1080/01480545.2017.1413107
61. Jaga K., Dharmani C. Global surveillance of DDT and DDE levels in human tissues. Int J Occup Med Environ Health 2003;16(1):7–20.
62. Torres-Arreola L., Lopez-Carrillo L., Torres-Sanchez L. et al. Levels of dichloro-dyphenyl-trichloroethane (DDT) metabolites in maternal milk and their determinant factors. Arch Environ Health 1999;54(2):124–9. DOI: 10.1080/00039899909602247
63. Hui L.L., Hedley A.J., Kypke K. et al. DDT levels in human milk in Hong Kong, 2001-02. Chemosphere 2008;73(1):50–5. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.05.045
64. Al-Saleh I., Al-Doush I., Alsabbaheen A. et al. Levels of DDT and its metabolites in placenta, maternal and cord blood and their potential influence on neonatal anthropometric measures. Sci Total Environ 2012;416:62–74. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.11.020
65. Mekonen S., Ambelu A., Wondafrash M. et al. Exposure of infants to organochlorine pesticides from breast milk consumption in southwestern Ethiopia. Sci Rep 2021;11(1):22053. DOI: 10.1038/s41598-021-01656-x
66. Федоров Л.А., Яблоков А.В. Пестициды – токсический удар по биосфере и человеку. М.: Центр экологической политики России, 1999.
Fedorov L.A., Yablokov A.V. Pesticides – a toxic blow to the biosphere and man. Moscow: Tcentr ekologicheskoy politiki Rossii, 1999. (In Russ.).
67. Witczak A., Pohorylo A., Abdel-Gawad H. Endocrine-disrupting organochlorine pesticides in human breast milk: changes during lactation. Nutrients 2021;13(1):229. DOI: 10.3390/nu13010229
68. Coker E., Chevrier J., Rauch S. et al. Association between prenatal exposure to multiple insecticides and child body weight and body

composition in the VHEMBE South African birth cohort. Environ Int 2018;113:122–32. DOI: 10.1016/j.envint.2018.01.016
69. Chevrier J., Rauch S., Crause M. et al. Associations of maternal exposure to dichlorodiphenyltrichloroethane and pyrethroids with birth outcomes among participants in the venda health examination of mothers, babies and their environment residing in an area sprayed for malaria control. Am J Epidemiol 2019;188(1):130–40. DOI: 10.1093/aje/kwy143
70. Theile D., Haefeli W.E., Weiss J. Effects of adrenolytic mitotane on drug elimination pathways assessed in vitro. Endocrine 2015;49(3):842–53. DOI: 10.1007/s12020-014-0517-2
71. You L., Sar M., Bartolucci E. et al. Induction of hepatic aromatase by p,p'-DDE in adult male rats. Mol Cell Endocrinol 2001;178(1–2): 207–14. DOI: 10.1016/s0303-7207(01)00445-2
72. Holloway A.C., Stys K.A., Foster W.G. DDE-induced changes in aromatase activity in endometrial stromal cells in culture. Endocrine 2005;27(1):45–50. DOI: 10.1385/ENDO:27:1:045
73. Karmaus W., Osuch J.R., Landgraf J. et al. Prenatal and concurrent exposure to halogenated organic compounds and gene expression of CYP17A1, CYP19A1, and oestrogen receptor alpha and beta genes. Occup Environ Med 2011;68(6):430–7. DOI: 10.1136/oem.2009.053249
74. Kelce W.R., Stone C.R., Laws S.C. et al. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. Nature 1995;375(6532):581–5. DOI: 10.1038/375581a0
75. Maness S.C., McDonnell D.P., Gaido K.W. Inhibition of androgen receptor-dependent transcriptional activity by DDT isomers and methoxychlor in HepG2 human hepatoma cells. Toxicol Appl Pharmacol 1998;151(1):135–42. DOI: 10.1006/taap.1998.8431
76. Xu L.C., Sun H., Chen J.F. et al. Androgen receptor activities of p,p'-DDE, fenvalerate and phoxim detected by androgen receptor reporter gene assay. Toxicol Lett 2006;160(2):151–7. DOI: 10.1016/j.toxlet.2005.06.016
77. Patrick S.M., Bornman M.S., Joubert A.M. et al. Effects of environmental endocrine disruptors, including insecticides used for malaria vector control on reproductive parameters of male rats. Reprod Toxicol 2016;61:19–27. DOI: 10.1016/j.reprotox.2016.02.015
78. O'Connor J.C., Frame S.R., Davis L.G., Cook J.C. Detection of the environmental antiandrogen p,p-DDE in CD and long-evans rats using a tier I screening battery and a Hershberger assay. Toxicol Sci 1999;51(1):44–53. DOI: 10.1093/toxsci/51.1.44
79. Kelce W.R., Lambright C.R., Gray L.E., Roberts K.P. Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: *in vivo* confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. Toxicol Appl Pharmacol 1997;142(1):192–200. DOI: 10.1006/taap.1996.7966
80. Lundberg Giwercman Y. Androgen receptor genotype in humans and susceptibility to endocrine disruptors. Horm Res Paediatr 2016;86(4):264–70. DOI: 10.1159/000443686
81. You L., Gazi E., Archibeque-Engle S. et al. Transplacental and lactational transfer of p,p'-DDE in Sprague-Dawley rats. Toxicol Appl Pharmacol 1999;157(2):134–44. DOI: 10.1006/taap.1999.8673
82. Quan C., Shi Y., Wang C. et al. p,p'-DDE damages spermatogenesis via phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase depletion and mitochondria apoptosis pathway. Environ Toxicol 2016;31(5):593–600. DOI: 10.1002/tox.22072
83. Molina E.M., Kavazis A.N., Mendonca M.T., Akingbemi B.T. Effects of different DDE exposure paradigms on testicular steroid hormone secretion and hepatic oxidative stress in male Long-Evans rats. Gen Comp Endocrinol 2022;317:113963. DOI: 10.1016/j.ygcen.2021.113963
84. Brien S.E., Heaton J.P., Racz W.J., Adams M.A. Effects of an environmental anti-androgen on erectile function in an animal penile erection model. J Urol 2000;163(4):1315–21.
85. Longnecker M.P., Gladen B.C., Cupul-Uicab L.A. et al. In utero exposure to the antiandrogen 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethylene (DDE) in relation to anogenital distance in male newborns from Chiapas, Mexico. Am J Epidemiol 2007;165(9):1015–22. DOI: 10.1093/aje/kwk109
86. Garcia-Villarino M., Riano-Galan I., Rodriguez-Dehli A.C. et al. Association between pre/perinatal exposure to POPs and children's anogenital distance at age 4 years: a study from the INMA-Asturias cohort. Int J Hyg Environ Health 2020;229:113563. DOI: 10.1016/j.ijheh.2020.113563
87. Bornman R., Acerini C.L., Chevrier J. et al. Maternal exposure to DDT, DDE, and pyrethroid insecticides for malaria vector control and hypospadias in the VHEMBE birth cohort study, Limpopo, South Africa. Sci Total Environ 2022;845:157084. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.157084
88. Torres-Sanchez L., Zepeda M., Cebrian M.E. et al. Dichlorodiphen yldichloroethylene exposure during the first trimester of pregnancy alters the anal position in male infants. Ann N Y Acad Sci 2008;1140:155–62. DOI: 10.1196/annals.1454.004
89. Aneck-Hahn N.H., Schulenburg G.W., Bornman M.S. et al. Impaired semen quality associated with environmental DDT exposure in young men living in a malaria area in the Limpopo Province, South Africa. J Androl 2007;28(3):423–34. DOI: 10.2164/jandrol.106.001701
90. de Jager C., Aneck-Hahn N.H., Bornman M.S. et al. DDT exposure levels and semen quality of young men from a malaria area in South Africa. Malaria J 2012;11(1):P21. DOI: 10.1186/1475-2875-11-S1-P21
91. Bornman M., Delport R., Farias P. et al. Alterations in male reproductive hormones in relation to environmental DDT exposure. Environ Int 2018;113:281–9. DOI: 10.1016/j.envint.2017.12.039
92. Amir S., Tzatzarakis M., Mamoulakis C. et al. Impact of organochlorine pollutants on semen parameters of infertile men in Pakistan. Environ Res 2021;195:110832. DOI: 10.1016/j.envres.2021.110832
93. Regidor E., Ronda E., Garcia A.M., Dominguez V. Paternal exposure to agricultural pesticides and cause specific fetal death. Occup Environ Med 2004;61(4):334–9. DOI: 10.1136/oem.2003.009043
94. Lismer A., Shao X., Dumargne M.C. et al. The association between long-term DDT or DDE exposures and an altered sperm epigenome – a cross-sectional study of Greenlandic Inuit and South African VhaVenda men. Environ Health Perspect 2024;132(1):17008. DOI: 10.1289/EHP12013
95. Liu C., Shi Y., Li H. et al. p,p'-DDE disturbs the homeostasis of thyroid hormones via thyroid hormone receptors, transthyretin, and hepatic enzymes. Horm Metab Res 2011;43(6):391–6. DOI: 10.1055/s-0031-1277135
96. Kronke A.A., Jurkutat A., Schlingmann M. et al. Persistent organic pollutants in pregnant women potentially affect child development and thyroid hormone status. Pediatr Res 2022;91(3):690–8. DOI: 10.1038/s41390-021-01488-5
97. Yamazaki K., Itoh S., Araki A. et al. Associations between prenatal exposure to organochlorine pesticides and thyroid hormone levels in mothers and infants: the Hokkaido study on environment and children's health. Environ Res 2020;189:109840. DOI: 10.1016/j.envres.2020.109840
98. Chevrier J., Rauch S., Obida M. et al. Sex and poverty modify associations between maternal peripartum concentrations of DDT/E and pyrethroid metabolites and thyroid hormone levels in neonates participating in the VHEMBE study, South Africa. Environ Int 2019;131:104958. DOI: 10.1016/j.envint.2019.104958
99. Kim S., Cho Y.H., Won S. et al. Maternal exposures to persistent organic pollutants are associated with DNA methylation of thyroid hormone-related genes in placenta differently by infant sex. Environ Int 2019;130:104956. DOI: 10.1016/j.envint.2019.104956
100. Beck D., Ben Maamar M., Skinner M.K. Integration of sperm ncRNA-directed DNA methylation and DNA methylation-directed histone retention in epigenetic transgenerational inheritance. Epigenetics Chromatin 2021;14(1):6. DOI: 10.1186/s13072-020-00378-0

101. Hu J., Yang Y., Lv X. et al. Dichlorodiphenyltrichloroethane metabolites inhibit DNMT1 activity which confers methylation-specific modulation of the sex determination pathway. Environ Pollut 2021;279:116828. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.116828
102. Nilsson E., Klukovich R., Sadler-Riggleman I. et al. Environmental toxicant induced epigenetic transgenerational inheritance of ovarian pathology and granulosa cell epigenome and transcriptome alterations: ancestral origins of polycystic ovarian syndrome and primary ovarian insufiency. Epigenetics 2018;13(8):875–95. DOI: 10.1080/15592294.2018.1521223
103. Skinner M.K., Ben Maamar M., Sadler-Riggleman I. et al. Alterations in sperm DNA methylation, non-coding RNA and histone retention associate with DDT-induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. Epigenetics Chromatin 2018;11(1):8. DOI: 10.1186/s13072-018-0178-0
104. King S.E., McBirney M., Beck D. et al. Sperm epimutation biomarkers of obesity and pathologies following DDT induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. Environ Epigenet 2019;5(2):dvz008. DOI: 10.1093/eep/dvz008
105. da Cruz R.S., Dominguez O., Chen E. et al. Environmentally induced sperm RNAs transmit cancer susceptibility to offspring in a mouse model. Res Sq 2023:rs.3.rs-2507391. DOI: 10.21203/rs.3.rs-2507391/v1
106. McGlynn K.A., Abnet C.C., Zhang M.S. et al. Serum concentrations of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT) and 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) and risk of primary liver cancer. J Natl Cancer Inst 2006;98(14):1005–10. DOI: 10.1093/jnci/djj266
107. Zhao B., Shen H., Liu F. et al. Exposure to organochlorine pesticides is an independent risk factor of hepatocellular carcinoma: a case-control study. J Expo Sci Environ Epidemiol 2012;22(6):541–8. DOI: 10.1038/jes.2011.29
108. Barsouk A., Thandra K.C., Saginala K. et al. Chemical risk factors of primary liver cancer: an update. Hepat Med 2020;12:179–88. DOI: 10.2147/HMER.S278070
109. Jin X., Chen M., Song L. et al. The evaluation of p,p'-DDT exposure on cell adhesion of hepatocellular carcinoma. Toxicology 2014;322:99–108. DOI: 10.1016/j.tox.2014.05.002
110. McGlynn K.A., Quraishi S.M., Graubard B.I. et al. Persistent organochlorine pesticides and risk of testicular germ cell tumors. J Natl Cancer Inst 2008;100(9):663–71. DOI: 10.1093/jnci/djn101
111. Purdue M.P., Engel L.S., Langseth H. et al. Prediagnostic serum concentrations of organochlorine compounds and risk of testicular germ cell tumors. Environ Health Perspect 2009;117(10):1514–9. DOI: 10.1289/ehp.0800359
112. Brauner E.V., Sorensen M., Gaudreau E. et al. A prospective study of organochlorines in adipose tissue and risk of non-Hodgkin lymphoma. Environ Health Perspect 2012;120(1):105–11. DOI: 10.1289/ehp.1103573
113. Alavanja M.C., Hofmann J.N., Lynch C.F. et al. Non-Hodgkin lymphoma risk and insecticide, fungicide and fumigant use in the agricultural health study. PLoS One 2014;9(10):e109332. DOI: 10.1371/journal.pone.0109332
114. Quintana P.J., Delfino R.J., Korrick S. et al. Adipose tissue levels of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls and risk of non-Hodgkin's lymphoma. Environ Health Perspect 2004;112(8):854–61. DOI: 10.1289/ehp.6726
115. Frigo D.E., Burow M.E., Mitchell K.A. et al. DDT and its metabolites alter gene expression in human uterine cell lines through estrogen receptor-independent mechanisms. Environ Health Perspect 2002;110(12):1239–45. DOI: 10.1289/ehp.021101239
116. Jaga K. What are the implications of the interaction between DDT and estrogen receptors in the body? Med Hypotheses 2000;54(1):18–25. DOI: 10.1054/mehy.1998.0811
117. Lopez-Cervantes M., Torres-Sanchez L., Tobias A., Lopez-Carrillo L. Dichlorodiphenyldichloroethane burden and breast cancer risk: a meta-analysis of the epidemiologic evidence. Environ Health Perspect 2004;112(2):207–14. DOI: 10.1289/ehp.112-1241830
118. Tarone R.E. DDT and breast cancer. Environ Health Perspect 2008;116(4):A153-A. DOI: 10.1289/ehp.11025
119. Morgan D.P., Roan C.C. Loss of DDT from storage in human body fat. Nature 1972;238(5361):221–3. DOI: 10.1038/238221a0
120. Cohn B.A., Wolff M.S., Cirillo P.M., Sholtz R.I. DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. Environ Health Perspect 2007;115(10):1406–14. DOI: 10.1289/ehp.10260
121. Soto A.M., Sonnenschein C. Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. Nat Rev Endocrinol 2010;6(7):363–70. DOI: 10.1038/nrendo.2010.87
122. Cohn B.A., Cirillo P.M., Terry M.B. DDT and breast cancer: prospective study of induction time and susceptibility windows. J Natl Cancer Inst 2019;111(8):803–10. DOI: 10.1093/jnci/djy198
123. La Merrill M.A., Krigbaum N.Y., Cirillo P.M., Cohn B.A. Association between maternal exposure to the pesticide dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and risk of obesity in middle age. Int J Obes (Lond) 2020;44(8):1723–32. DOI: 10.1038/s41366-020-0586-7
124. Cirillo P.M., La Merrill M.A., Krigbaum N.Y., Cohn B.A. Grandmaternal perinatal serum DDT in relation to granddaughter early menarche and adult obesity: three generations in the child health and development studies cohort. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2021;30(8):1480–8. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-20-1456
125. Cohn B.A., La Merrill M., Krigbaum N.Y. et al. DDT Exposure in utero and breast cancer. J Clin Endocrinol Metab 2015;100(8):2865–72. DOI: 10.1210/jc.2015-1841
126. Krigbaum N.Y., Cirillo P.M., Flom J.D. et al. In utero DDT exposure and breast density before age 50. Reprod Toxicol 2020;92:85–90. DOI: 10.1016/j.reprotox.2019.11.002
127. Белицкий Г.А., Кирсанов К.И., Лесовая Е.А. и др. Химический канцерогенез и первичная профилактика рака. М.: АБВ-пресс, 2020. Belitsky G.A., Kirsanov K.I., Lesovaya E.A. et al. Chemical carcinogenesis and primary cancer prevention. Moscow: ABV-press, 2020. (In Russ.).
128. Sierra-Santoyo A., Hernandez M., Albores A., Cebrian M.E. Sex-dependent regulation of hepatic cytochrome P-450 by DDT. Toxicol Sci 2000;54(1):81–7. DOI: 10.1093/toxsci/54.1.81
129. Song L., Zhao J., Jin X. et al. The organochlorine p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane induces colorectal cancer growth through Wnt/beta-catenin signaling. Toxicol Lett 2014;229(1):284–91. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.06.003
130. Jin X.T., Song L., Zhao J.Y. et al. Dichlorodiphenyltrichloroethane exposure induces the growth of hepatocellular carcinoma via Wnt/beta-catenin pathway. Toxicol Lett 2014;225(1):158–66. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.12.006
131. Zhao M., Wang C., Zhang C. et al. Enantioselective cytotoxicity profile of o,p'-DDT in PC 12 cells. PLoS One 2012;7(8):e43823. DOI: 10.1371/journal.pone.0043823
132. Martin T.J., Maise J., Gabure S., Whalen M.M. Exposures to the environmental contaminants pentachlorophenol and dichlorodiphenyltrichloroethane increase production of the proinflammatory cytokine, interleukin-1beta, in human immune cells. J Appl Toxicol 2019;39(8):1132–42. DOI: 10.1002/jat.3798
133. Martin T.J., Gabure S., Maise J. et al. The organochlorine pesticides pentachlorophenol and dichlorodiphenyltrichloroethane increase secretion and production of interleukin 6 by human immune cells. Environ Toxicol Pharmacol 2019;72:103263. DOI: 10.1016/j.etap.2019.103263
134. Han E.H., Kim J.Y., Kim H.K. et al. o,p'-DDT induces cyclooxygenase-2 gene expression in murine macrophages: role of AP-1 and CRE promoter elements and PI3-kinase/Akt/MAPK

signaling pathways. Toxicol Appl Pharmacol 2008;233(2):333–42. DOI: 10.1016/j.taap.2008.09.003
135. Bratton M.R., Frigo D.E., Segar H.C. et al. The organochlorine o,p'-DDT plays a role in coactivator-mediated MAPK crosstalk in MCF-7 breast cancer cells. Environ Health Perspect 2012;120(9):1291–6. DOI: 10.1289/ehp.1104296
136. Shi Y., Song Y., Wang Y. et al. p,p'-DDE induces apoptosis of rat Sertoli cells via a FasL-dependent pathway. J Biomed Biotechnol 2009;2009:181282. DOI: 10.1155/2009/181282
137. Song Y., Liang X., Hu Y. et al. p,p'-DDE induces mitochondria-mediated apoptosis of cultured rat Sertoli cells. Toxicology 2008;253(1–3):53–61. DOI: 10.1016/j.tox.2008.08.013
138. Frigo D.E., Tang Y., Beckman B.S. et al. Mechanism of AP-1-mediated gene expression by select organochlorines through the p38 MAPK pathway. Carcinogenesis 2004;25(2):249–61. DOI: 10.1093/carcin/bgh009

Вклад авторов
О.В. Морозова: обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи;
А.Ю. Букина: обзор литературы по теме статьи, написание раздела о трансгенерационных эффектах ДДТ;
В.Г. Попова: анализ данных литературы о влиянии ДДТ на репродуктивную систему;
Г.И. Хайриева: анализ данных литературы о свойствах ДДТ как эндокринного дизраптора;
Г.Р. Сагитова: анализ данных литературы о молекулярных эффектах ДДТ;
Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов: проведение системного анализа, обобщение данных;
В.П. Максимова: проведение системного анализа, обобщение данных, написание текста статьи.
Authors' contributions
O.V. Morozova: literature review on the topic of the article, article writing;
A.Yu. Bukina: literature review on the topic of the article, writing a section on the transgenerational effects of DDT;
V.G. Popova: analysis of literature data on the effect of DDT on the reproductive system;
G.I. Khairieva: analysis of literature data on the properties of DDT as an endocrine disruptor;
G.R. Sagitova: analysis of literature data on the molecular effects of DDT;
G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov: system analysis, data generalization;
V.P. Maksimova: conducting a system analysis, summarizing data, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors
А.Ю. Букина / A.Yu. Bukina: https://orcid.org/0000-0002-0963-3432
В.Г. Попова / V.G. Popova: https://orcid.org/0000-0002-7301-605X
Г.И. Хайриева / G.I. Khairieva: https://orcid.org/0000-0001-5545-1157
Г.Р. Сагитова / G.R. Sagitova: https://orcid.org/0000-0003-3940-0661
Г.А. Белицкий / G.A. Belitsky: https://orcid.org/0000-0002-3167-7204
М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: https://orcid.org/0000-0002-9710-8178
К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: https://orcid.org/0000-0002-8599-6833
В.П. Максимова / V.P. Maksimova: https://orcid.org/0000-0003-0896-2952

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 № 23-25-00541).
Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 23-25-00541).

Статья поступила: 01.12.2023. **Принята к публикации:** 02.09.2024. **Опубликована онлайн:** 09.10.2024.
Article submitted: 01.12.2023. **Accepted for publication:** 02.09.2024. **Published online:** 09.10.2024.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-56-67

CC BY 4.0

Diagnostic potential of miRNA-135A1 in human papillomavirus associated cervical lesions

D.S. Elkin, M.I. Taubinskaya, N.V. Elkina, R.S. Faskhutdinov, M.D. Fedorova, A.N. Katargin, K.I. Zhordania, E.A. Mustafina, E.A. Grivachev, L.S. Pavlova, S.V. Vinokurova

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

Contacts: Danila Sergeevich Elkin *d.elkin@ronc.ru*

Introduction. Human papillomavirus (HPV) infection with high-risk HPVs is an etiological factor in the development of cervical cancer, with HPV type 16 (HPV16) being the most common. The mechanisms leading to disruption of viral oncogene expression and initiation of epithelial cell transformation are poorly understood. Epigenetic regulatory factors, including cellular miRNAs, may play an important role in HPV-induced carcinogenesis, and aberrantly expressed miRNAs may be promising markers for the diagnosis of HPV-associated lesions.

Aim. To search for miRNAs involved in the pathogenesis of HPV16-associated cervical cancer and to evaluate their diagnostic potential for the detection of cervical cancer and precancerous lesions.

Materials and methods. MiRNA expression in clinical samples was assessed by both next generation sequencing and quantitative stem-loop polymerase chain reaction (sl-qPCR). Plasma miRNAs from patients with precancerous and cancerous lesions and healthy donors were analyzed using sl-qPCR. Loss of heterozygosity in cervical cancer samples was assessed by copy number ratio of *MIR135A1* and *ACTB* genes. A total of 67 patients with cervical cancer, 21 with precancerous cervical lesions and 24 healthy donors were included in the study. The effect of DNA methylation on miRNA-135A1 expression was evaluated after treatment with a demethylating agent of the cervical HPV16-positive SiHa cell line. Changes in the expression of the HPV16 *E6* oncogene were analyzed after transfection with synthetic analogues of the mature forms of miRNA-135A1 (miRNA-135a-3p and miRNA-135a-5p).

Results. A significant decrease in the expression of miRNA-135A1 and miRNA-135A2 was detected in tumor tissue samples from HPV16-positive cervical cancer, which was confirmed by sl-qPCR in an independent panel of tumor samples. A decrease in miRNA-135A1 expression was shown to result from both loss of heterozygosity of the gene and aberrant DNA methylation. Transfection of mature forms of miRNA-135A1 into SiHa cells resulted in decreased expression of the *E6* oncogene of HPV16. Blood plasma samples from patients with cervical cancer and precancerous lesions showed lower levels of miRNA-135a-3p than healthy donors, and ROC analysis indicated its high diagnostic potential.

Conclusion. Levels of miRNA-135A1 are significantly reduced in cervical lesions, both in tumor tissue and plasma, and the ability of this miRNA to suppress the expression of the HPV16 *E6* oncogene suggests its oncosuppressive properties. Thus, miRNA-135A1 can be used as a promising new marker for the diagnosis of HPV-associated lesions.

Keywords: cervical precancerous lesion, cervical cancer, human papillomavirus, miRNA-135A1

For citation: Elkin D.S., Taubinskaya M.I., Elkina N.V. et al. Diagnostic potential of miRNA-135A1 in HPV-associated cervical lesions. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(3):56–67.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-56-67

Диагностический потенциал микроРНК-135A1 при ассоциированных с вирусом папилломы человека поражениях шейки матки

Д.С. Елкин, М.И. Таубинская, Н.В. Елкина, Р.С. Фасхутдинов, М.Д. Федорова, А.Н. Катаргин, К.И. Жордания, Е.А. Мустафина, Е.А. Гривачев, Л.С. Павлова, С.В. Винокурова

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

Контакты: Данила Сергеевич Елкин *d.elkin@ronc.ru*

Введение. Инфекция вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска является этиологическим фактором развития рака шейки матки, причем наиболее распространенным является ВПЧ 16-го типа (ВПЧ16). Механизмы, приводящие к нарушению экспрессии вирусных онкогенов и запуску процесса онкотрансформации, не-

достаточно изучены. Эпигенетические факторы регуляции, в том числе клеточные микроРНК, могут играть большую роль в ВПЧ-индуцированном канцерогенезе, а аберрантно экспрессированные микроРНК рассматриваться как перспективные маркеры для диагностики ВПЧ-ассоциированных поражений.

Цель исследования – поиск микроРНК, вовлеченных в патогенез ВПЧ16-ассоциированного рака шейки матки, и оценка их диагностического потенциала для выявления рака или предраковых поражений шейки матки.

Материалы и методы. Экспрессию микроРНК в клинических образцах оценивали с помощью секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) и количественной stem-loop полимеразной цепной реакции (sl-кПЦР), для анализа микроРНК в плазме крови использовали sl-кПЦР. Потерю гетерозиготности в образцах рака шейки матки оценивали по соотношению числа копий генов *MIR135A1* и *ACTB*. Всего в исследование вошли 67 пациентов с раком шейки матки, 21 с предраковыми поражениями шейки матки и 24 здоровых донора. Влияние метилирования ДНК на экспрессию микроРНК-135A1 оценивали после обработки деметилирующим агентом цервикальной ВПЧ16-положительной клеточной линии SiHa. Изменение экспрессии онкогена *E6* ВПЧ16 оценивали после трансфекции синтетических аналогов зрелых форм микроРНК-135a-3p и микроРНК-135a-5p.

Результаты. В образцах опухолевой ткани ВПЧ16-положительного рака шейки матки выявлено значительное снижение экспрессии микроРНК-135A1 и микроРНК-135A2, что подтверждено на независимой выборке опухолевого материала методом sl-кПЦР. Снижение экспрессии микроРНК-135A1 может быть обусловлено как потерей гетерозиготности соответствующего гена, так и аберрантным метилированием ДНК. Трансфекция зрелых форм микроРНК в клетки SiHa приводила к снижению экспрессии онкогена *E6* ВПЧ16. В образцах плазмы крови пациентов с РШМ и предраковыми поражениями наблюдается более низкий уровень микроРНК-135a-3p, чем у здоровых доноров, а проведенный ROC-анализ указывает на ее высокую диагностическую значимость.

Заключение. Уровень микроРНК-135A1 значительно снижен при цервикальных поражениях как в опухолевой ткани, так и в плазме крови, а способность данной микроРНК подавлять экспрессию онкогена *E6* ВПЧ16 говорит о наличии у нее онкосупрессорных свойств. Таким образом, микроРНК-135A1 является перспективным маркером для диагностики ВПЧ-ассоциированных поражений.

Ключевые слова: предраковое поражение шейки матки, рак шейки матки, вирус папилломы человека, микроРНК-135A1

Для цитирования: Елкин Д.С., Таубинская М.И., Елкина Н.В. и др. Диагностический потенциал микроРНК-135A1 при ассоциированных с вирусом папилломы человека поражениях шейки матки. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(3):56–67. (На англ.).

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-56-67

INTRODUCTION

Cervical cancer (CC) is the fourth most common cancer in women worldwide, with a mortality rate of over 50 % (according to the World Health Organization). The etiological factor of CC is infection with high-risk human papillomaviruses (HPV), of which HPV type 16 (HPV16) is detected in more than 60 % of cases [1]. High-risk HPV infection is the cause not only of CC, but also of some anogenital tumors (vagina, anus, penis and vulva) and head and neck tumors (oropharynx, larynx, nasal cavity and mouth) [2, 3]. Human papillomaviruses are double-stranded DNA viruses that infect the epithelium. Human papillomavirus genomes contain regions encoding early viral genes (*E1*, *E2*, *E4*, *E5* and oncogenes *E6*, *E7*), late genes (*L1* and *L2*) and a non-coding regulatory region, the upstream regulatory region (URR). The products of the early genes are required for viral replication, regulation of its transcription, stimulation of growth and division of infected epithelial cells, while the late genes encode proteins of the viral capsid envelope. The viral oncogenes *E6* and *E7* play a key role in ensuring the normal life cycle of the virus and maintaining the enhanced proliferative potential of the cells. They interact with the tumor growth suppressor proteins p53 and pRB, leading to their degradation and subsequent inhibition of apoptosis and increased cell proliferation [4]. Human papillomavirus infection of the cervical epithelium occurs through its micro-damage, when the virus enters the basal mitotically active cells of the epithelium. This is followed by the lag phase of viral infection, when viral gene expression is at a minimal level and there are no clinical manifestations [5]. In 90 % of cases, high-risk HPV infections are completely cleared by the immune system within 1–2 years [6–8]. However, in 10 % of cases, the infection can become permissive, which is characterized by activation of viral gene expression, active viral replication and the formation of cervical intraepithelial neoplasia grade 1 (CIN1), which is characterized by disturbed differentiation and active proliferation of cells in the lower layers of the epithelium, and transformed cells are found in only half of cases [9, 10]. This infection can last for several years and regression occurs in 90 % of cases, but progression to moderate to severe CIN grade 2 (CIN2) and 3 (CIN3) neoplasia is sometimes observed [11]. These types of lesions are characterized by the development of a transforming HPV infection associated with increased expression of the viral oncogenes *E6* and *E7*, leading to active proliferation of undifferentiated cells of the middle and upper layers of the epithelium, genetic instability and accumulation of mutations that contribute to further progression of the disease [12]. The rate of progression from CIN3 to carcinoma *in situ* and invasive CC is already over 50 %, significantly higher than the CC risk levels for CIN1 and CIN2 [13]. The mechanisms underlying the increased expression of *E6* and *E7* oncogenes during the transition from permissive to transforming infection are currently poorly understood. Until recently, it was thought that the main

mechanism leading to impaired expression of viral oncogenes was the integration of viral DNA into the host cell genome, followed by the loss of expression of the viral protein E2, which negatively regulates the expression of viral oncogenes [14, 15]. However, it has now been shown that HPV DNA integration occurs later in the progression of CIN, while transformed epithelial cells are detected as early as CIN1 [9, 10]. Furthermore, even at the stage of HPV-associated invasive tumors, the viral genome may be present as extrachromosomal circular DNA molecules (episomes) without disruption of E2 protein expression [16, 17].

To date, a large body of data has accumulated indicating an important role for epigenetic regulation in the pathogenesis of virus-associated tumors, including through miRNAs, which can both directly regulate viral transcripts by degrading or stabilizing them, and modulate the function of cellular signaling pathways, thus providing optimal conditions for the viral life cycle [18]. An example of direct interaction between cellular miRNAs and oncoviruses is the suppression of HPV16 *E6* and *E7* oncogene expression under the influence of cellular miRNA-375 and miRNA-187, which is accompanied by restoration of p53 and pRB levels, suppression of cell proliferative activity, migration and invasion, and induction of apoptosis [19–21]. Notably, the expression levels of these miRNAs are significantly reduced in CC tumor tissue compared to normal tissue, which in the case of miRNA-187 is associated with reduced overall and relapse-free survival [19].

In this context, the search for cellular miRNAs that directly regulate viral oncogenes and whose levels are reduced in CC is an urgent task that will allow us to complement the mechanisms of HPV-induced cellular oncotransformation and to characterize new oncosuppressor miRNAs that could form the basis of new diagnostic tests under development.

MATERIALS AND METHODS

Clinical samples. The material used to search for differentially expressed miRNAs by next-generation sequencing (NGS) and to validate the results by the independent method were paraffin sections of CC, from which tumor and adjacent morphologically normal tissue were obtained by microdissection. Fresh frozen cervical squamous cell carcinoma tissue was used to analyze the presence of heterozygosity of the *MIR135A1* gene. Blood plasma from CC patients, CIN patients and healthy donors was used for the analysis of free circulating miRNAs. Cervical swabs collected in BD SurePath™ transport medium (Becton Dickinson, USA) were used for HPV DNA detection and HPV type identification in patients with cervical dysplasia. All samples were collected from patients treated in the Department of Oncogynaecology, clinical diagnosis was confirmed in the Department of Pathological Anatomy of Human Tumors N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. The clinical and morphological characteristics of the samples used in the work are shown in table 1.

Cell culture. The SiHa cervical HPV16-positive cell line (ATCC-HTB-35) was used in this study. Cells were

Table 1. *Clinical and morphological characteristics of cervical cancer patients, patients with cervical dysplasia and healthy donors*

Parameter	Cervical cancer patients	Patients with dysplastic lesions of the cervix	Healthy donors
Age, years, median (Q_1–Q_3)	42 (35–49)	37 (32.5–46.5)	27.5 (25.0–33.8)
Primary tumor size, *n* (%): T1 T2 Tis	 48 (72) 14 (21) 5 (7)	–	–
Presence/absence of lymphogenic metastases, *n* (%): N0 N1 Nx	 45 (67) 15 (22) 7 (11)	–	–
Presence/absence of distant metastases, *n* (%): M0	 67 (100)	–	–
Stage of disease (cervical tumor/dysplasia), *n* (%): I II III *in situ*	 37 (55) 12 (18) 14 (21) 4 (6)	–	–
Cervical tumor/dysplasia, *n* (%): CIN1 CIN2 CIN3/*in situ*	–	 4 (19) 4 (19) 13 (62)	–
Total	*67*	*21*	*24*

Note. *Q_1 – 1st quartile; Q_3 – 3rd quartile; CIN1 – cervical intraepithelial neoplasia grade 1; CIN2 – cervical intraepithelial neoplasia grade 2; CIN3 – cervical intraepithelial neoplasia grade 3.*

cultured in DMEM medium supplemented with glutamine and glucose 4.5 g/l (PanEco Ltd., Russia), 10 % fetal bovine serum (Biowest, France) and antibiotics Pen-Strep Solution (Biological Industries®, USA) at 37 °C, 5 % CO_2.

For transfection of cells with synthetic miRNA-135a-3p and miRNA-135a-5p analogues (DNA-Synthesis, Russia), the cationic lipid reagent siLentFect™ Lipid Reagent (Bio-Rad Laboratories, USA) was used according to the manufacturer's instructions. Transfection was performed at an oligonucleotide concentration of 50 nM and results were evaluated after 48 h. SiHa cells were treated with the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC, Sigma-Aldrich, USA) for 96 h, with partial replacement of the culture medium with DAC every 24 h.

MiRNA isolation and expression analysis. Material obtained after microdissection of tumor and adjacent normal tissue from HPV16-positive cervical squamous cell carcinoma was subjected to NGS at Genoanalytika (Russia) using an Illumina HiSeq® 1500 sequencer (USA).

MiRNAs were isolated from paraffin sections using the ReliaPrep™ FFPE Total RNA Miniprep System Kit (Promega, USA), from fresh frozen tissue using the PureLink™ miRNA Isolation Kit (Invitrogen, USA), and from blood plasma using the miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, USA). MiRNA levels were measured using the Qubit™ miRNA assay kit (Invitrogen, USA) with a Qubit Fluorimeter 2.0 instrument (Invitrogen, USA).

The expression levels of miRNA-135a-3p and miRNA-135a-5p were analyzed by stem-loop real-time PCR [22] using 'TaqMan MiRNA Assays' kits ID002232 and ID000460 (Applied Biosystems, USA), PCR transcription was performed using 'TaqMan MiRNA Reverse Transcription Kit' (Applied Biosystems, USA), PCR was performed using qPCRmix-HS mix kit (Evrogen, Russia). To assess the expression level of miRNA-16b-5p, we used the gene-specific primer for cDNA synthesis 5'-GTTGGCTCTGG TGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCC AACCGCCAA-3', forward (F) and reverse (R) primers for PCR -F: 5'-GTTTGGTGGTAGCAGCAGCACGTAAA TA-3', R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' and TaqMan assay (TM) 5'-FAM-TTGGCGGTGGTTGGCTCTG-BHQ1-3'. Oligonucleotides were synthesized by DNA-Synthesis LLC (Russia).

Isolation and analysis of mRNA expression. RNA was isolated from SiHa cells using the MagZol reagent kit (Magen, China) according to the manufacturer's instructions. RNA was treated with DNase I (Invitrogen, USA) and cDNA synthesis was performed using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). The following primers were used for real-time PCR: HPV16 *E6* gene F: 5'-GTTACTGC GACGACGTGAGGTATATG-3'; R: 5'-CATTTATCACAT ACAGCATATATGGATTC-3'; *ACTB* gene F: 5'-ATGTGGCCGAGGAGGACTTTGATT-3'; R: 5'-AGT GGGGGGGTGGGCTTTTAGGATG-3'. Real-time PCR was performed using qPCRmix-HS SYBR reagent (Evrogen, Russia).

Evaluation of heterozygosity of the *MIR135A1* gene. The material for analysis was a collection of DNA from squamous cell carcinoma tumor tissue isolated by the standard technique of ultracentrifugation in a cesium chloride density gradient [23] with modifications [24]. Plasmids containing the *MIR135A1* gene locus and *ACTB* were prepared for the construction of calibration curves. Amplification of the DNA fragment containing the *MIR135A1* gene was performed using the following primers and TaqMan probes: forward primer: 5'-TTGCTCAGTGTCAGAACCC-3'; reverse primer: 5'-GGTTGGGGGGTGGAAGAAGAAGTG-3', probe: 5'-FAM-TGCGCCACGGCTCCAATCCC-BHQ1-3'; *ACTB* gene: forward primer: 5'-CAAGTCTTCTTCTGGACTGTGA-3'; reverse primer: 5'-CTCCCTTGAAGGTTGCAGAGAG-3', probe: 5'-HEX-AGCCACTGTGTGCTGGGTGGTGG-BHQ1-3'. To determine the number of copies of each gene, real-time PCR was performed on the DNA matrix of the CC samples and a calibration curve was constructed. The presence of loss of heterozygosity (LOH) was assessed by the ratio of the number of *MIR135A1* and *ACTB* gene copies for each sample (the criterion for the presence of LOH was a value less than 0.6).

Human papillomavirus type identification. To determine the HPV status of patients with CIN, DNA was isolated from cervical smears using the AmpliSens® DNA-Sorb-D kit (Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Russia). The HPV type detection kit AmpliSens® HPV VKR genotype-FL (Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Russia) was also used according to the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis. Statistical evaluation of the data obtained was performed using GraphPad Prism 9.5.1 software. The relative change in RNA expression was calculated using the ΔΔCt method, miRNA – normalised ΔΔCt values were compared. The Mann-Whitney U criterion was used to assess the reliability of the change in miRNA expression in tumor tissue compared to normal tissue, as well as the change in *E6* oncogene expression. The Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparisons was used to statistically process the data from the demethylating agent treatment experiment and to compare miRNA levels in different groups of blood plasma samples. The correlation between miRNA-135a-5p levels and copy number ratio of *MIR135A1* and *ACTB* genes was assessed using Pearson's parametric correlation criterion.

RESULTS

Decreased expression of miRNA-135 in cervical cancer tumor tissue. To search for aberrantly expressed miRNAs in CC, we analyzed the levels of miRNAs in transformed cervical epithelium compared to adjacent morphologically normal epithelium by NGS. Paraffin sections from 9 paired cases of cervical squamous cell carcinoma were used for the study. Only HPV16-positive CC samples were used

in this study because this type of HPV is the most common etiological factor in the development of CC and this selection also allowed the sample to be more homogeneous. Microdissection of tumor tissue and adjacent normal epithelium was performed to enrich the study material and minimize the presence of stromal components in the samples examined.

Analysis of the NGS results showed that tumor tissue and adjacent normal cervical tissue have different miRNA expression patterns; 65 miRNAs showed significant differences, of which 25 miRNAs were overexpressed and 40 miRNAs showed reduced levels in tumor tissue (fig. 1, *a*). In this study, we primarily focused on those differentially expressed miRNAs that met the following selection criteria. First, these miRNAs should be characterized by a low level of expression in tumor tissue compared to the adjacent normal cervical epithelium, i. e. they should be potential oncosuppressor miRNAs. Second, the investigated miRNAs should be able to suppress viral gene expression and thus have direct antiviral effects. Among all differentially expressed miRNAs, miRNA-135A1 and miRNA-135A2, whose expression is significantly reduced in tumor tissue (see fig. 1, *a*), met the selection criteria and these miRNAs have 4 potential interaction sites with HPV16 transcripts according to bioinformatic analysis using the RegRNA 2.0 service [25].

The human miRNA-135 family is represented by 3 genes that encode the formation of 3 miRNA precursors, which are processed to form 5 unique sequences of the mature forms of miRNA-135 (fig. 1, *b*). The miRNA-135 genes are located on three different chromosomes and encode the formation of three pre-miRNAs: the *MIR135A1* gene on chromosome 3 (3p.21.2), the *MIR135A2* gene on chromosome 12 (12q23.1) and the *MIR135B* gene on chromosome 1 (1q32.1). The processing of miRNA-135 precursors results in the formation of 5 unique mature forms of miRNAs – miRNA-135a-5p, miRNA-135a-3p, miRNA-135a-2-3p, miRNA-135b-3p and miRNA-135b-5p. Furthermore, the mature 5p forms of miRNA-135 are characterized by a high degree of homology (96 % or more), whereas the 3p forms are 60 % identical (fig. 1, *c*). In this study, we also focused on the expression of the mature forms of miRNA-135a-5p and miRNA-135a-3p, which are the products of the *MIR135A1* gene, whose expression level is most reduced in CC according to NGS data.

High-throughput NGS data were validated by an independent method on a large sample set of paired clinical cases of CC. The tumor material sample included 23 paired samples of HPV16-positive cervical squamous cell carcinoma and adjacent morphologically normal epithelium. Mature forms of miRNA-135A1 were detected by reverse transcription and quantitative real-time polymerase chain reaction in a stem-loop PCR modification [22]. As shown in fig. 2, *a*, 12 out of 23 tumor tissue samples show a more than 2-fold decrease in miRNA-135a-5p expression, while 10 samples show no change in miRNA-135a-5p level or up to a 2-fold increase compared to normal epithelium. The expression level of miRNA-135a-3p was decreased more than 2-fold in 7 out of 23 tumor tissue samples, in 15 samples there was a less pronounced suppression

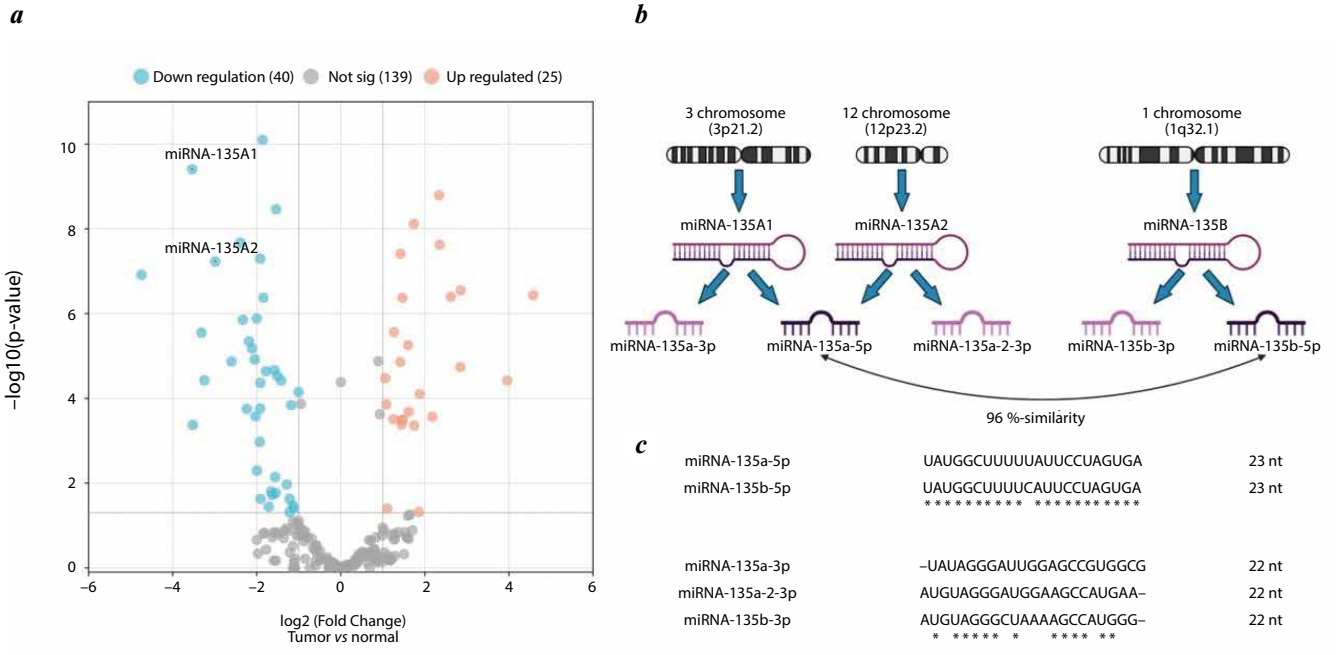


Fig. 1. *Differential miRNA expression in HPV16-positive (HPV16 – human papillomavirus type 16) cervical cancer and representation of selected miRNA-135 family: a – volcano plot showing the differential expression of miRNA in HPV16-positive cervical cancer samples as a function of significance level. The x-axis shows the log2 of the ratio of miRNA levels in tumor tissue to normal tissue, the y-axis shows the negative log10 of the p-value significance level; b – schematic representation of genes, precursors and mature forms of miRNA-135; c – alignment of nucleotide sequences of mature forms of miRNA-135. Asterisks indicate nucleotides that match in the compared miRNA sequences*

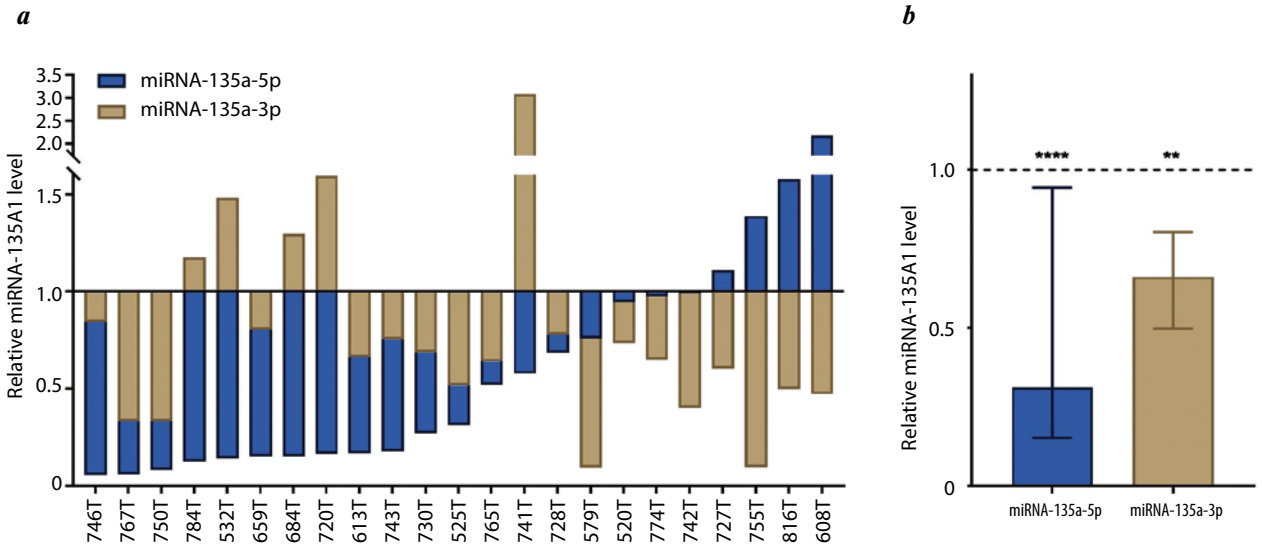


Fig. 2. *Relative expression levels of miRNA-135a-5p and miRNA-135a-3p in cervical tissue: a – relative expression levels of miRNA-135a-5p and miRNA-135a-3p in paired samples of cervical squamous cell carcinoma compared to adjacent normal epithelium. The solid line indicates the level of miRNA expression in the morphologically normal epithelium from which the calculations were made; b – graph showing the total change in the relative expression level of miRNA-135a-5p and miRNA-135a-3p in tumor tissue compared to the adjacent normal epithelium in all cervical cancer samples analyzed. The dotted line indicates the expression level in the normal epithelium from which the calculations were made. **p <0.01; ****p <0.0001.*

of expression or its increase up to 2-fold. It is worth noting that in 17 out of 23 samples (more than 70 %) the expression of at least one of the mature forms of miRNA-135A1 was significantly decreased by less than 2-fold, and in only two out of 23 samples (less than 10 %) was its expression increased by more than 2-fold. Thus, the majority of CC samples were indeed characterized by low levels of mature miRNA-135a-5p and miRNA-135a-3p expression (fig. 2, *b*).

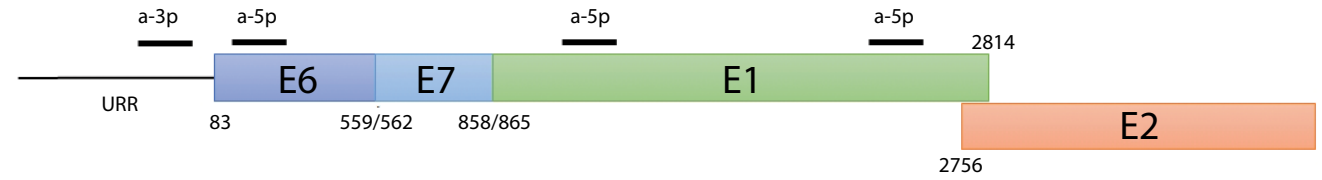
Thus, the expression of miRNA-135A1 is significantly reduced in the majority of CC tumor tissue samples compared to the conditionally normal adjacent epithelium, indicating its potential oncosuppressive properties. However, a low level of expression of the gene under investigation in tumor tissue does not necessarily indicate that it can be characterized as an oncosuppressor. As mentioned above, the selected miRNAs should also be able to inhibit the expression of viral transcripts, including viral oncogenes, whose increased expression is required for both the initiation and maintenance of HPV-associated oncotransformation of cells.

Changes in the expression of viral oncogenes under the influence of miRNA-135A1. A bioinformatic search for potential interaction sites of miRNA-135a-5p and miRNA-135a-3p isoforms using the RegRNA2.0 service [25] with HPV16 transcripts revealed 4 potential interaction sites, one of which is located in the reading frame of the viral oncogene *E6* and the others are located in the reading frame of the viral helicase *E1* and in the non-coding regulatory region URR (fig. 3, *a*). The positions of miRNA 135a-5p and miRNA-135a-3p interaction sites and their level of significance are listed in the table in fig. 3, *b*. It should be noted that in addition to the presence of a miRNA-135a-5p binding site in the reading frame of the *E6* oncogene, the URR regulatory region also contains a miRNA-135a-3p interaction site (see fig. 3, *a*), the effect of which may be mediated by non-coding regulatory RNA located in this region [26]; therefore, a role for miRNA-135a-3p in the regulation of *E6* oncogene expression cannot be excluded.

To evaluate the effect of the miRNAs on the expression of the *E6* viral oncogene, synthetic analogues of the mature forms of miRNA-135a-3p and miRNA-135a-5p were transfected into the cervical HPV16-positive SiHa cell line, containing 1–2 copies of the viral genome per cell (fig. 3, *c*). It was shown that transfection of miRNA-135a-3p and miRNA-135a-5p oligonucleotides into SiHa cells resulted in a decrease in the level of *E6* oncogene mRNA, suggesting a potential oncosuppressive role of this miRNA through suppression of *E6* oncogene expression and, consequently, HPV-associated cell transformation.

Mechanisms responsible for the reduced expression of miRNA-135A1. The processes leading to changes in miRNA expression in tumor cells are extremely diverse and include many genetic and epigenetic mechanisms. One of the mechanisms leading to decreased miRNA-135A1 levels in tumor tissue compared to normal tissue may be LOH of the gene encoding the miRNA-135A1 precursor. The *MIR135A1* gene in the human genome is located on the short arm of chromosome 3 (3p21.2), which is characterized by a high frequency of LOH in CC [27]. To test this hypothesis, the ratio of *MIR135A1* gene copy number to β-actin (*ACTB*) gene copy number was analyzed in 41 HPV16-positive CC samples using quantitative real-time PCR. As shown in fig. 4, *a*, more than 30 % (13 of 41)

a



b

Position in HPV16 (AF125673.1)	Score	Energy (kCal/Mol)	Interaction scheme
7544-7567 (URR)	150	–29.00	135–3p: 3'gcGGUGC–CGAGG–UUAGGGAUAu 5' HPV16: 5'tqCCATGCGTGCCAAATCCCTGTt 3'
260-282 (*E6*)	145	-18.92	135–5p: 3' agUGUAUCCUUAUUUUUCGGUAu 5' HPV16: 5' gtATATAGAGATGGGAATCCATa 3'
1183-1203 (*E1*)	145	–11.59	135–5p: 3' aguGUAUCCUUAUUUUUCGGUAu 5' HPV16: 5' aqtCCTAG--ATTAAAAGCTATa 3'
2364-2386 (*E1*)	150	–10.92	135–5p: 3' aguguauccuuauUUUUCGGUAu 5' HPV16: 5' ttttgtaaattctAAAAGCCATt 3'

c

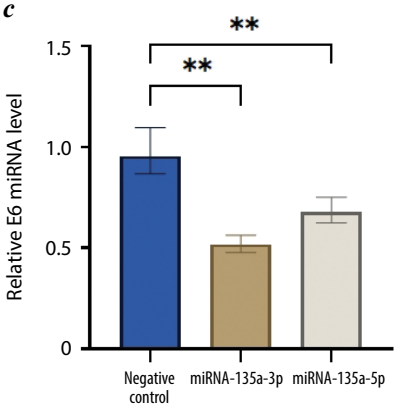


Fig. 3. *Effect of miRNA-135A1 on human papillomavirus type 16 (HPV16) oncogene mRNA levels: a — potential interaction sites of miRNA-135a-3p (a-3p) and miRNA-135a-5p (a-5p) in the HPV16 genomic region containing early genes. Upstream regulatory region (URR), non-coding regulatory region of HPV16; E6, E7, E1 and E2, early genes of HPV16; b — table showing the positions of potential miRNA-135a-5p and miRNA-135a-3p interaction sites in the HPV16 genome obtained using the RegRNA2.0 service with the features describing the significance of the identified sites; c — relative mRNA expression level of HPV16 oncogene E6 after transfection of SiHa cell line with synthetic analogues of miRNA-135a-3p and miRNA-135a-5p. **p <0.01*

of the squamous cell carcinoma samples analyzed show LOH in the genomic region containing the *MIR135A1* gene, which is consistent with literature data showing LOH at this locus in 33–48 % of cases [27, 28]. The results support the hypothesis that the decrease in miRNA-135A1 levels in a proportion of CC cases may be due to the loss of one of the copies of the *MIR135A1* gene, as confirmed by correlation analysis performed on a group of 17 CC samples (fig. 4, *b*).

In addition to chromosomal aberrations resulting from general tumor genetic instability, disruption of epigenetic regulation, such as aberrant DNA methylation, alteration of the histone code and others, can lead to decreased gene expression, including miRNA. To investigate the effect of DNA methylation on miRNA-135A1 levels, we treated cervical HPV16-positive SiHa cells with the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) and then evaluated the change in expression of miRNA-135a-3p and miRNA-135a-5p (fig. 4 *c*, *d*). The use of the SiHa cell line as a model in this experiment was due to the fact that the expression level of mature forms of miRNA-135a-5p and miRNA-135a-3p was significantly reduced in this cell line compared to another HPV16-positive CaSki cell line (data not shown). If the low level of miRNA-135A1 expression in the SiHa cell line is due to DNA hypermethylation, then treatment of the cells with the demethylating agent DAC would be expected to restore miRNA-135A1 expression. As shown in fig. 4, *c*, the expression level of miRNA-135a-3p did not change upon treatment of SiHa cells with DAC, whereas the expression of miRNA-135a-5p increased 2-3-fold (fig. 4, *d*); moreover, there is a direct correlation between the expression level of miRNA-135a-5p and the concentration of DAC demethylating agent. It should be emphasized that the results obtained are only indirect evidence that DNA methylation regulates the expression level of miRNA-135A1, since the treatment of cells with demethylating agents represents a non-specific epigenetic effect in which genome-wide demethylation occurs. Furthermore, in this case it is not possible to unambiguously assess the effect of general DNA demethylation on the expression of each of the three miRNA-135 genes, due to the high degree of homology of the 5p isoforms of miRNA-135 and the inability to selectively detect each of them. In addition, it is not possible to assess the effect of DNA methylation on miRNA-135A1 levels in clinical samples of tumor material, as there is no known region of the genome whose methylation uniquely regulates miRNA-135A1 expression. A more thorough search for genomic loci with CpG-containing regulatory sequences whose methylation level directly affects miRNA-135A1 expression is required in the future.

This suggests that miRNA-135A1 is a potential oncosuppressor miRNA in cervical cancer, with significantly reduced levels in tumor tissue compared to normal tissue. The suppression of miRNA-135A1 expression in a proportion of samples may be due to LOH of the miRNA-135A1 gene and may also depend on the level of DNA methylation. Importantly, both isoforms of this miRNA can suppress

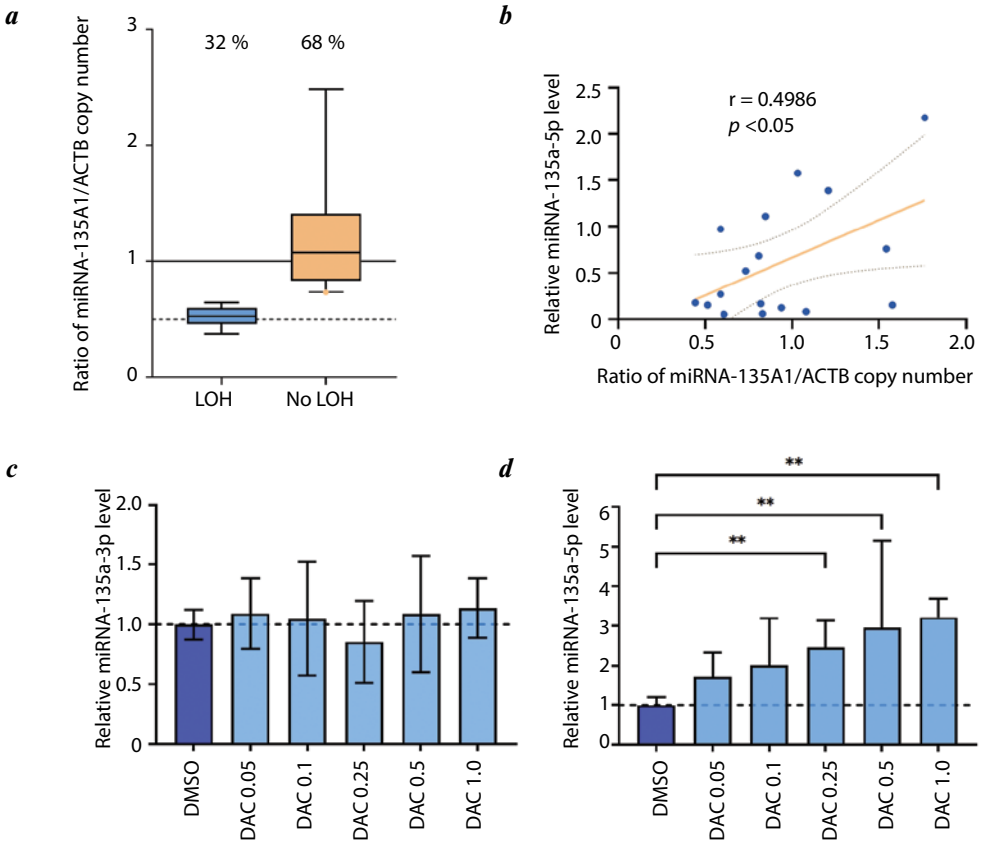


Fig. 4. *Analysis of the mechanisms involved in the suppression of miRNA-135A1 expression: a – distribution of squamous cell carcinoma samples according to the presence of loss of heterozygosity (LOH) in the MIR135A1 gene. The graph shows two groups of cell carcinoma – with LOH in the region of MIR135A1 gene (LOH) and without LOH of MIR135A1 gene (No LOH). The copy number ratio of MIR135A1 and β-actin (ACTB) genes is plotted on the y-axis. The number of samples falling into each group is given as a percentage; b – correlation analysis of the dependence of miRNA-135a-5p expression level on the copy number ratio of MIR135A1 and ACTB genes. Pearson correlation coefficient and p-value significance level are shown; c – diagram of the dependence of miRNA-135a-3p expression levels on the concentration of the demethylating agent DAC in SiHa cells; d – diagram of the dependence of miRNA-135a-5p expression levels on the concentration of the demethylating agent DAC in SiHa cells. The y-axis indicates the relative expression value of miRNA-135a-3p and miRNA-135a-5p, the x-axis indicates different concentrations of DAC (0.05 μM to 1 μM), DMSO is control samples treated with solvent without demethylating agent. **p <0.01*

the expression of the viral oncogene *E6*, thereby reducing the oncogenic effect of HPV16 in tumor cells.

MiRNA-135A1 levels in plasma of patients with HPV-associated cervical lesions. In the previous phase of our work, we showed that miRNA-135A1 is a potential oncosuppressor miRNA in CC, the levels of which are significantly reduced in tumor tissue compared to adjacent morphologically normal epithelium. It is therefore of great interest to evaluate its diagnostic potential in the plasma of patients with HPV-associated cervical lesions.

To this end, we evaluated the changes in miRNA-135A1 levels in the plasma of patients with CC and patients with cervical precancerous lesions compared to healthy donors. A total of 20 blood plasma samples from patients with CC, 21 blood plasma samples from patients with CIN of varying severity and 24 blood plasma samples from healthy donors were analyzed.

As shown in fig. 5, *a*, the level of miRNA-135a-3p is significantly reduced in the plasma of patients with CC compared to healthy donors, and the level of miRNA-135a-5p is not different in all compared groups (data not shown). A decrease in the level of miRNA-135a-3p in blood plasma is also observed in the group of patients with CIN, with the level of this miRNA being intermediate position between the group of CC patients and healthy donors (see fig. 5, *a*). This dependence of the severity of HPV-induced lesions on the degree of reduction of miRNA-135a-3p levels in the plasma of patients may suggest that its low plasma level may reflect the presence of a predisposition to the development of CC.

The absence of differences in miRNA-135a-5p levels in the groups studied against the background of pronounced changes in another mature form of miRNA-135a-3p may suggest that there is selection for certain forms of miRNA-135A1 during their secretion into the extracellular environment, including in the composition of extracellular vesicles, as has been shown for many miRNAs [29]. Such extracellular vesicles of dysplastic and tumor cells, whose composition is characterized by the directed secretion of miRNA-135a-3p, may form the main pool of this miRNA in plasma, changes in which are detected in patients with CIN and CC.

We further analyzed the change in plasma levels of miRNA-135a-3p in patients with CIN according to the severity of dysplastic changes in the cervical epithelium, comparing the groups of precancerous lesions of low severity (CIN I/II) and high severity (CIN3/*in situ*), 8 and 13 patients, respectively (fig. 5, *b*). In addition, we evaluated the dependence of plasma miRNA-135a-3p levels on the type of HPV found in the patients. For this purpose, all samples with CIN were divided into those associated with HPV16 – 15 patients, and those showing infection with other highly oncogenic HPV types (31, 33, 68, 56, 59) – 6 patients (fig. 5, *c*).

As shown in fig. 5, *b* and *c*, the decrease in plasma miRNA-135a-3p levels in patients with CIN is independent of factors such as the severity of cervical dysplasia and the type of papillomavirus infection detected in cervical smears. These data suggest that reduced levels of miRNA-135a-3p do not reflect the severity of cervical epithelial lesions and are not determined by infection with a particular type of HPV, but probably only demonstrate a general pattern that CIN and CC occur in a group of individuals with initially reduced levels of this miRNA.

We then evaluated the diagnostic potential of miRNA-135a-3p in the plasma of patients with CC and precancerous cervical lesions using ROC analysis (fig. 5, *d*).

As shown in fig. 5, *d*, miRNA-135a-3p has a high diagnostic potential in both patients with cervical squamous cell carcinoma (sensitivity 0.96; specificity 0.95; 95 % confidence interval 0.8–0.99; AUC 0.99) and CIN (sensitivity 0.83; specificity 0.81; 95 % confidence interval 0.64–0.93; AUC 0.87).

Comparing the results obtained by ROC analysis of miRNA-135a-3p levels in plasma compared to healthy donors with the diagnostic parameters obtained by using a combination of cervical smear cytology and HPV typing (AUC 0.837; sensitivity 0.886; specificity 0.656), it can be concluded that the proposed diagnostic test based on the determination of miRNA-135a-3p in blood plasma will have similar values of sensitivity and specificity compared to standard cytological methods [30].

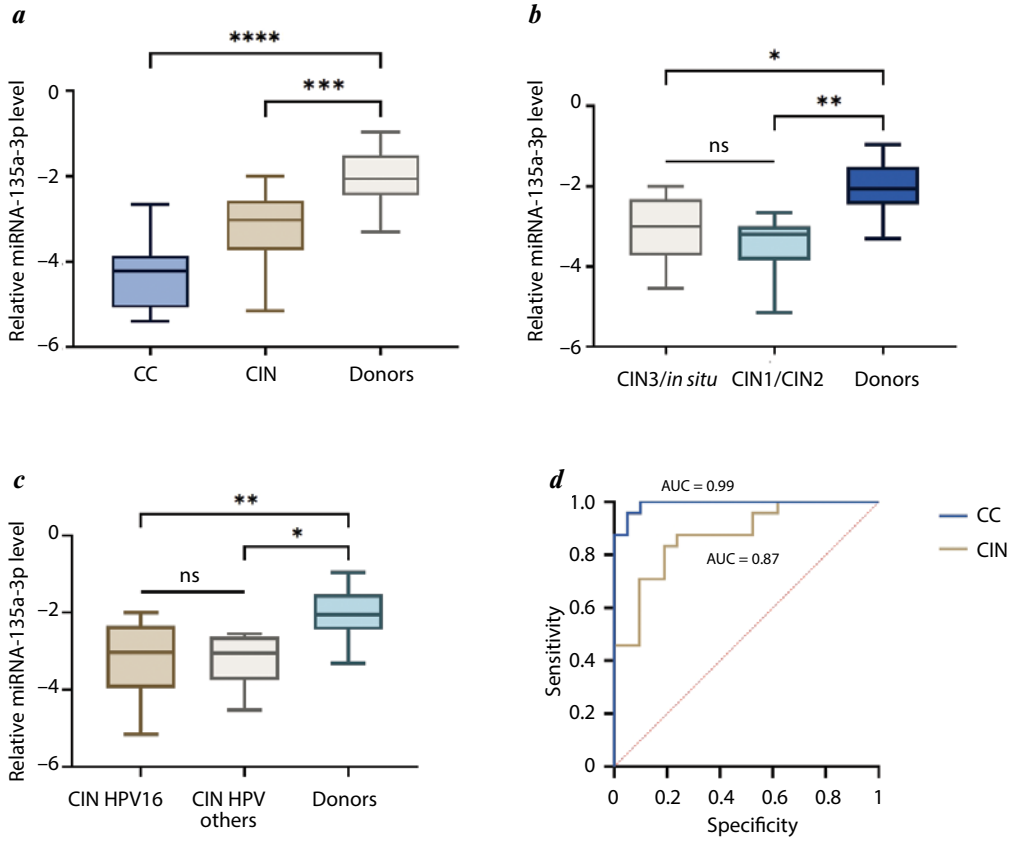


Fig. 5. *MiRNA-135A1 levels in plasma of patients with HPV-associated (HPV – human papillomavirus) cervical lesions: a – levels of miRNA-135a-3p in plasma of patients with cell carcinoma (CC), cervical intraepithelial neoplasia (CIN) compared to healthy donors. The negative difference of miRNA-135a-3p and miRNA-16-5p expression is plotted on the ordinate axis, which is the normalizer of the miRNA expression level in plasma; b – diagram of the dependence of miRNA-135a-3p levels in plasma of CIN patients and healthy donors on the severity of cervical epithelial lesions; ns – not significant; c – comparison of miRNA-135a-3p levels in plasma of CIN patients according to HPV type 16 (HPV16) status. HPV16 CIN group – patients have HPV16 infection of the cervical epithelium, HPV other CIN group – HPV other types are detected in the samples; ns – not significant; d – ROC curves reflecting the diagnostic significance of miRNA-135a-3p when comparing groups of patients with cell carcinoma, and CIN compared to conditionally healthy donors (p <0.0001). *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001; ****p <0.0001*

DISCUSSION

In conclusion, miRNA-135A1 is a potential oncosuppressor miRNA, capable of suppressing the expression of the viral oncogene *E6*, and its expression level is significantly reduced in cervical tumor tissue compared to the morphologically normal adjacent epithelium. In tumor tissue, the reduced expression of this miRNA in a proportion of samples can be explained by the loss of one of the copies of the gene encoding the miRNA-135A1 precursor and probably by the presence of aberrant DNA methylation.

Analysis of plasma miRNA-135A1 levels revealed low levels of miRNA-135a-3p in patients with cervical precancer and squamous cell carcinoma compared to healthy donors, consistent with suppression of expression of this miRNA in transformed cervical epithelium. Since changes in the miRNA expression profile in cervical neoplasia, where epithelial lesions are not as extensive as in invasive cervical cancer, are also reflected in plasma, we can infer a likely predisposition to progression of HPV-associated lesions in individuals with lower miRNA-135a-3p levels. These findings are consistent with the fact that a significant proportion of people infected with high-risk HPV clear the virus and that progression to invasive carcinoma occurs in a small number of patients [13, 31]. In addition, a decrease in the mRNA level of the HPV16 *E6* oncogene has been shown under the influence of miRNA-135A1, which may explain the relationship between miRNA-135A1 expression and progression to cervical neoplasia and invasive cancer.

Today, various serologic markers are mainly used for the minimally invasive diagnosis of CC, of which squamous cell carcinoma antigen (SCC-Ag) is the most widely used. However, the use of this marker is limited due to insufficient sensitivity to detect cervical tumor pathology at early stages [32]. Differentially expressed circulating miRNAs in blood plasma are currently being actively investigated for their potential use as diagnostic markers that may improve existing protocols for the diagnosis of cancer and precancerous lesions, particularly CC and CIN. For example, the levels of miRNA-7d-3p, -30d-5p, -143 and -4636 are reduced in the plasma of patients with CC and CIN and have a high diagnostic potential for these lesions [33, 34]. In addition to circulating miRNAs whose levels are reduced in CC, hyperexpressed plasma miRNAs (miRNA-26b-5p, -146b-5p, 191-5p, -484, -574-3p, and -625-3p) have also been identified, and their use in the diagnosis of CC and precancerous lesions seems promising [35].

MiRNA-135 exhibits diverse properties in the pathogenesis of tumor diseases. The oncosuppressive properties of miRNA-135 have been described in tumors such as prostate [36–38], kidney [39, 40], and glioblastoma [41, 42], whereas the oncogenic properties have been described in colorectal cancer [43, 44] and hepatocellular carcinoma [45, 46]. In addition, colorectal, lung and ovarian tumors are characterized by changes in miRNA-135 levels also in blood plasma, making this miRNA a potential diagnostic marker in these diseases [47–49]. However, there are currently no studies in CC that clearly characterize the role of miRNA-135 in tumor progression and its potential application in diagnosis.

CONCLUSION

The present study demonstrated that miRNA-135A1 is decreased in both cervical tumor tissue and plasma of patients with precancerous lesions and CC. Such changes in the level of miRNA-135a in blood plasma allow its use as a diagnostic marker and can serve as a basis for the development of new test systems. Diagnostic miRNA panels can significantly improve diagnosis, especially when cytologic (morphologic) results are unclear and serologic markers are negative. To assess the prognostic potential of this marker, further clinical studies with a significant follow-up period are required.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. de Martel C., Plummer M., Vignat J. et al. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. Int J Cancer 2017;141(4):664–70. DOI: 10.1002/ijc.30716
2. de Sanjose S., Bruni L., Alemany L. HPV in genital cancers (at the exception of cervical cancer) and anal cancers. Presse Med 2014;43(12 Pt.2):e423–8. DOI: 10.1016/j.lpm.2014.10.001
3. Винокурова С.В., Катаргин А.Н. Вирус папилломы человека и заболевания верхних дыхательных путей: рак головы и шеи и респираторный папилломатоз. Голова и шея. Российский журнал 2023;11(1):62–73.
   Vinokurova S.V., Katargin A.N. Human papillomavirus and upper respiratory diseases: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. Golova i sheya. Rossiyskiy zhurnal = Head and Neck. Russian Journal 2023;11(1):62–73. (In Russ.).
4. Medda A., Duca D., Chiocca S. Human papillomavirus and cellular pathways: hits and targets. Pathogens 2021;10(3):262. DOI: 10.3390/pathogens10030262
5. Doorbar J. The human papillomavirus twilight zone – latency, immune control and subclinical infection. Tumour Virus Res 2023;16:200268. DOI: 10.1016/j.tvr.2023.200268
6. Shanmugasundaram S., You J. Targeting persistent human papillomavirus infection. Viruses 2017;9(8):229. DOI: 10.3390/v9080229
7. Woodman C.B., Collins S., Winter H. et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. Lancet 2001;357(9271):1831–6. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04956-4
8. Franco E.L., Villa L.L., Sobrinho J.P. et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. J Infect Dis 1999;180(5):1415–23. DOI: 10.1086/315086
9. Klaes R., Friedrich T., Spitkovsky D. et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. Int J Cancer 2001;92(2):276–84. DOI: 10.1002/ijc.1174

10. 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
11. Castle P.E., Gage J.C., Wheeler C.M. et al. The clinical meaning of a cervical intraepithelial neoplasia grade 1 biopsy. Obstet Gynecol 2011;118(6):1222–9. DOI: 10.1097/AOG.0b013e318237caf4
12. Doorbar J., Quint W., Banks L. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vaccine 2012;30(5):F55–70. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083
13. Ehret A., Bark V.N., Mondal A. et al. Regression rate of high-grade cervical intraepithelial lesions in women younger than 25 years. Arch Gynecol Obstet 2023;307(3):981–90. DOI: 10.1007/s00404-022-06680-4
14. Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. Virology 2009;384(2):375–9. DOI: 10.1016/j.virol.2008.11.014
15. Pett M., Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? J Pathol 2007;212(4):356–67. DOI: 10.1002/path.2192
16. Vinokurova S., Wentzensen N., Kraus I. et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. Cancer Res 2008;68(1):307–13. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2754
17. Arias-Pulido H., Peyton C.L., Joste N.E. et al. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma *in situ* and in invasive cervical cancer. J Clin Microbiol 2006;44(5):1755–62. DOI: 10.1128/JCM.44.5.1755-1762.2006
18. Girardi E., Lopez P., Pfeffer S. On the importance of host microRNAs during viral infection. Front Genet 2018;9:439. DOI: 10.3389/fgene.2018.00439
19. Lin M., Xue X.Y., Liang S.Z. et al. MiR-187 overexpression inhibits cervical cancer progression by targeting HPV16 E6. Oncotarget 2017;8(38):62914–26. DOI: 10.18632/oncotarget.17516
20. Jung H.M., Phillips B.L., Chan E.K. MiR-375 activates p21 and suppresses telomerase activity by coordinately regulating HPV E6/E7, E6AP, CIP2A, and 14-3-3zeta. Mol Cancer 2014;13:80. DOI: 10.1186/1476-4598-13-80
21. Wang F., Li Y., Zhou J. et al. miR-375 is down-regulated in squamous cervical cancer and inhibits cell migration and invasion via targeting transcription factor SP1. Am J Pathol 2011;179(5):2580–8. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.07.037
22. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Res 2005;33(20):e179. DOI: 10.1093/nar/gni178
23. Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J. et al. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 1979;18(24):5294–9. DOI: 10.1021/bi00591a005
24. Спитковский Д.Д., Зборовская И.Б., Киселев Ф.Л. Транскрипция клеточных онкогенов в опухолях человека. Молекулярная биология 1986;20(5):1409–22. Spitkovsky D.D., Zborovskaya I.B., Kiselev F.L. Transcription of cellular oncogenes in human tumors. Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology 1986;20(5):1409–22. (In Russ.).
25. Chang T.H., Huang H.Y., Hsu J.B. et al. An enhanced computational platform for investigating the roles of regulatory RNA and for identifying functional RNA motifs. BMC Bioinformatics 2013;14(2):S4. DOI: 10.1186/1471-2105-14-S2-S4
26. Kisseljova N.P., Fedorova M.D., Zaikina A.E. et al. [Identification regulatory noncoding RNAs of human papilloma virus type 16 (papillomaviridae: alphapapillomavirus: human papillomavirus) in cervical tumors]. Vopr Virusol 2022;67(3):217–26. DOI: 10.36233/0507-4088-108
27. Dasgupta S., Chakraborty S.B., Roy A. et al. Differential deletions of chromosome 3p are associated with the development of uterine cervical carcinoma in Indian patients. Mol Pathol 2003;56(5):263–9. DOI: 10.1136/mp.56.5.263
28. Guo Z., Wu F., Asplund A. et al. Analysis of intratumoral heterogeneity of chromosome 3p deletions and genetic evidence of polyclonal origin of cervical squamous carcinoma. Mod Pathol 2001;14(2):54–61. DOI: 10.1038/modpathol.3880256
29. Скрябин Г.О., Беляева А.А., Еникеев А.Д. и др. Анализ микроРНК miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p, -135b-5p, -451a, -495-3p и -136-5p в клетках рака яичника и секретируемых ими экстраклеточных везикулах. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):113–23. DOI: 10.17650/2313-805X-2024-11-1-113-123 Skryabin G.O., Belyaeva A.A., Enikeev A.D. et al. Analysis of miRNAs miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p, -135b-5p, -451a, -495-3p and -136-5p in parental ovarian cancer cells and secreted extracellular vesicles. . Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(1):113–23. DOI: 10.17650/2313-805X-2024-11-1-113-123
30. Fu L., Xia W., Shi W. et al. Deep learning based cervical screening by the cross-modal integration of colposcopy, cytology, and HPV test. Int J Med Inform 2022;159:104675. DOI: 10.1016/j.ijmedinf.2021.104675
31. Cho H.W., So K.A., Lee J.K. et al. Type-specific persistence or regression of human papillomavirus genotypes in women with cervical intraepithelial neoplasia 1: a prospective cohort study. Obstet Gynecol Sci 2015;58(1):40–5. DOI: 10.5468/ogs.2015.58.1.40
32. Takeda M., Sakuragi N., Okamoto K. et al. Preoperative serum SCC, CA125, and CA19-9 levels and lymph node status in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Acta Obstet Gynecol Scand 2002;81(5):451–7. DOI: 10.1034/j.1600-0412.2002.810513.x
33. Yin S., Yang M., Li X. et al. Peripheral blood circulating microRNA-4636/-143 for the prognosis of cervical cancer. J Cell Biochem 2020;121(1):596–608. DOI: 10.1002/jcb.29305
34. Zheng M., Hou L., Ma Y. et al. Exosomal let-7d-3p and miR-30d-5p as diagnostic biomarkers for non-invasive screening of cervical cancer and its precursors. Mol Cancer 2019;18(1):76. DOI: 10.1186/s12943-019-0999-x
35. Ning R., Meng S., Wang L. et al. 6 circulating miRNAs can be used as non-invasive biomarkers for the detection of cervical lesions. J Cancer 2021;12(17):5106–13. DOI: 10.7150/jca.51141
36. Xu B., Tao T., Wang Y. et al. Hsa-miR-135a-1 inhibits prostate cancer cell growth and migration by targeting EGFR. Tumour Biol 2016;37(10):14141–51. DOI: 10.1007/s13277-016-5196-6
37. Wang N., Tao L., Zhong H. et al. MiR-135b inhibits tumour metastasis in prostate cancer by targeting STAT6. Oncol Lett 2016;11(1):543–50. DOI: 10.3892/ol.2015.3970
38. Kroiss A., Vincent S., Decaussin-Petrucci M. et al. Androgen-regulated microRNA-135a decreases prostate cancer cell migration and invasion through downregulating ROCK1 and ROCK2. Oncogene 2015;34(22):2846–55. DOI: 10.1038/onc.2014.222
39. Zhou W., Bi X., Gao G. et al. MiRNA-133b and miRNA-135a induce apoptosis via the JAK2/STAT3 signaling pathway in human renal carcinoma cells. Biomed Pharmacother 2016;84:722–9. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.09.074
40. Yamada Y., Hidaka H., Seki N. et al. Tumor-suppressive microRNA-135a inhibits cancer cell proliferation by targeting the c-MYC oncogene in renal cell carcinoma. Cancer Sci 2013;104(3):304–12. DOI: 10.1111/cas.12072
41. Gomez Zubieta D.M., Hamood M.A., Beydoun R. et al. MicroRNA-135 aregulates NHE9 to inhibit proliferation and migration of glioblastoma cells. Cell Commun Signal 2017;15(1):55. DOI: 10.1186/s12964-017-0209-7
42. Wu S., Lin Y., Xu D. et al. MiR-135a functions as a selective killer of malignant glioma. Oncogene 2012;31(34):3866–74. DOI: 10.1038/onc.2011.551
43. Li J., Liang H., Bai M. et al. Correction: miR-135b promotes cancer progression by targeting transforming growth factor beta

receptor II (TGFBR2) in colorectal cancer. PLoS One 2015;10(12):e0145589. DOI: 10.1371/journal.pone.0145589
44. Li J., Liang H., Bai M. et al. MiR-135b promotes cancer progression by targeting transforming growth factor beta receptor II (TGFBR2) in colorectal cancer. PLoS One 2015;10(6):e0130194. DOI: 10.1371/journal.pone.0130194
45. Huang K.T., Kuo I.Y., Tsai M.C. et al. Factor VII-induced microRNA-135a inhibits autophagy and is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. Mol Ther Nucleic Acids 2017;9:274–83. DOI: 10.1016/j.omtn.2017.10.002
46. Li Y., Xu D., Bao C. et al. MicroRNA-135b, a HSF1 target, promotes tumor invasion and metastasis by regulating RECK and EVI5 in hepatocellular carcinoma. Oncotarget 2015;6(4):2421–33. DOI: 10.18632/oncotarget.2965
47. Fukagawa S., Miyata K., Yotsumoto F. et al. MicroRNA-135a-3p as a promising biomarker and nucleic acid therapeutic agent for ovarian cancer. Cancer Sci 2017;108(5):886–96. DOI: 10.1111/cas.13210
48. Zhang Y.K., Sun B., Sui G. Serum microRNA-135a downregulation as a prognostic marker of non-small cell lung cancer. Genet Mol Res 2016;15(3). DOI: 10.4238/gmr.15038252
49. Wang Q., Zhang H., Shen X. et al. Serum microRNA-135a-5p as an auxiliary diagnostic biomarker for colorectal cancer. Ann Clin Biochem 2017;54(1):76–85. DOI: 10.1177/0004563216638108

Authors' contributions
D.S. Elkin: analysis of heterozygosity loss, assessment of the effect of DNA demethylation, cell culture cultivation, article writing, analysis of the obtained data;
M.I. Taubinskaya: miRNA extraction from blood plasma, qPCR, DNA extraction from cervical smears, HPV typing of cervical smears;
N.V. Elkina: HPV typing of CC tissue samples, primer design for miRNA analysis, transfection of cells with synthetic analogs of miRNAs, qPCR performance;
R.S. Faskhutdinov: transfection of cells with synthetic miRNA analogues, qPCR performance;
M.D. Fedorova: qPCR on miRNA matrix from FFPE sections;
A.N. Katargin: isolation of miRNA from FFPE sections;
K.I. Zhordania: idea, coordination of the work of the clinical unit;
E.A. Mustafina: collection of cervical smears and whole blood samples from patients;
E.A. Grivachev: analysis of clinical and morphological characteristics of the clinical material used;
L.S. Pavlova: selection of clinical samples for analysis, database maintenance;
S.V. Vinokurova: idea, research design, project management, scientific editing.

Вклад авторов
Д.С. Елкин: оценка потери гетерозиготности, оценка эффекта деметилирования ДНК, культивирование клеточных культур, написание текста статьи, анализ полученных данных;
М.И. Таубинская: выделение микроРНК из плазмы крови, qPCR, выделение ДНК из цервикальных мазков, ВПЧ-типирование цервикальных мазков;
Н.В. Елкина: ВПЧ-типирование образцов тканей рака шейки матки, дизайн праймеров для анализа микроРНК, трансфекция клеток синтетическими аналогами микроРНК, постановка qPCR;
Р.С. Фасхутдинов: трансфекция клеток синтетическими аналогами микроРНК, постановка qPCR;
М.Д. Федорова: постановка qPCR на матрице микроРНК из парафиновых срезов;
А.Н. Катаргин: выделение микроРНК из парафиновых срезов;
К.И. Жорданиа: идея, координация работы клинического подразделения;
Е.А. Мустафина: сбор цервикальных мазков и образцов цельной крови пациентов;
Е.А. Гривачев: анализ клинико-морфологических характеристик используемого клинического материала;
Л.С. Павлова: подбор образцов клинического материала для анализа, ведение базы данных;
С.В. Винокурова: идея, разработка дизайна исследования, руководство проектом, научное редактирование.

ORCID of authors / ORCID авторов
D.S. Elkin: https://orcid.org/0000-0002-4793-6063
M.I. Taubinskaya: https://orcid.org/0009-0005-4933-9026
N.V. Elkina: https://orcid.org/0000-0002-0503-6016
R.S. Faskhutdinov: https://orcid.org/0000-0002-0050-7798
M.D. Fedorova: https://orcid.org/0000-0002-8813-7516
A.N. Katargin: https://orcid.org/0000-0002-7405-0671
K.I. Zhordania: https://orcid.org/0000-0003-1380-3710
E.A. Mustafina: https://orcid.org/0000-0002-1009-0383
E.A. Grivachev: https://orcid.org/0000-0001-8823-0174
L.S. Pavlova: https://orcid.org/0000-0003-3993-4823
S.V. Vinokurova: https://orcid.org/0000-0003-1615-3928

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

Funding. This research was funded by the Russian Scientific Foundation (grant No. 23-15-00433, https://rscf.ru/en/project/23-15-00433).
Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (грант № 23-15-00433, https://rscf.ru/project/23-15-00433).

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.
Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Article submitted: 19.07.2024. **Accepted for publication:** 14.08.2024. **Published online:** 09.10.2024.
Статья поступила: 19.07.2024. **Принята к публикации:** 14.08.2024. **Опубликована онлайн:** 09.10.2024.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-68-78

CC BY 4.0

Структурные изменения гена *EGFR* в образцах глиобластомы как фактор прогноза и молекулярная мишень для терапии

В.О. Варачев[1], О.Ю. Сусова[2], А.А. Митрофанов[2], Г.С. Краснов[1], Д.Р. Насхлеташвили[2], Ю.И. Аммур[1, 3], С.Д. Бежанова[2], Н.В. Севян[2], Е.В. Прозоренко[2], А.Х. Бекяшев[2], Т.В. Наседкина[1]

[1]ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук»; Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32;
[2]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;
[3]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5А

Контакты: Татьяна Васильевна Наседкина *tanased06@rambler.ru*

Введение. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) – трансмембранный белок семейства рецепторных тирозинкиназ, который активируется при различных видах рака (немелкоклеточном раке легкого, колоректальном раке, злокачественных опухолях головы и шеи). В глиальных опухолях головного мозга повышенный уровень экспрессии EGFR характерен для наиболее агрессивного подтипа злокачественных новообразований – глиобластомы. Частыми структурными изменениями EGFR при данной патологии являются амплификация участка хромосомы, в котором расположен ген *EGFR*, точечные мутации, а также делеция 2–7-го экзонов гена *EGFR*, приводящая к образованию транскрипта *EGFRvIII*.

Цель исследования – определение структурных изменений гена *EGFR* (точечные мутации и амплификация гена *EGFR*, транскрипт *EGFRvIII*) в образцах опухоли с помощью различных методов и оценка их потенциальной клинической значимости.

Материалы и методы. В исследование включены 75 пациентов с глиомами головного мозга (из них 70 с глиобластомами) в возрасте от 34 до 78 лет (средний возраст 56 лет). Выделение ДНК и РНК проводили из свежезамороженной ткани опухоли, а также из лейкоцитов периферической крови. Мутации в гене *EGFR* выявляли методом секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS), для определения копийности участков 7-й хромосомы проводили сравнительный анализ (норма – опухоль) частот β-аллелей (β allele frequency, BAF). Для подтверждения амплификации гена *EGFR* в образцах опухоли использовали полимеразную цепную реакцию в реальном времени, для обнаружения варианта *EGFRvIII* – полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией.

Результаты. Методом NGS в образцах глиобластомы выявлены 11 (16 %) мутаций в кодирующих участках гена *EGFR*, амплификация гена *EGFR* обнаружена в 26 (37 %) случаях; в 5 образцах глиом (астроцитома, олигодендроглиома) структурные изменения гена *EGFR* не определены. Все случаи амплификации гена *EGFR*, выявленные с помощью NGS, подтверждены методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для поиска транскрипта *EGFRvIII* исследован 31 образец РНК опухоли, в 12 из которых присутствовала амплификация *EGFR*. Транскрипт *EGFRvIII* выявлен только в образцах с амплификацией гена *EGFR* (в 4 (33 %) из 12 случаев). Для оценки клинической значимости структурных изменений гена сравнивали частоту их встречаемости в образцах первичной и рецидивной глиобластом.

Заключение. Метод NGS позволяет выявлять как точечные мутации, так и амплификацию гена *EGFR*. Амплификация данного гена в 33 % случаев ассоциирована с мутацией *EGFRvIII*. Не выявлено статистически значимых различий в частоте структурных изменений гена *EGFR* между первичными и рецидивными глиобластомами.

Ключевые слова: ген *EGFR*, амплификация гена *EGFR*, мутация, транскрипт *EGFRvIII*, глиобластома, секвенирование нового поколения, рецидив

Для цитирования: Варачев В.О., Сусова О.Ю., Митрофанов А.А. и др. Структурные изменения гена *EGFR* в образцах глиобластомы как фактор прогноза и молекулярная мишень для терапии. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(3):68–78.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-68-78

Structural alterations of the *EGFR* gene in glioblastoma samples as a prognostic factor and molecular target for therapy

V.O. Varachev[1], O.Yu. Susova[2], A.A. Mitrofanov[2], G.S. Krasnov[1], D.R. Naskhletashvili[2], Yu.I. Ammour[1,3], S.D. Bezhanova[2], N.V. Sevyan[2], E.V. Prozorenko[2], A.Kh. Bekyashev[4], T.V. Nasedkina[1]

[1]*V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences; 32 Vavilova St., Moscow 119991, Russia;*
[2]*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;*
[3]*I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; 5A Malyy Kazennyy Pereulok, Moscow 105064, Russia*

Contacts: Tatyana Vasilyevna Nasedkina *tanased06@rambler.ru*

Introduction. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a transmembrane protein of the receptor tyrosine kinase family that is activated in various cancers (non-small cell lung cancer, colorectal cancer, head and neck tumors). In glial brain tumors, increased EGFR expression levels are characteristic of the most aggressive subtype, glioblastoma. Frequent structural changes of *EGFR* in glioblastoma are amplification of the chromosome region where the *EGFR* gene is located, point mutations, as well as deletion of exons 2–7 of the *EGFR* gene leading to the formation of *EGFRvIII* transcript.
Aim. To determine structural changes of the *EGFR* gene (point mutations and amplification of the *EGFR* gene, *EGFRvIII* transcript) in tumor samples using different methods and to evaluate their potential clinical significance.
Materials and methods. The study included 75 patients with brain gliomas (70 of them glioblastoma) aged 34 to 78 years (mean age 56 years). DNA and RNA isolation was performed from fresh frozen tumor tissue, as well as from peripheral blood leukocytes. *EGFR* gene mutations were determined by next-generation sequencing (NGS), and β allele frequency (BAF) comparative analysis (normal-tumor) was performed to determine the copy number of chromosome 7 regions. Quantitative polymerase chain reaction was used to confirm the *EGFR* gene amplification in tumor samples, and reverse transcription-PCR was used to detect *EGFRvIII* variant.
Results. The NGS method revealed 11/70 (16 %) mutations in coding regions of *EGFR* gene in glioblastoma samples, the *EGFR* gene amplification was detected in 26/70 (37 %) cases; no structural changes of the *EGFR* gene were detected in 5 glioma samples (astrocytoma, oligodendroglioma). All cases of *EGFR* gene amplification detected by NGS were confirmed by quantitative polymerase chain reaction. To search for *EGFRvIII* transcript, 31 tumor RNA samples were examined, of which *EGFR* amplification was present in 12 samples. EGFRvIII transcript was detected only in samples with *EGFR* gene amplification – 4/12 (33 %). To assess the clinical significance of structural gene alterations, the frequency of occurrence in primary and recurrent glioblastoma samples was compared.
Conclusion. The NGS method allows to detect both point mutations and amplification of the *EGFR* gene. The *EGFR* gene amplification was associated with *EGFRvIII* mutation in 33 % of cases. No statistically significant differences in the frequency of structural changes in the *EGFR* gene between primary and relapsed glioblastomas were found.

Keywords: *EGFR* gene, *EGFR* gene amplification, mutation, *EGFRvIII* transcript, glioblastoma, next-generation sequencing, recurrent tumor

For citation: Varachev V.O., Susova O.Yu., Mitrofanov A.A. et al. Structural alterations of the *EGFR* gene in glioblastoma samples as a prognostic factor and molecular target for therapy. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(3):68–78. (In Russ.).

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-68-78

ВВЕДЕНИЕ

Ген *EGFR* (epidermal growth factor receptor, ErbB-1) кодирует трансмембранный рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), который экспрессируется на поверхности как нормальных, так и трансформированных эпителиальных клеток и участвует в регуляции клеточного роста и дифференцировки. Белок EGFR принадлежит семейству рецепторных тирозинкиназ ErbB, к которому относятся также ErbB2 (HER2/c-neu), ErbB3 (HER3) и ErbB4 (HER4) [1]. Рецептор имеет молекулярную массу 170 кДа и располагается на коротком плече 7-й хромосомы в локусе 7p11.2.

В нормальных клетках EGFR может быть активирован эпидермальным фактором роста (EGF), трансформирующим фактором роста α (TGF-α) или другими лигандами [2]. После активации происходят димеризация EGFR и аутофосфорилирование остатков тирозина на С-концевых доменах рецептора, что приводит к активации белков, расположенных ниже в сигнальном каскаде RAS/RAF/MAPK [3]. Показано, что EGFR конститутивно активирован в клетках различных эпителиальных злокачественных опухолей (немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), колоректального рака, опухолей головы и шеи [4]); также его активность повышается при воспалительных процессах, связанных с развитием псориаза, экземы и атеросклероза [5].

При глиобластоме (ГБМ) ген *EGFR* является наиболее часто амплифицированным и гиперэкспрессированным протоонкогеном. Амплификация *EGFR* обнаруживается примерно в 40–50 % случаев ГБМ,

мутации *EGFR* встречаются в 10–26 % этих опухолей [6–8]. Классификация Всемирной организации здравоохранения 2021 г. учитывает амплификацию гена *EGFR* в качестве важного диагностического критерия, позволяющего поставить диагноз «глиобластома IV степени злокачественности» в случае астроцитомы с диким типом генов *IDH1/2* (*IDH*-wildtype) даже при отсутствии очевидных гистопатологических признаков [9]. Примерно в 50 % случаев глиобластом с амплифицированным геном *EGFR* выявляют вариант транскрипта *EGFRvIII*, который образуется в результате делеции 2–7-го экзонов, кодирующих часть внеклеточного домена [10]. Эта перестройка приводит к повышенной экспрессии усеченного рецепторного белка, неспособного взаимодействовать с лигандами и являющегося конститутивно активным [11].

Довольно спорным является вопрос относительно прогностического значения структурных изменений гена *EGFR* при ГБМ. В ходе некоторых исследований выявлена корреляция мутаций и амплификации гена *EGFR* с более благоприятным исходом [8], в то время как результаты других исследований демонстрируют связь с худшим прогнозом [12, 13], а также с менее выраженным ответом на анти-VEGFR (VEGFR – рецептор фактора роста эндотелия сосудов) терапию бевацизумабом [14].

Согласно современным представлениям ген *EGFR* может не только служить диагностическим и прогностическим маркером, но и представлять интерес как лекарственная мишень при ГБМ, благодаря высокой частоте структурных изменений при этом типе опухоли [15]. Однако в отличие от других опухолей с активированным *EGFR*, ГБМ слабо реагирует на применение EGFR-ингибиторов [16]. Одна из возможных причин резистентности ГБМ к молекулярно-направленной анти-EGFR-терапии может заключаться в том, что при данной патологии мутации в гене *EGFR* чаще всего происходят во внеклеточном, а не во внутриклеточном киназном домене, как при НМРЛ, поэтому ингибиторы, нацеленные на инактивацию киназной функции EGFR, оказываются менее эффективными. В качестве опухолеспецифической мишени при иммунотерапии, включая подходы на основе антител, генетически модифицированных Т-клеток и создания дендритных вакцин, рассматривают белок EGFRvIII, который содержит уникальную пептидную последовательность, образующуюся при слиянии 1-го и 8-го экзонов [17]. Однако иммунотерапия не дала результатов в клиническом исследовании III фазы у пациентов с впервые выявленным раком [18].

Таким образом, дальнейшие исследования спектра и частоты структурных изменений гена *EGFR* являются актуальными и имеют большое значение для выбора тактики лечения и поиска новых, более эффективных методов воздействия на молекулярные мишени в опухолевых клетках ГБМ.

Цель исследования – определение структурных изменений гена *EGFR* (точечные мутации и амплификация гена *EGFR*, транскрипт *EGFRvIII*) в образцах ГБМ с помощью различных методов и оценка их потенциальной клинической значимости при сравнении мутационного профиля первичных и рецидивных опухолей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование вошли 75 пациентов с ГБМ ($n = 70$) и диффузной глиомой (астроцитомой, олигодендроглиомой) ($n = 5$) в возрасте от 34 до 78 лет (средний возраст 56 лет). Среди них были 46 мужчин и 29 женщин. Клинический материал включал образцы свежезамороженной ткани опухоли и периферической крови.

ДНК экстрагировали из ткани и крови с помощью набора DNeasy Blood and Tissue Kit (GmbH, Hilden, Германия) в соответствии с протоколом производителя, РНК – из свежезамороженной ткани с использованием RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Концентрации ДНК и РНК, а также отношение 260/280 определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США).

Амплификацию гена *EGFR* определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с последующим обсчетом данных методом ΔΔCt. Использовали условия реакции, описанные ранее [19]. Для каждого образца ДНК опухоли или периферической крови проводили 2 ПЦР-РВ. В первую ПЦР-смесь были добавлены праймеры для гена *EGFR* (EGFR-F 5’-CACTGCCTCATCTCTCACCATC-3’ и EGFR-R 5’-GACTCACCGTAGCTCCAGAC-3’), а во вторую – праймеры для референсного локуса на 2-й хромосоме *WI-3306* (WI-3306-F 5’-CATGACTGCGAGCCCAAGATG-3’ и WI-3306-R 5’-CAGGTGGTGTCATCAGAATCAG-3’). Для образца опухоли определяли разницу в пороговом цикле Ct для контрольного гена *WI-3306* и гена *EGFR* (tumor_ΔCt). Также рассчитывали значение ΔCt для соответствующего образца нормальной ткани (blood_ΔCt). На основе этих данных определяли ΔΔCt = tumor_ΔCt – blood_ΔCt. Если $2^{\Delta\Delta Ct} \geq 3$, считали, что в образце опухоли присутствует амплификация гена *EGFR*.

Подготовка библиотек для секвенирования осуществлялась на платформе Illumina (США). Выделенную из замороженной ткани ДНК фрагментировали с помощью ультразвукового гомогенизатора S220 (Covaris, США). Подготовку образцов проводили по стандартному протоколу для приготовления библиотек KAPA Library Preparation Kit (Roche, Швейцария). Целевые последовательности ДНК отбирали с использованием панели жидких зондов KAPA HyperChoice (Roche, Швейцария), включающей кодирующие участки 812 генов, ассоциированных с развитием рака. Секвенирование проводили на платформе NextSeq2000 (Illumina, США) методом

Таблица 1. *Соматические мутации в кодирующих участках гена EGFR, выявленные методом секвенирования нового поколения в образцах глиобластом IDH-wt (генотип дикого типа) (n = 70)*

Table 1. *Somatic mutations in coding regions of the EGFR gene detected by next generation sequencing in glioblastoma IDH-wt (wildtype genotype) samples (n = 70)*

Образец Sample	Мутация Mutation	Аминокислотная замена Aminoacid change	Экзон Exon	ЧВА, % VAF, %	Патогенность Pathogenicity	Опухоль Tumor	Источник Source
G7*	c.866C>T	p.Ala289Val	7	48	ВП/П LP/P	ГБМ GBM	[21]
G22	c.787A>C	p.Thr263Pro	7	37	ВП/П LP/P	ГБМ GBM	[16, 21]
G27*	c.2308_2309insAAC	p.Asn771dup	20	–	НЗ VUS	РЛ, КРР LC, CRC	[22]
G28*	c.719G >T	p.Cys240Phe	6	63	П P	Не описан Unknown	–
G32*	c.1985T>A	p.Leu662Gln	17	89	ВП LP	ГЦК GCK	[23]
G36*	c.866C>T	p.Ala289Val	7	90	ВП/П LP/P	ГБМ GBM	[21]
G44*	c.685A>T	p.Ser229Cys	6	36	НЗ VUS	Глиома, РГШ Glioma, HNC	[23]
G56*	c.3337C>T	p.Gln1113Ter	28	90	ВП LP	Глиома, РЛ Glioma, LC	[23]
	c.754C>T	p.Arg252Cys	7	87	НЗ VUS	Глиома, ГБМ Glioma, GBM	[23]
G65	c.323G>A	p.Arg108Lys	3	39	ВП/П LP/P	ГБМ, РЛ GBM, LC	[23]
G69*	c. 1793G>T	p.Gly598Val	15	30	П P	Глиома Glioma	[21]

**Образцы с амплификацией гена EGFR.*
Примечание. *ЧВА – частота вариантного аллеля в образце опухоли; РЛ – рак легкого; КРР – колоректальный рак; ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома; РГШ – рак головы и шеи; НЗ – вариант неопределенного значения; ВП – вероятно патогенный вариант; П – патогенный вариант.*
**Samples with EGFR gene amplification.*
Note. *VAF – variant allele frequency in sample of the tumor; RL – lung cancer; CRC – colorectal cancer; HCC – hepatocellular carcinoma; HNC – head and neck cancer; VUS – variant of uncertain significance; LP – probably pathogenic variant; P – pathogenic variant.*

парно-концевого чтения; среднее покрытие составило 300–500x.

Биоинформационный анализ проводили, как описано ранее [20]. Прочтения картировали на референсный геном человека GRCh37 (Ensembl release 75; hg19); для получения VCF-файлов использовали пакет GATK. Для оценки числа копий в различных участках генома (copy number variations, CNV) применяли сравнительный анализ частот β-аллелей (β-allele frequency, BAF) в парных образцах норма – опухоль. Отбирали все герминальные гетерозиготные варианты с частотой вариантного аллеля (variant allele frequency, VAF) от 40 до 60% в образце нормы и покрытием не менее 30 прочтений как в норме, так и в опухоли. Случаи вероятного изменения числа копий определяли, если значения VAF для опухоли были >40–60 %, а различия в VAF между нормой и опухолью – >25 % (p <0,05). BAF-анализ позволяет выявлять отклонения в числе копий, но не всегда дает возможность определить характер этого отклонения (делеция, амплификация и т.д.). Аннотацию и интерпретацию выявленных вариантов проводили с помощью баз данных Varsome, ClinVar, COSMIC, для оценки патогенности использовали критерии Американского колледжа медицинской генетики и геномики (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG).

Транскрипт *EGFRvIII* выявляли методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с последующей регистрацией результата с помощью электрофореза [23]. Для получения комплементарной ДНК проводили

реакцию обратной транскрипции, используя в качестве матрицы РНК опухоли, с помощью набора РЕВЕРТА-L (AmpliSens) согласно инструкции производителя. Применяли следующие праймеры, расположенные в 1-м и 8-м экзонах гена *EGFR*: EGFR-Ex1-F 5'-GAGTCGGGCTCTGGAGGAAA-3'; EGFR-Ex8-R 5'-CCATCTCATAGCTGTCGGG-3'. В случае наличия матричной РНК (мРНК) *EGFRvIII* в ходе реакции образовывался продукт длиной 92 п.н., в случае наличия мРНК *EGFR* дикого типа – 893 п.н. В образцах с деградированной мРНК для обнаружения продукта *EGFR* дикого типа использовали праймеры EGFR-Ex1-F 5'-GAGTCGGGCTCTGGAGGAAA-3' и EGFR-Ex2-R 5'-CAGTTATTGAACATCCTCTGGAG-3', длина продукта составила 111 п.н.

Для секвенирования последовательности варианта *EGFRvIII* использовали праймеры EGFR-Fseq 5'-GAGTCGGGCTCTGGAGGAAAA-3' и EGFR-Rseq 5'-GAGATCGCCACTGATGGAGGC-3', что позволило наработать продукт длиной 244 п.н. Секвенирование по Сэнгеру проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) на базе Центра коллективного пользования «Геном».

Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Instat (США). Использовали точный тест Фишера, который позволяет оценить статистическую значимость различий при сравнительном анализе категориальных переменных для выборок малых размеров. Различия считали статистически значимыми при $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом NGS проанализированы 75 парных образцов опухоль – норма пациентов с глиомой (астроцитомой и олигодендроглиомой) и ГБМ. В образцах глиомы ($n = 5$) выявлена мутация R132H в гене *IDH1,* таким образом, они составили группу глиом *IDH*-mut. Мутаций в гене *EGFR* в этой группе выявлено не было. Образцы ГБМ, не имеющие мутаций в генах *IDH1/2*, составили группу ГБМ *IDH*-wt ($n = 70$). В них обнаружены 11 (16 %) мутаций *EGFR* у 10 пациентов, у 1 пациента в опухоли присутствовали 2 мутации в этом гене (табл. 1).

Большинство выявленных вариантов представлено миссенс-мутациями (в 9 (82 %) из 11 случаев), в 1 (9 %) случае обнаружена инсерция аминокислоты p.N771_P772insN, в 1 (9 %) – однонуклеотидная замена с образованием стоп-кодона p.Q1113X. Более 70 % мутаций ранее определены в образцах глиомы или ГБМ, мутация p.Ala289Val (A289V), относящаяся к повторяющимся мутациям при ГБМ, в нашей выборке обнаружена в 2 образцах. Бóльшая часть мутаций локализована во внеклеточных доменах, участвующих в связывании с лигандами (73 % случаев), также выявлены отдельные мутации в трансмембранном, тирозинкиназном и С-концевом доменах (рис. 1).

Определение частоты вариантных аллелей для отдельных однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP) с высокой частотой распространения в популяции (beta-allele frequency, BAF) вдоль длины хромосомы в парных образцах опухоль – норма и оценка потери гетеро-

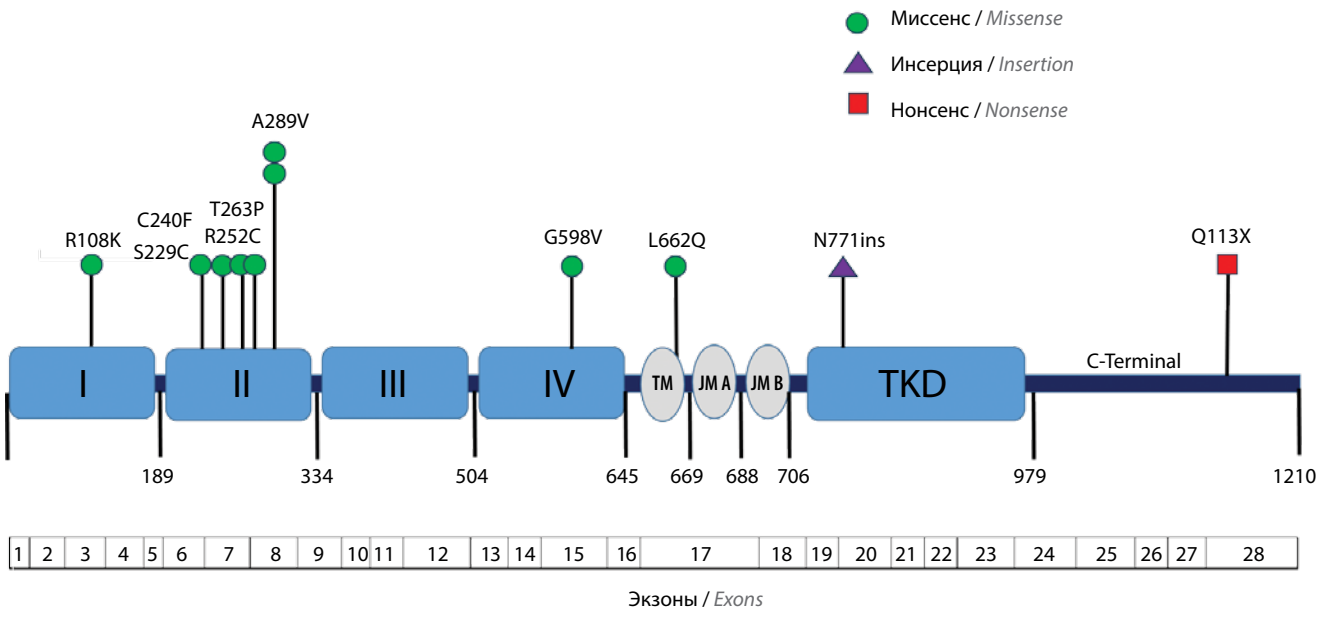


Рис. 1. *Распределение мутаций в гене EGFR, обнаруженных в образцах глиобластомы. I, II, III, IV – внеклеточные лиганд-связывающие домены; TM – трансмембранный домен; JM-A и JM-B – околомембранные домены; TKD – тирозинкиназный домен; C-Terminal – С-концевой домен*

Fig. 1. *Distribution of mutations in the EGFR gene identified in the glioblastoma samples. I, II, III, IV – extracellular ligand-binding domains; TM – transmembrane domain; JM-A u JM-B – juxtamembrane domains; TKD – tyrosine kinase domain; C-Terminal – C-terminal domain*

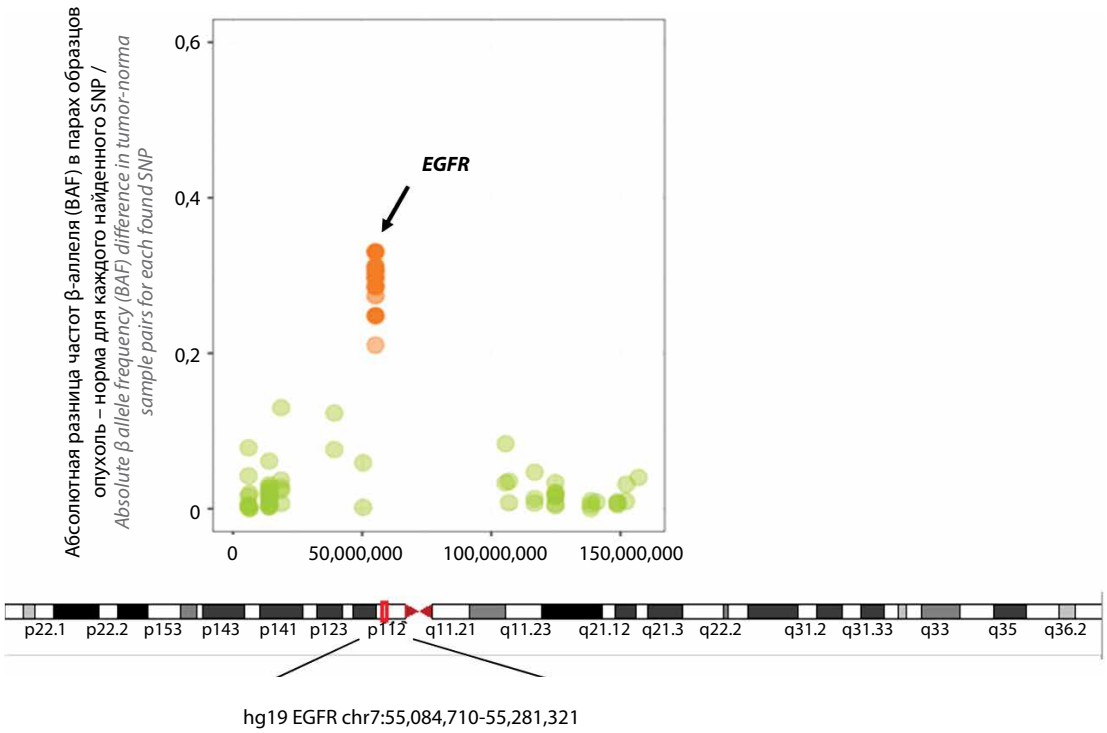


Рис. 2. *Определение амплификации гена EGFR при сравнении частот β-аллелей (BAF) в опухоли и норме по длине 7-й хромосомы (оранжевым цветом отмечены однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs), для которых выявлены статистически значимые различия)*
Fig. 2. *Detection of EGFR gene amplification when comparing β allele frequencies (BAF) in tumor and norma along the length of chromosome 7 (single nucleotide polymorphisms (SNPs) for which statistically significant differences were detected are marked in orange)*

зиготности позволяют выявить в опухолевых клетках участки хромосом с CNV. При анализе CNV в 7-й хромосоме наиболее часто обнаруживали сильное различие числа копий между опухолью и нормой в области 50–60 млн п.н., в которой локализован ген *EGFR* (рис. 2).

Высказано предположение, что изменение копийности данного участка хромосомы является амплификацией гена *EGFR*. Для подтверждения этого использовали метод ПЦР-РВ. Проводили сравнительный анализ пороговых циклов для гена *EGFR* и контрольного гена *WI-3306* в образце опухоли и нормальной ткани по методу ΔΔCt (рис. 3).

В образцах глиомы *IDH*-mut не выявлена амплификация гена *EGFR*. Одновременно с помощью двух методов проанализированы 62 образца *IDH*-wt ГБМ (табл. 2). Результаты определения амплификации гена *EGFR* совпали в 60 (97 %) случаях. В 8 (30 %) из 27 образцов с амплификацией гена *EGFR* также наблюдались точечные мутации в гене *EGFR* (см. табл. 1), в то время как в группе без амплификации мутации выявлены лишь в 2 (5 %) из 41 образца (p <0,05).

Наличие транскрипта *EGFRvIII* исследовали в 31 образце РНК, выделенной из свежезамороженной опухолевой ткани пациентов с ГБМ *IDH*-wt. Из них в 12 образцах обнаружена амплификация гена *EGFR*, в 18 образцах она отсутствовала (рис. 4). Вариант *EGFRvIII* выявлен в 4 (33 %) из 12 образцов с амплифицированным геном *EGFR*, в образцах без его амплификации этот структурный вариант отсутствовал (p <0,05).

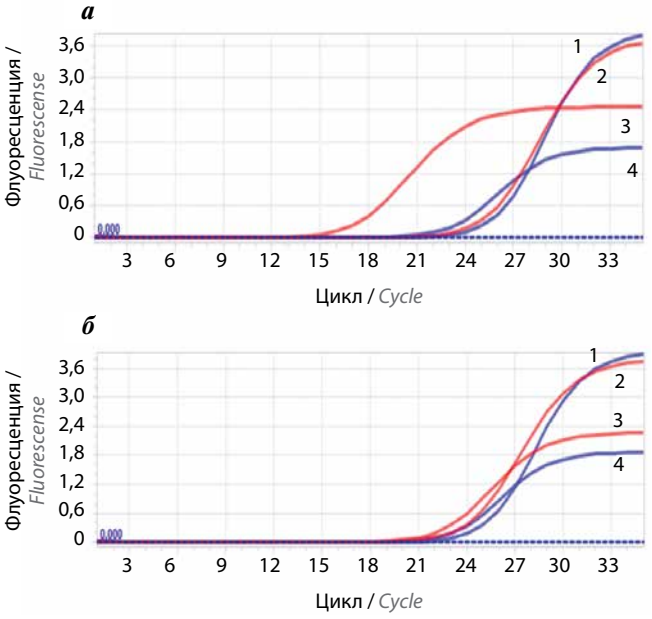


Рис. 3. *Определение амплификации гена EGFR в образцах глиобластомы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени: а – образец опухоли содержит амплификацию гена EGFR; б – в образце опухоли присутствует нормальное число копий гена EGFR. Кривые амплификации: 1 – ген EGFR в нормальной ткани; 2 – ген WI-3306 в нормальной ткани; 3 – ген EGFR в опухоли; 4 – ген WI-3306 в опухоли*
Fig. 3. *Determination of EGFR gene amplification in glioblastoma samples by quantitative polymerase chain reaction: a – tumor sample contains EGFR gene amplification; б – normal number of the EGFR gene copies is present in the tumor sample. Amplification curves: 1 – the EGFR gene in normal tissue; 2 – the WI-3306 gene in normal tissue; 3 – the EGFR gene in tumor; 4 – the WI-3306 gene in tumor*

Таблица 2. *Результаты определения амплификации гена EGFR в образцах глиобластом IDH-wt (генотип дикого типа) (n = 70), n (%)*

Table 2. *Results of the EGFR gene amplification analysis in glioblastoma IDH-wt samples (n = 70), n (%)*

Статус гена *EGFR* Status of the *EGFR* gene	ПЦР-РВ (ΔΔCt) (*n* = 68) qPCR (ΔΔCt) (*n* = 68)	NGS (BAF-анализ) (*n* = 63) NGS (BAF-analysis) (*n* = 63)
Есть амплификация Amplification is present	27 (40)	25 (40)
Нет амплификации No amplification	41 (60)	38 (60)

Примечание. *ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; NGS – секвенирование нового поколения; BAF – частоты β-аллелей.*

Note. *PCR-RV – real-time polymerase chain reaction; NGS – next generation sequencing; BAF – β-allele frequency.*

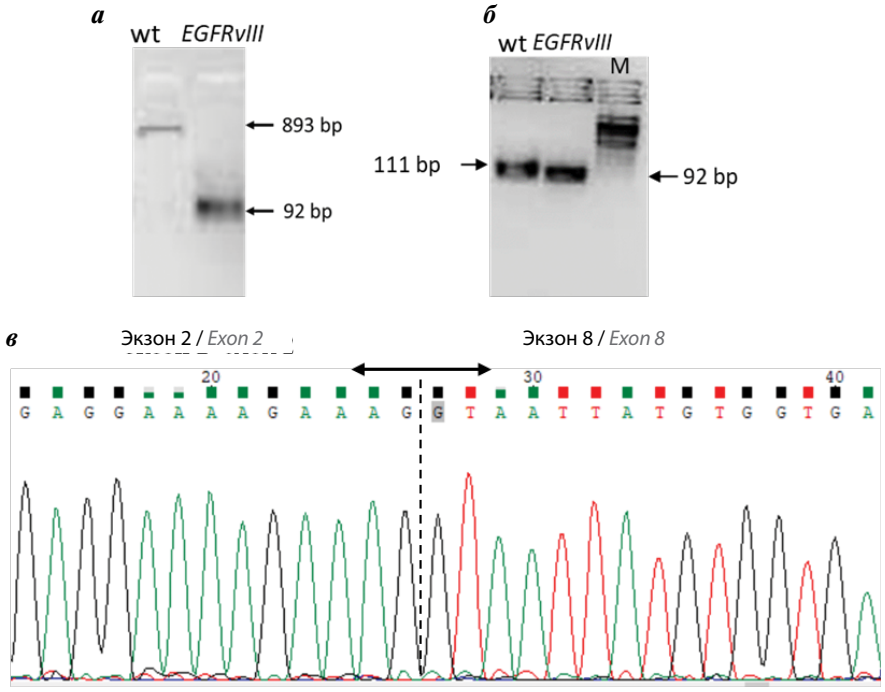


Рис. 4. *Определение транскрипта EGFRvIII: а – электрофореграмма продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) длиной 893 п.н. (EGFR дикого типа) и 92 п.н. (EGFRvIII); б – электрофореграмма продуктов ПЦР длиной 111 п.н. (EGFR дикого типа) и 92 п.н. (EGFRvIII) в случае деградированной ДНК; в – фрагмент хроматограммы сиквенса EGFRvIII, пунктиром и стрелками отмечено место слияния 2-го и 8-го экзонов (bp – нуклеотидная пара, п.н.)*

Fig. 4. *Detection of EGFRvIII transcript: a – electropherogram of 893 bp (wild-type EGFR) and 92 bp (EGFRvIII) polymerase chain reaction (PCR) products; б – electropherogram of 111 bp (wild-type EGFR) and 92 bp (EGFRvIII) PCR products in case of degraded DNA; в – a fragment of the EGFRvIII sequence chromatogram, dotted lines and arrows indicate the site of fusion of exons 2 and 8 (bp – base pair)*

Операция по удалению опухоли проведена 1 из 51 пациентов с ГБМ *IDH*-wt (первичная ГБМ). У 19 больных с ГБМ *IDH*-wt материал опухоли получен в результате повторного хирургического вмешательства (рецидивная ГБМ). Проведен также сравнительный анализ частоты встречаемости структурных вариантов гена *EGFR* в группах с первичной и рецидивной ГБМ *IDH*-wt (табл. 3). Статистически значимых различий между пациентами с первичной и рецидивной ГБМ выявлено не было.

Таблица 3. *Частота структурных изменений гена EGFR в образцах первичной и рецидивной глиобластом IDH-wt (генотип дикого типа), n (%)*

Table 3. *Frequency of EGFR gene structural alterations in primary and relapsed glioblastoma IDH-wt (wildtype genotype) samples, n (%)*

Структурные варианты гена *EGFR* Structural variants of the *EGFR* gene	**Первичная глиобластома (*n* = 51)** Primary glioblastoma (*n* = 51)	**Рецидивная глиобластома (*n* = 19)** Recurrent glioblastoma (*n* = 19)	***p***
Мутации Mutations	10/51 (19,6)	1/19 (5,2)	>0,05
Амплификация гена *EGFR* Amplification of the *EGFR* gen	21/51 (41)	6/19 (32)	>0,05
Вариант EGFRvIII (*n* = 31) Variant EGFRvIII (*n* = 31)	3/25 (12)	1/6 (17)	>0,05

Примечание. *Для статистического анализа применяли точный тест Фишера.*
Note. *Fisher's exact test was used for statistical analysis.*

ОБСУЖДЕНИЕ

Секвенирование нового поколения является наиболее часто используемым на сегодняшний день подходом к анализу молекулярных маркеров при опухолях головного мозга, в том числе при глиомах разной степени злокачественности [21]. Мы продемонстрировали эффективность этого подхода в определении различных генетических аберраций, включая однонуклеотидные замены и изменения числа копий участков хромосом, на примере анализа структурных изменений гена *EGFR* при ГБМ (см. рис. 1, 2).

В нашем исследовании в образцах ГБМ *IDH*-wt мутации гена *EGFR* выявлены в 16 % случаев, амплификация гена *EGFR* – в 40 % (см. табл. 1, 2), что в целом согласуется с данными литературы [7, 8, 24, 25]. Большинство мутаций ранее выявляли в образцах различных опухолей, в том числе опухолей центральной нервной системы [23]. Мутация c.719G>T (p.Cys240Phe), приводящая к замене цистеина на фенилаланин в кодоне 240, не отмечена в базах данных соматических мутаций (cBioPortal, COSMIC), в то время как другая нуклеотидная замена в этой же позиции c.719G>A (p.Cys240Tyr, COSM3412176) определена в образцах глиом [23]. Мутация c.719G>T локализуется во внеклеточном домене белка, согласно критериям ACMG она является вероятно патогенной, однако ее влияние на активность EGFR не определено. В 80 % случаев мутации ассоциированы с амплификацией гена *EGFR* (p <0,05). Для верификации результатов определения амплификации гена *EGFR* методом NGS использован метод ПЦР-РВ. Совпадение данных, полученных двумя методами, составило 97 %. Для выявления транскрипта *EGFRvIII* использовали ОТ-ПЦР (см. рис. 3), которая является «золотым стандартом» [19], хотя также широко распространены различные методы на основе ПЦР-РВ и иммуногистохимический анализ [8, 26]. В нашем исследовании вариант *EGFRvIII* выявлен только в образцах с амплификацией гена *EGFR* (13 % от общего числа исследованных образцов и 33 % от общего числа образцов с амплификацией гена *EGFR*). В целом структурные изменения гена *EGFR* обнаружены в 41,4 % случаев ГБМ *IDH*-wt, что согласуется с данными литературы.

Выявлено, что структурные изменения EGFR при ГБМ приводят к гиперэкспрессии или конститутивной активации EGFR без связывания лиганда EGF. В свою очередь, это вызывает активацию нижележащих сигнальных путей и оказывает антиапоптотическое действие на опухолевую клетку, запуская механизмы онкогенной трансформации [4, 19].

При исследовании прогностической значимости структурных изменений гена *EGFR* оценивают общую и безрецидивную выживаемость и состояние пациентов по шкале Карновского. В нашем исследовании мы сравнили частоту структурных изменений гена *EGFR* у больных с первичными и рецидивными ГБМ *IDH*-wt. Мутации и амплификация гена *EGFR* чаще встречались у пациентов с первичными ГБМ, чем у пациентов с рецидивными ГБМ: 19,6 и 5,2 % случаев соответственно и 41 и 32 % случаев соответственно (см. табл. 3), однако эти различия статистически незначимы. В работе M. Padovan и соавт. мутации и амплификация гена *EGFR* значимо чаще встречались при рецидивной ГБМ, таким образом, являясь фактором риска развития рецидива опухоли [27]. В целом данные относительно прогностической роли мутаций и амплификации гена *EGFR* довольно противоречивы. В ряде работ эти молекулярные события рассматривают в качестве благоприятных прогностических факторов, ассоциированных с лучшим исходом [8]. В то же время по результатам метаанализа, включавшего 10 исследований и 1074 пациентов, повышенная экспрессия гена *EGFR*, которую связывают с аберрантным мутационным статусом, статистически значимо ассоциирована с плохим прогнозом при ГБМ [28].

Вариант *EGFRvIII* в нашем исследовании чаще встречался в образцах рецидивной ГБМ по сравнению с первичной (17 % против 12 %); разница статистически незначима. Эти данные не противоречат тому, что экспрессия *EGFRvIII* в клетках опухоли в большинстве работ рассматривается как прогностически неблагоприятный фактор [29]. В целом различия в оценке прогностической роли структурных изменений в гене *EGFR* могут быть связаны с разным размером исследованных выборок, различиями в протоколах лечения, а также наличием мутаций в других генах, которые также могут существенно влиять на клинический исход.

Рецепторная тирозинкиназа EGFR является наиболее частой мишенью молекулярно-направленной терапии при ГБМ [30]. С одной стороны, это обусловлено тем, что структурные изменения гена *EGFR* являются очень распространенными генетическими изменениями, которые встречаются в 40 % и более случаев ГБМ [6]. С другой стороны, довольно хорошо изучены их роль в развитии опухоли и механизм онкогенной трансформации. Эксперименты на моделях EGFR-мутантных клеточных линий ГБМ и ксенотрансплантатов, полученных от пациентов, показали, что ингибирование и/или нокдаун EGFR вызывает гибель клеток, что подтверждает критическую роль конститутивной активации EGFR в глиомагенезе [31]. Кроме того, в связи с успешным применением ингибиторов рецепторных тирозинкиназ, в том числе EGFR, в лечении различных видов рака, прежде всего НМРЛ, выделен непрерывно пополняемый ряд химических соединений с антионкогенной активностью, направленной на блокирование EGFR-зависимого сигнального пути.

Однако на сегодняшний день пока не выявлено ни одного соединения из класса ингибиторов тирозинкиназы, демонстрирующего однозначный положительный эффект при лечении ГБМ. Ингибиторы, которые были успешно использованы в лечении НМРЛ при наличии активирующих мутаций внутриклеточного тирозинкиназного домена EGFR, показали практически нулевой результат в отношении ГБМ [32]. При ГБМ мутации происходят чаще всего во внеклеточной части белка, нарушают специфичность распознавания лигандов и влияют на процессы димеризации EGFR [33]. Актуальным является поиск ингибиторов EGFR, не зависящих от наличия мутаций, так как при амплификации гена *EGFR* опухолевые клетки часто экспрессируют белок EGFR дикого типа. Транскрипт *EGFRvIII* рассматривается в качестве перспективной мишени для таргетной терапии, поскольку довольно распространен и обладает выраженным онкогенным потенциалом. Однако показано, что вариант *EGFRvIII* может присутствовать в опухолевых клетках в виде внехромосомной ДНК, устраняться из клеток под действием препаратов и появляться снова после прекращения терапии [34]. Анти-EGFR-моноклональные антитела (цетуксимаб, панитумумаб, нимотузумаб) не показали какого-либо эффекта в лечении пациентов с ГБМ [35].

В терапии ГБМ применяют также осимертиниб – пероральный ингибитор тирозинкиназы III поколения, необратимо ингибирующий EGFR. Он разработан для лечения пациентов с устойчивой мутацией T790M в гене *EGFR* при EGFR-мутированном НМРЛ. Данный препарат обладает способностью проникать через гематоэнцефалический барьер и продемонстрировал высокую эффективность в отношении метастазов в головной мозг при EGFR-мутантном НМРЛ [36]. Также при лечении рецидивной ГБМ отмечен хороший ответ на мультикиназный ингибитор регорафениб [37].

В качестве основных причин отсутствия эффекта при использовании анти-EGFR-таргетной терапии отмечают гетерогенность опухоли и наличие субклонов с различным спектром мутаций. Возможны компенсаторная активация других рецепторных киназ, например PDGFRA и MET, и переключение на другие сигнальные пути, что в будущем может потребовать более тщательного анализа субклональной структуры опухоли и применения комбинаторных методов лечения [35]. Также важной причиной неудачи анти-EGFR-терапии в клинических испытаниях является неэффективное проникновение препарата в центральную нервную систему и распределение в ней из-за наличия гематоэнцефалического барьера и, как правило, крайне разветвленной сосудистой сети в самой опухоли, что может привести к заметному снижению концентрации препарата (ниже терапевтических значений).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод секвенирования нового поколения позволяет выявлять точечные мутации, инсерции, делеции и изменения числа копий гена *EGFR*. Суммарно различные структурные изменения этого гена (мутации, амплификация, вариант *EGFRvIII*) обнаружены в 41,4 % ГБМ *IDH*-wt. Статистически значимых различий в частоте встречаемости структурных изменений гена *EGFR* в образцах первичных и рецидивных ГБМ не выявлено. Дальнейшее изучение мутационного статуса гена *EGFR* в сопоставлении с клиническими характеристиками, анализ субклональной организации опухоли, лучшее понимание гетерогенности ГБМ, исследование микроокружения опухоли, а также более глубокое изучение EGFR-зависимого сигнального пути и его взаимодействия с другими внутриклеточными путями позволят создать предпосылки для повышения эффективности молекулярно-направленной терапии ГБМ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Herbst R.S. Review of epidermal growth factor receptor biology. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2004;59(2):21–6. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2003.11.041
2. Hynes N.E., Lane H.A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. Nat Rev Cancer 2005;5(5):341–54. DOI: 10.1038/nrc1609
3. Jones S., Rappoport J.Z. Interdependent epidermal growth factor receptor signalling and trafficking. Int J Biochem Cell Biol 2014;51:23–8. DOI: 10.1016/j.biocel.2014.03.014
4. Sigismund S., Avanzato D., Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. Mol Oncol 2018;12(1):3–20. DOI: 10.1002/1878-0261.12155
5. Dreux A.C., Lamb D.J., Modjtahedi H., Ferns G.A. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. Atherosclerosis 2006;186(1):38–53. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.06.038
6. Saadeh F.S., Mahfouz R., Assi H.I. EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas. Int J Biol Markers 2018;33(1): 22–32. DOI: 10.5301/ijbm.5000301
7. Brennan C.W., Verhaak R.G., McKenna A. et al. TCGA Research Network. The somatic genomic landscape of glioblastoma. Cell 2013;155(2):462–77. DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.034
8. HigaN., AkahaneT., Hamada T. et al Distribution and favorable prognostic implication of genomic EGFR alterations in IDH-wildtype glioblastoma. Cancer Med 2023;12(1):49–60. DOI: 10.1002/cam4.4939
9. Louis D.N., Perry A., Wesseling P. et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. Neuro Oncol 2021;23(8):1231–51. DOI: 10.1093/neuonc/noab106
10. Gan H.K., Cvrljevic A.N., Johns T.G. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. FEBS J 2013;280(21):5350–70. DOI: 10.1111/febs.12393
11. Eskilsson E., Rosland G.V., Talasila K.M. et al. EGFRvIII mutations can emerge as late and heterogenous events in glioblastoma development and promote angiogenesis through Src activation. Neuro Oncol 2016;18(12):55. DOI: 10.1093/neuonc/now113
12. Alnahhas I., Rayi A., Guillermo Prieto Eibl M.D.P. et al. Prognostic implications of epidermal and platelet-derived growth factor receptor alterations in 2 cohorts of IDH wt glioblastoma. Neurooncol Adv 2021;3(1):vdab127. DOI: 10.1093/noajnl/vdab127
13. Li J., Liang R., Song C. et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in glioma patients. Onco Targets Ther 2018;2018(11):731–42. DOI: 10.2147/OTT.S155160
14. Hovinga K.E., McCrea H.J., Brennan C. et al. EGFR amplification and classical subtype are associated with a poor response to bevacizumab in recurrent glioblastoma. J Neurooncol 2019;142(2):337–45. DOI: 10.1007/s11060-019-03102-5
15. Le Rhun E., Preusser M., Roth P. et al. Molecular targeted therapy of glioblastoma. Cancer Treat Rev 2019;80:101896. DOI: 10.1016/j.ctrv.2019.101896
16. Vivanco I., Robins H.I., Rohle D. et al. Differential sensitivity of glioma- versus lung cancer-specific EGFR mutations to EGFR kinase inhibitors. Cancer Discov 2012;2(5):458–71. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-11-0284
17. Desai R., Suryadevara C.M., Batich K.A. et al. Emerging immunotherapies for glioblastoma. Expert Opin Emerg Drugs 2016;21(2):133–45. DOI: 10.1080/14728214.2016.1186643
18. Weller M., Butowski N., Tran D.D. et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. Lancet Oncol 2017;18(10):1373–85. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30517-X
19. Felsberg J., Hentschel B., Kaulich K. et al. German Glioma Network. Epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) positivity in EGFR-amplified glioblastomas: prognostic role and comparison between primary and recurrent tumors. Clin Cancer Res 2017;23(22):6846–55. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0890
20. Краснов Г.С., Гукасян Л.Г., Абрамов И.С., Наседкина Т.В. Определение субклональной структуры опухоли по данным высокопроизводительного секвенирования на примере острого миелоидного лейкоза у детей и акральной меланомы. Молекулярная биология 2021;55(5):829–45. DOI: 10.31857/S0026898421050050
Krasnov G.S., Ghukasyan L.G., Abramov I.S., Nasedkina T.V. Determination of the subclonal tumor structure in childhood acute myeloid leukemia and acral melanoma by next-generation sequencing. Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology 2021;55(5):829–45. (In Russ.). DOI: 10.31857/S0026898421050050
21. Chang M.T., Asthana S., Gao S.P. et al. Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. Nat Biotechnol 2016;34(2):155–63. DOI: 10.1038/nbt.3391
22. Naidoo J., Sima C.S., Rodriguez K. et al. Epidermal growth factor receptor exon 20 insertions in advanced lung adenocarcinomas: clinical outcomes and response to erlotinib. Cancer 2015;121(18):3212–20. DOI: 10.1002/cncr.29493
23. The cBio Cancer Genomics Portal. https://www.cbioportal.org/.
24. Zacher A., Kaulich K., Stepanow S. et al. Molecular diagnostics of gliomas using next generation sequencing of a glioma-tailored gene panel. Brain Pathol 2017;27(2):146–59. DOI: 10.1111/bpa.12367
25. Blobner J., Dengler L., Blobner S. et al. Significance of molecular diagnostics for therapeutic decision-making in recurrent glioma. Neurooncol Adv 2023;5(1):vdad060. DOI: 10.1093/noajnl/vdad060
26. Rutkowska A., Strózik T., Jędrychowska-Dańska K. et al. Immunohistochemical detection of EGFRvIII in glioblastoma – anti-EGFRvIII antibody validation for diagnostic and CAR-T purposes. Biochem Biophys Res Commun 2023;685:149133. DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.149133
27. Padovan M., Maccari M., Bosio A. et al. Actionable molecular alterations in newly diagnosed and recurrent *IDH1/2* wild-type glioblastoma patients and therapeutic implications: a large mono-institutional experience using extensive next-generation sequencing analysis. Eur J Cancer 2023;191:112959. DOI: 10.1016/j.ejca.2023.112959
28. Li J., Liang R., Song C. et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in glioma patients. Onco Targets Ther 2018;11:731–42. DOI: 10.2147/OTT.S155160
29. Yang K., Ren X., Tao L. et al. Prognostic implications of epidermal growth factor receptor variant III expression and nuclear translocation in Chinese human gliomas. Chin J Cancer Res 2019;31(1):188–202. DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604.2019.01.14
30. Begagić E., Pugonja R., Bečulić H. et al. Molecular targeted therapies in glioblastoma multiforme: a systematic overview of global trends and findings. Brain Sci 2023;13(11):1602. DOI: 10.3390/brainsci13111602
31. An Z., Aksoy O., Zheng T. et al. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. Oncogene 2018;37(12):1561–75. DOI: 10.1038/s41388-017-0045-7
32. Hegi M.E., Diserens A.C., Bady P. et al. Pathway analysis of glioblastoma tissue after preoperative treatment with the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib – a phase II trial. Mol Cancer Ther 2011;10(6):1102–12. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0048
33. Hu C., Leche C.A., Kiyatkin A. et al. Glioblastoma mutations alter EGFR dimer structure to prevent ligand bias. Nature 2022;602(7897):518–22. DOI: 10.1038/s41586-021-04393-3
34. Nathanson D.A., Gini B., Mottahedeh J. et al. Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA. Science 2014;343(6166):72–6. DOI: 10.1126/science.1241328

35. Eskilsson E., Røsland G.V., Solecki G. et al. EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma. Neuro Oncol 2018;20(6):743–52. DOI: 10.1093/neuonc/nox191
36. Soria J.-C., Ohe Y., Vansteenkiste J. et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2018;378(2):113–25. DOI: 10.1056/NEJMoa1713137
37. Chiesa S., Mangraviti A., Martini M. et al. Clinical and NGS predictors of response to regorafenib in recurrent glioblastoma. Sci Rep 2022;12(1):16265. DOI: 10.1038/s41598-022-20417-y

Вклад авторов
В.О. Варачев: проведение молекулярно-генетических исследований, секвенирования нового поколения, интерпретация данных, написание текста статьи;
О.Ю. Сусова: сбор материала, проведение молекулярно-генетических тестов, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;
А.А. Митрофанов: ведение пациентов с глиобластомами, сбор клинического материала, анализ и интерпретация данных;
Г.С. Краснов: биоинформационный анализ результатов секвенирования, анализ и интерпретация данных;
Д.Р. Насхлеташвили: ведение пациентов с глиомами и глиобластомами, анализ результатов молекулярного-генетического исследования и интерпретация данных;
Ю.И. Аммур: проведение молекулярно-генетических исследований, анализ и интерпретация данных;
С.Д. Бежанова: сбор и анализ клинического материала;
Н.В. Севян, Е.В. Прозоренко: ведение пациентов с глиобластомами, сбор операционного материала;
А.Х. Бекяшев: разработка дизайна исследования, сбор операционного материала, анализ и интерпретация результатов, научное редактирование;
Т.В. Наседкина: разработка концепции исследования, планирование экспериментов, анализ и интерпретация результатов, написание текста статьи.
Authors' contributions
V.O. Varachev: conducting molecular genetic research, sequencing a new generation, interpreting data, article writing;
O.Yu. Susova: collecting material, conducting molecular genetic tests, analyzing and interpreting data, article writing;
A.A. Mitrofanov: management of patients with glioblastomas, collection of clinical material, analysis and interpretation of data;
G.S. Krasnov: bioinformatic analysis of sequencing results, data analysis and interpretation;
D.R. Naskhletashvili: management of patients with gliomas and glioblastomas, analysis of the results of molecular genetic research and interpretation of data;
Yu.I. Ammour: conducting molecular genetic studies, data analysis and interpretation;
S.D. Bezhanova: collection and analysis of clinical material;
N.V. Sevyan, E.V. Prozorenko: management of patients with glioblastomas, collection of surgical material;
A.Kh. Bekyashev: research design development, collection of operational material, analysis and interpretation of results, scientific editing;
T.V. Nasedkina: development of the research concept, experimental planning, analysis and interpretation of the results, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors
В.О. Варачев / V.O. Varachev: https://orcid.org/0000-0002-3567-3761
О.Ю. Сусова / O.Yu. Susova: https://orcid.org/0000-0001-8192-7913
А.А. Митрофанов / A.A. Mitrofanov: https://orcid.org/0000-0002-4125-7342
Г.С. Краснов / G.S. Krasnov: https://orcid.org/0000-0002-6493-8378
Д.Р. Насхлеташвили / D.R. Naskhletashvili: https://orcid.org/0000-0002-4218-9652
Ю.И. Аммур / Yu.I. Ammour: https://orcid.org/0000-0003-0223-5738
С.Д. Бежанова / S.D. Bezhanova: https://orcid.org/0000-0001-7336-9210
Н.В. Севян / N.V. Sevyan: https://orcid.org/0000-0001-5841-7480
Е.В. Прозоренко / E.V. Prozorenko: https://orcid.org/0000-0001-8880-1758
А.Х. Бекяшев / A.Kh. Bekyashev: https://orcid.org/0000-0002-4160-9598
Т.В. Наседкина / T.V. Nasedkina: https://orcid.org/0000-0002-2642-4202

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

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00304).
Funding. The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 22-15-00304).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики
Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (протокол № 7 от 27 июля 2023 г.).
Пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Compliance with patient rights and principles of bioethics
The study was approved by the committee on biomedical ethics of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 7 dated 27 July, 2023).
The patients signed an informed consent to participate in the study

Статья поступила:30.11.2023. **Принята к публикации:** 10.09.2024. **Опубликована онлайн:** 09.10.2024.
Article submitted: 30.11.2023. **Accepted for publication:** 10.09.2024. **Published online:** 09.10.2024.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-79-91

BY 4.0

Противоопухолевые эффекты сочетанного действия рекомбинантного циклофилина А человека и ингибиторов контрольных точек иммунитета в экспериментальной модели меланомы В16 *in vivo*

А.А. Калинина, Д.Б. Казанский, Л.М. Хромых

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

Контакты: Анастасия Андреевна Калинина *aakalinina89@gmail.com*

Введение. Ингибиторы контрольных точек иммунитета занимают особое место среди стратегий иммунотерапии онкологических заболеваний. На сегодняшний день наиболее широкое клиническое применение получили анти-CTLA-4 (CTLA-4 – гликопротеин цитотоксических лимфоцитов 4) и анти-PD-1/PD-L1-терапия (PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели 1, PD-L1 – лиганд 1 PD-1). Между тем терапия ингибиторами контрольных точек иммунитета не всегда оказывается успешной, и многочисленные исследования указывают на необходимость комбинирования ее с другими подходами иммунотерапии, в том числе с цитокинами. Особый интерес в этом отношении представляет секреторный циклофилин А (ЦфА). Плейотропое иммуностимулирующее действие и противоопухолевый эффект рекомбинантного ЦфА человека (рчЦфА) показаны нами ранее. Наши исследования рчЦфА как противоопухолевого фактора указывают на перспективность его использования в химио-иммунотерапии и комбинированной иммунотерапии онкологических заболеваний.

Цель исследования – оценить противоопухолевые эффекты комбинированной иммунотерапии с использованием рчЦфА и ингибиторов контрольных точек иммунитета в модели меланомы В16 *in vivo*.

Материалы и методы. Мышам C57BL/6 подкожно прививали клетки меланомы В16. На 6-й и 9-й дни после прививки опухоли вводили внутривенно блокирующие моноклональные антитела к PD-1, PD-L1 и лиганду 2 PD-1 (PD-L2), рецептору CTLA-4, белку гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3) или молекуле CD276 в дозе 100 мкг/мышь. Рекомбинантный ЦфА человека вводили подкожно на 6–10-й дни после прививки опухоли в дозе 100 мкг/мышь. Терапевтический эффект сочетанной иммунотерапии оценивали по динамике роста меланомы В16 и выживаемости животных-опухоленосителей.

Результаты. В комбинации с антителами к CTLA-4 рчЦфА проявлял выраженное и продолжительное синергическое противоопухолевое действие до 19-го дня по окончании комбинированной иммунотерапии с увеличением продолжительности жизни экспериментальных животных на 70 %. Рекомбинантный ЦфА человека в сочетании с антителами к LAG-3 оказывал синергический терапевтический эффект до 12-го дня после иммунотерапии. Сочетание рчЦфА с антителами к PD-L1 и CD276 имело кратковременный эффект до 5-го дня после терапии. Комбинирование рчЦфА с блокаторами PD-1 и LAG-3 отменяло противоопухолевое действие двойной терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о способности рчЦфА значительно усиливать терапевтический эффект отдельных ингибиторов контрольных точек иммунитета. Таким образом, рчЦфА может быть предложен в качестве потенциального компонента комбинированной противоопухолевой иммунотерапии.

Ключевые слова: циклофилин А, ингибитор контрольных точек иммунитета, комбинированная иммунотерапия, меланома В16

Для цитирования: Калинина А.А., Казанский Д.Б., Хромых Л.М. Противоопухолевые эффекты сочетанного действия рекомбинантного циклофилина А человека и ингибиторов контрольных точек иммунитета в экспериментальной модели меланомы В16 *in vivo*. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(3):79–91.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-79-91

Anti-tumor effects of recombinant human cyclophilin A combined with immune checkpoint inhibitors in the experimental model of melanoma B16 *in vivo*

A.A. Kalinina, D.B. Kazansky, L.M. Khromykh

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

Contacts: Anastasiia Andreevna Kalinina *aakalinina89@gmail.com*

Introduction. Immune checkpoint inhibitors have an exceptional position in cancer immunotherapy. Currently, anti-CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) and anti-PD-1/PD-L1 (PD-1 – programmed cell death 1, PD-L1 – programmed death 1 ligand 1) therapies are most widely applied in clinical practice. Still, immune checkpoint inhibitors therapy is not always successful, and multiple studies have indicated that it should be combined with other immunotherapeutic strategies, including cytokines. Secreted cyclophilin A (CypA) could be of particular interest in this respect. Previously, we showed that recombinant human CypA (rhCypA) had pleiotropic immunostimulatory activity and anti-tumor effects. Studies of rhCypA as an anti-cancer factor pointed to its potential use in cancer chemoimmunotherapy and combination immunotherapy.

Aim. To evaluate anti-tumor effects of combined immunotherapy using rhCypA and immune checkpoint inhibitors in the mouse model of melanoma B16 *in vivo*.

Materials and methods. C57BL/6 mice were subcutaneously transplanted with melanoma B16. On days 6 and 9 post-tumor transplantation, monoclonal antibodies to PD-1, PD-L1 and programmed cell death 1 ligand 2 (PD-L2), CTLA-4, lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3), or CD276 were intravenously injected into mice at a dose of 100 μg/mouse. RhCypA was injected s/c on days 6–10 post-tumor transplantation at a dose of 100 μg/mouse. The therapeutic effects of combined immunotherapy were evaluated by melanoma B16 growth dynamics and the survival of tumor-bearing mice.

Results. In combination with anti-CTLA-4 monoclonal antibodies, rhCypA had the most distinct and prolonged synergic anti-tumor effects until day 19 post-immunotherapy, with an increase in animal lifespan of 70 %. When used with anti-LAG-3 monoclonal antibodies, rhCypA exhibited a synergic therapeutic effect by day 12 post-therapy. Combination of rhCypA with anti-PD-L1 or anti-CD276 monoclonal antibodies had short-term synergic effects until day 5 after therapy. Recombinant human CypA impeded the anti-tumor effects of dual anti-PD-1 + anti-LAG-3 therapy.

Conclusion. Our findings pointed out that rhCypA could significantly improve therapeutic effects of individual immune checkpoint inhibitors. Therefore, rhCypA could be potentially proposed as a component of combined anti-tumor immunotherapy.

Keywords: cyclophilin A, immune checkpoint inhibitor, combined immunotherapy, melanoma B16

For citation: Kalinina A.A., Kazansky D.B., Khromykh L.M. Anti-tumor effects of recombinant human cyclophilin A combined with immune checkpoint inhibitors in the experimental model of melanoma B16 *in vivo*. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(3):79–91. (In Russ.).

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-79-91

ВВЕДЕНИЕ

Развитие иммунотерапии, направленной на коррекцию иммунного статуса пациента и рестимуляцию противоопухолевых иммунных ответов, произвело революцию в лечении онкологических заболеваний [1–3]. Среди различных подходов к иммунотерапии ингибиторы контрольных точек иммунитета (immune checkpoint inhibitors, ICIs) занимают особое место [2].

Рецептор программируемой клеточной гибели 1 (PD-1), гликопротеин цитотоксических лимфоцитов 4 (CTLA-4), белок гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3), Т-клеточный иммуноглобулин и муциновый домен 3 (TIM3) и другие молекулы являются ключевыми контрольными точками иммунитета и играют большую роль в развитии иммунного ответа, регулируя активацию, пролиферацию и функциональную активность Т-лимфоцитов и естественных киллеров (NK-клеток) [1, 2, 4–6]. В микроокружении опухоли Т- и NK-клетки зачастую имеют фенотип функционального истощения [1, 4–6], который характеризуется высоким уровнем экспрессии этих и некоторых других ингибиторных молекул [2, 6]. Вследствие этого Т-лимфоциты и NK-клетки не могут реализовывать свои эффекторные функции и вовлекаться в цитотоксический противоопухолевый ответ. Кроме того, компоненты опухолевого микроокружения экспрессируют ряд ингибиторных молекул (например, лиганды 1 и 2 PD-1 (PD-L1/PD-L2)), которые участвуют в негативной регуляции иммунного ответа [1, 4, 6]. Ингибиторы контрольных точек иммунитета отменяют механизмы индукции анергии Т-лимфоцитов и NK-клеток, восстанавливая и поддерживая их функциональную активность в супрессорном опухолевом микроокружении и стимулируя развитие противоопухолевых ответов [2, 6].

В настоящее время ICI-терапия, в частности с использованием анти-PD-1/PD-L1- и анти-CTLA-4-моноклональных антител (Мат), широко внедрена в клиническую практику, и ее эффективность подтверждена при многих типах опухолей, в том числе меланоме [1, 2, 7]. Однако анти-CTLA-4-терапия дает хорошие результаты

всего у 15–20 % больных меланомой [8], а у 60–70 % пациентов с различными типами рака не наблюдается ответ на блокирование PD-1/PD-L1 [9, 10]. Между тем экспериментальные данные свидетельствуют о синергическом эффекте комбинации нескольких ICIs в силу одновременного блокирования различных супрессорных путей в Т-клетках [11–13]. Так, сочетание блокирующих анти-PD-1- и анти-LAG-3-Мат недавно было клинически одобрено для терапии меланомы IV стадии [14].

Стоит особо отметить, что ICI-терапия может быть успешной только в отношении так называемых иммунологически «горячих» опухолей, в определенной степени инфильтрированных NK-клетками и Т-лимфоцитами [2, 15]. Между тем ICI-терапия «холодных» опухолей оказывается неэффективной в связи с практически полным отсутствием данных эффекторов иммунитета и низким уровнем экспрессии, в частности PD-1/PD-L1 в микроокружении опухоли [2, 15].

Результаты актуальных исследований указывают на необходимость сочетания использования ICIs с другими терапевтическими подходами [1, 2, 7, 15, 16]. Широкий спектр иммунорегуляторных цитокинов (интерлейкины (ИЛ) 2, 12, 15, интерфероны (ИФН) α и γ), фактор некроза опухоли α (ФНО-α)) потенциально можно использовать в комбинированной противоопухолевой иммунотерапии для повышения эффективности ICIs [17]. Данные провоспалительные цитокины стимулируют антигенное примирование Т-клеток, усиливают инфильтрацию опухоли эффекторными иммунными клетками и повышают их цитотоксические функции. Однако их применение в клинической практике весьма ограничено и сопряжено с развитием тяжелых побочных эффектов. В настоящее время только ИФН-α и ИЛ-2 одобрены для клинического использования и включены в протоколы лечения опухолей ряда нозологий [17]. Таким образом, остро стоит проблема поиска новых эффективных и более безопасных подходов цитокиновой иммунотерапии для возможности их комбинирования с ICIs.

Особый интерес в этом отношении может представлять секреторный провоспалительный циклофилин А (ЦфА), который обладает плейотропным иммунорегуляторным действием. Он стимулирует созревание и функционирование дендритных клеток [18], опосредуя таким образом развитие адаптивного иммунного ответа. Секреторный ЦфА также участвует в формировании очага воспаления [19] и регулирует продукцию и функции других хемокинов и провоспалительных факторов [20]. Ранее мы показали, что рекомбинантный ЦфА человека (рчЦфА) обладает противоопухолевой активностью и способен подавлять рост и метастазирование опухолей различного гистогенеза [21] посредством активации врожденного и адаптивного звеньев иммунитета [22], а также усиления эффекторных функций опухолеспецифических цитотоксических Т-клеток [23].

Результаты наших исследований рчЦфА как противоопухолевого фактора и иммуностимулятора указывают на потенциальную перспективность его использования в комбинированной химио-иммунотерапии и в качестве компонента иммунотерапии для усиления эффективности адоптивной Т-клеточной терапии [23].

Цель исследования – оценить противоопухолевые эффекты комбинированной иммунотерапии с использованием рчЦфА и ингибиторов PD-1, CTLA-4, LAG-3, PD-L1, PD-L2 и CD276 в модели меланомы B16 *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Самок мышей линии C57BL/6 (18–20 г, 6–8-недельного возраста) получали из экспериментально-биологической лаборатории научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Экспериментальные группы состояли из 4–16 животных.

Клеточные линии, прививка опухоли. Клетки перевиваемой меланомы B16 мыши получены из коллекции Национального медицинского исследовательского центра онкологии. Меланому B16 выращивали *in vitro* в среде DMEM (ООО «ПанЭко», Россия), обогащенной 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США); 0,01 мг/мл ципрофлоксацина (KRKA, Словения) и 20 мМ HEPES (ООО «ПанЭко»), при 37 °C в атмосфере 5 % CO_2 до 70–80 % монослоя. Жизнеспособные клетки B16 подсчитывали в смеси трипанового синего и эозина в камере Горяева и вводили подкожно мышам C57BL/6 в дозе 3×10^5 клеток/мышь в область правой лопатки в 200 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS).

Схема введения рекомбинантного циклофилина А человека. Рекомбинантный ЦфА человека получали, как описано ранее [24]. Для его изучения как самостоятельного противоопухолевого фактора исследуемый белок вводили подкожно в дозе 100 мкг/мышь на 3–7-й дни после прививки меланомы B16. Контрольным животным без терапии аналогично вводили PBS.

Выделение опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. На 10-й день по окончании рчЦфА-монотерапии (17-й день после прививки опухоли) мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации и извлекали подкожные опухолевые узлы меланомы B16. Опухолевую ткань механически гомогенизировали до одноклеточной суспензии в 10 мл среды RPMI-1640 (ООО «ПанЭко», Россия). Полученную суспензию клеток наслаивали на раствор фиколла (плотностью 1,09 г/см^3) (ООО «ПанЭко») (1:1 по объему) и центрифугировали при 200g 20 мин при 22 °C. Затем отбирали клетки в интерфазе и дважды промывали бессывороточной средой RPMI-1640 при 200g 5 мин при 4 °C. Выделенные опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ) ресуспендировали в PBS и использовали для цитофлуориметрического анализа.

Цитофлуориметрический анализ. В работе использовали флуоресцентно меченные моноклональные антитела: анти-CD3/FITC (клон 145-2C11), анти-CD8/Pacific blue (клон 53-6.7), анти-CD4/APC (клон RM4-5), анти-CTLA-4/PE (клон UC10-4F10-11) и анти-LAG-3/PE (клон C9B7W) фирмы BD Pharmingen (США), а также анти-PD-1/PE-Cy7 (клон J43) фирмы eBioscience (США). Пробы клеток ОИЛ (5×10^5) инкубировали с блокирующими антителами Fc block (клон 2.4G2, BD Pharmingen, США) (10 мин при 4 °C) и окрашивали флуоресцентно мечеными антителами (40 мин при 4 °C). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Bioscience, США) в программе FACSDiva 6.0 (BD Bioscience, США). Лейкоциты выделяли по показателям прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния с последующим выделением одиночных клеток по показателям FSC-H против FSC-A. Для окрашивания мертвых клеток использовали набор LIVE/DEAD Fixable Yellow Dead Cell Stain (Invitrogen, США). Мертвые клетки исключали из анализа по окрашиванию Yellow Dead Cell Stain и по показателям светорассеяния. Экспрессию поверхностных маркеров оценивали в популяции живых одиночных лейкоцитов. Обработку данных проводили в программе Flow Jo 7.6 (TreeStar Inc., США).

Блокирующие моноклональные антитела. В работе использовали блокирующие Мат фирмы Bioxcell (США): анти-PD-L1 (клон 10F.9G2), анти-PD-L2 (клон TY25), анти-CD276 (клон MJ18), анти-PD-1 (клон J43), анти-CTLA-4 (клон 9D9) и анти-LAG-3 (клон C9B7W).

Схемы комбинированной иммунотерапии. Для проведения комбинированной иммунотерапии меланомы B16 с использованием рчЦфА и ICIs были сформированы следующие экспериментальные группы: 1) анти-CTLA-4; 2) анти-CTLA-4 + рчЦфА; 3) анти-LAG-3; 4) анти-LAG-3 + рчЦфА; 5) анти-PD-1 + анти-LAG-3; 6) анти-PD-1 + анти-LAG-3 + рчЦфА; 7) анти-PD-L1; 8) анти-PD-L1 + рчЦфА; 9) анти-CD276; 10) анти-CD276 + рчЦфА; 11) анти-CD276 + анти-PD-L2; 12) анти-CD276 + анти-PD-L2 + рчЦфА. Моноклональные антитела вводили внутривенно в дозе 100 мкг/мышь на 6-й и 9-й дни после прививки опухоли, рекомбинантный ЦфА человека – подкожно в дозе 100 мкг/мышь на 6–10-й дни после прививки меланомы B16. В качестве контроля животным аналогично вводили только соответствующие Мат или рчЦфА. Контрольным мышам без терапии подкожно вводили 200 мкл PBS по схеме, аналогичной введению рчЦфА.

Оценка противоопухолевого эффекта терапии *in vivo*. Для оценки противоопухолевого эффекта терапии использовали показатели торможения роста опухоли (ТРО, %) и увеличения продолжительности жизни (УПЖ, %) животных-опухоленосителей. Торможение роста опухоли рассчитывали по формуле:

$$ТРО = (V_{PBS} - V_{терапия}) \times 100/V_{PBS},$$

где V_{PBS} – средний объем опухоли ($мм^3$) в контрольной группе (без терапии); $V_{терапия}$ – средний объем опухоли в группе терапии.

Объем опухоли рассчитывали как произведение трех перпендикулярных диаметров опухолевого узла, измеренных с помощью штангенциркуля.

Увеличение продолжительности жизни рассчитывали по формуле:

$$УПЖ = (СПЖ_{терапия} - СПЖ_{PBS}) \times 100/СПЖ_{PBS},$$

где $СПЖ_{PBS}$ – средняя продолжительность жизни (дни) мышей-опухоленосителей в контрольной группе (без терапии); $СПЖ_{терапия}$ – средняя продолжительность жизни мышей-опухоленосителей в группе терапии.

При оценке СПЖ проводили ежедневный мониторинг состояния экспериментальных животных, отмечая заметное сокращение потребления корма, низкую подвижность, вялость, некротические язвы в опухолевых узлах, для исключения мышей с поведенческими или клиническими изменениями. Летаргических мышей-опухоленосителей выводили из эксперимента, и день эвтаназии считали днем гибели животного. Противоопухолевое действие комбинированной иммунотерапии признавали значимым при ТРО ≥50 % в течение не менее 7 дней по окончании терапии или УПЖ ≥25 % [25].

Статистический анализ. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Статистический анализ проводили с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента. Предварительно осуществляли проверку нормальности распределения выборок с использованием теста Колмогорова–Смирнова для подтверждения корректности использования *t*-критерия Стьюдента. Различия признавали значимыми при $p \leq 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ экспрессии маркеров PD-1, CTLA-4 и LAG-3 на Т-лимфоцитах, инфильтрирующих меланому B16 под действием рекомбинантного циклофилина А человека. Ранее мы показали, что рчЦфА значительно подавляет рост меланомы B16 *in vivo* при воздействии на ранних этапах ее формирования [21]. Для выяснения механизмов реализации противоопухолевого эффекта рчЦфА и оценки перспективности его использования в комбинации с ICIs для иммунотерапии меланомы B16 был проведен анализ Т-клеток в микроокружении данной опухоли по окончании рчЦфА-монотерапии (рис. 1).

Результаты исследования показали, что под действием рчЦфА в инфильтрате меланомы B16 наблюдалось усиленное накопление Т-клеток, доля которых в составе ОИЛ была в 2,2 раза выше по сравнению с контрольной группой (PBS) (рис. 1, *а*). При этом в образцах ОИЛ в группе рчЦфА-монотерапии в 1,7 раза возросло относительное количество $CD4^+$-Т-клеток по сравнению с контролем (рис. 1, *б*) без значимых изменений в относительном количестве $CD8^+$-Т-клеток

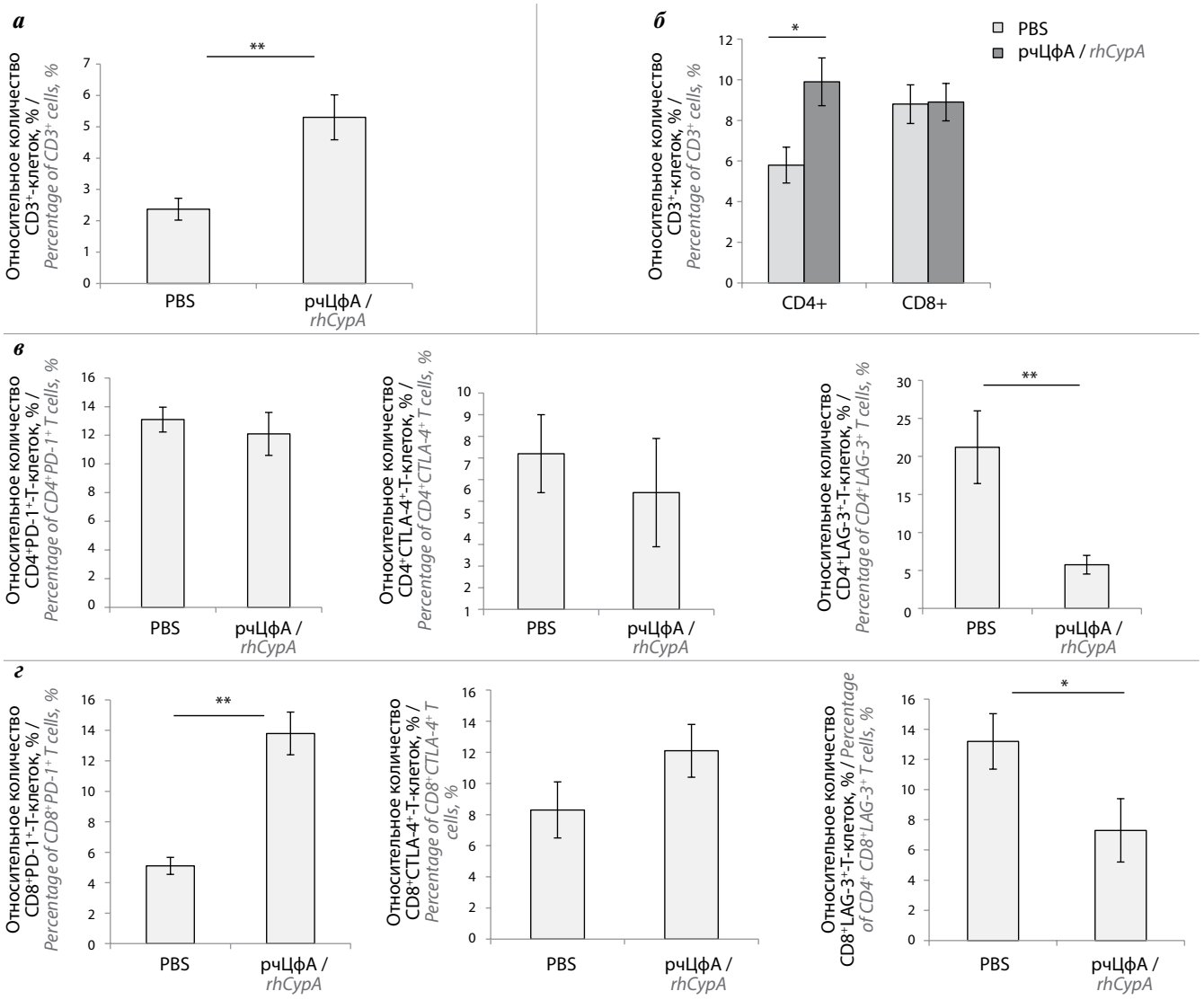


Рис. 1. *Влияние рекомбинантного циклофилина А человека (рчЦфА) на экспрессию рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1), гликопротеина цитотоксических лимфоцитов 4 (CTLA-4) и белка гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3) в Т-клетках, инфильтрирующих меланому B16: относительное количество (%) CD3+-Т-клеток (а), CD4+- и CD8+-Т-клеток (б); PD-1+-, CTLA-4+- и LAG-3+-клеток в популяции CD4+- (в) и CD8+-Т-клеток (г). Мышам C57BL/6 прививали подкожно меланому B16. На 3–7-й дни после прививки подкожно вводили рчЦфА в дозе 100 мкг/мышь. На 17-й день после прививки меланомы (10-й день по окончании рчЦфА-монотерапии) выделяли опухоль-инфильтрирующие лимфоциты и анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Данные получены в трех независимых экспериментах и представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 6–16). *p ≤0,05. **p ≤0,01 (непарный t-критерий Стьюдента). PBS – фосфатно-солевой буфер*

Fig. 1. *Effects of recombinant human cyclophilin A (rhCypA) on the expression of programmed cell death 1 (PD-1), cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), and lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3) in T cells in the melanoma B16 tumor infiltrate: the relative count (%) of CD3+ T cells (a), CD4+ and CD8+ T cells (б), PD-1+, CTLA-4+, and LAG-3+ cells in the population of CD4+ T-lymphocytes (в) and CD8+ T-lymphocytes (г). C57BL/6 mice were transplanted subcutaneously with melanoma B16. On days 3–7 post-tumor transplantation, rhCypA was injected subcutaneously at the dose of 100 μg/mouse. On day 17 post-tumor transplantation (day 10 after rhCypA-monotherapy), tumor-infiltrating lymphocytes were recovered and analyzed by flow cytometry. Data were obtained in three independent experiments and shown as mean ± standard error of the mean (n = 6–16). *p ≤0,05. **p ≤0,01 (unpaired Student's t-test). PBS – phosphate-buffered saline*

(рис. 1, *в*), что указывает на снижение доли двойных негативных $CD4^{-}CD8^{-}$-Т-клеток в опухолевом инфильтрате меланомы B16 под действием рчЦфА.

Анализ экспрессии PD-1 показал, что под действием рчЦфА доля $CD4^{+}PD\text{-}1^{+}$-Т-клеток в составе ОИЛ не изменилась по сравнению с контролем (PBS) (рис. 1, *г*). При этом в группе рчЦфА-монотерапии относительное количество $CD8^{+}PD\text{-}1^{+}$-Т-лимфоцитов среди ОИЛ было больше в 2,7 раза по сравнению с контрольной группой (PBS) (рис. 1, *д*). Стоит особо отметить, что уровень экспрессии PD-1 в $CD8^{+}$-Т-клетках был сопоставим в группах контроля и рчЦфА-монотерапии и в 4,1 раза превышал уровень экспрессии в $CD4^{+}$-Т-клетках (табл. 1). Это может указывать на большую чувствительность $CD8^{+}$-Т-лимфоцитов к супрессорному микроокружению опухоли и анти-PD-1-PD-L1/PD-L2-терапии.

Доля $CD4^{+}CTLA\text{-}4^{+}$- и $CD8^{+}CTLA\text{-}4^{+}$-Т-клеток в инфильтрате опухоли была сопоставима в обеих экс-

Таблица 1. *Уровень экспрессии рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1), гликопротеина цитотоксических лимфоцитов 4 (CTLA-4) и белка гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3) в Т-клетках, инфильтрирующих меланому B16, после курсового введения рекомбинантного циклофилина А человека (рчЦфА)*

Table 1. *The expression level of programmed cell death 1 (PD-1), cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), and lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3) in T cells in the melanoma B16 infiltrate after the course recombinant human cyclophilin A injection (rhCypA)*

Маркер Marker	Контроль (PBS) Control (PBS)		РчЦфА rhCypA	
	CD4⁺-Т-клетки CD4⁺ T cells	CD8⁺-Т-клетки CD8⁺ T cells	CD4⁺-Т-клетки CD4⁺ T cells	CD8⁺-Т-клетки CD8⁺ T cells
PD-1	550,4 ± 67,5	2285 ± 118,6	486,7 ± 59,7	2295 ± 166,7
CTLA-4	198 ± 17,6	202 ± 19,2	284 ± 48,1	228 ± 21,8
LAG-3	409,4 ± 51,6	345,5 ± 56,9	179,3 ± 24,5*	244,6 ± 45,1

**p ≤0,01 при сравнении с контрольной группой (PBS) (непарный t-критерий Стьюдента).*
Примечание. *Данные получены в трех независимых экспериментах и представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 6–9). PBS – фосфатно-солевой буфер.*
**p ≤0.01 compared to the control group (PBS) (unpaired Student's t-test).*
Note. *Data were obtained in three independent experiments and shown as mean ± standard error of the mean (n = 6–9). PBS – phosphate-buffered saline.*

периментальных группах и составила 5–7 % (см. рис. 1, *г*) и 8–12 % (см. рис. 1, *д*) соответственно. Курсовое введение рчЦфА также не оказало влияния на уровень экспрессии данного маркера, который был одинаковым в CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетках (см. табл. 1).

Стоит особо отметить, что под действием рчЦфА в микроокружении меланомы B16 снизилось относительное количество Т-клеток, экспрессирующих маркер истощения LAG-3 (см. рис. 1, *д*). В популяции CD4⁺-Т-лимфоцитов доля LAG-3⁺-клеток в группе рчЦфА-монотерапии была в 3,6 раза ниже по сравнению с контролем (PBS) (см. рис. 1, *д*), что коррелировало также со значимо более низким уровнем экспрессии данного маркера (см. табл. 1). Относительное количество CD8⁺LAG-3⁺-Т-клеток снизилось в 1,8 раза по сравнению с контрольной группой (PBS) (см. рис. 1, *д*), но уровень экспрессии LAG-3 не изменился (см. табл. 1).

Оценка противоопухолевых эффектов рекомбинантного циклофилина А человека в комбинациях с блокирующими антителами анти-CTLA-4, анти-LAG-3 и анти-PD-1. Результаты нашего исследования показали, что меланома B16 в достаточной степени инфильтрирована CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетками, экспрессирующими молекулы PD-1, CTLA-4 и LAG-3 (см. рис. 1). С учетом эффекта рчЦфА как самостоятельного противоопухолевого фактора его сочетание с ICIs может оказать синергический терапевтический эффект в этой экспериментальной модели. Для подтверждения данной гипотезы была проведена комбинированная рчЦфА + ICI-терапия меланомы B16 начиная с 6-го дня после прививки опухоли (рис. 2, 3).

При анти-CTLA-4-терапии и рчЦфА-монотерапии наблюдалось подавление роста опухоли на 43 и 53 % до 14-го дня после терапии (24-й день после прививки опухоли) соответственно (см. рис. 2, *а, б*). При сочетанной иммунотерапии с использованием рчЦфА и анти-CTLA-4 блокирующих антител был отмечен сильный и продолжительный эффект подавления роста меланомы B16 до 29-го дня после прививки опухоли (19-й день по окончании терапии): ТРО составил 88–99 % на 3–5-й дни, 80–84 % на 7–14-й дни и 69–75 % на 17-й и 19-й дни по окончании терапии (см. рис. 2, *а, б*). Кроме того, комбинированная иммунотерапия увеличила продолжительность жизни экспериментальных животных на 70,4 % (рис. 2, *в*). Полученные данные указывают на выраженный синергический терапевтический эффект рчЦфА в комбинации с анти-CTLA-4-терапией.

Курсовое введение рчЦфА в комбинации с анти-LAG-3-терапией оказало значительный противоопухолевый эффект: показатели ТРО составили 69 % на 12-й день; 88,1 % на 14-й и 55 % на 19-й день после прививки меланомы B16 (5, 7 и 12-й дни по окончании терапии соответственно) (см. рис. 3, *а*). Поскольку терапевтический эффект анти-LAG-3-терапии не наблюдался при использованном режиме введения ICIs (см. рис. 3, *а*), полученные данные указывают на синергическое действие рчЦфА и анти-LAG-3-Мат.

В нашей работе, как и в ряде других исследований, наблюдалась низкая эффективность анти-LAG-3-терапии. Однако было показано, что блокирование одновременно PD-1 и LAG-3 позволяло достигнуть наилучших терапевтических эффектов [26–28]. В связи с этим далее мы оценили действие рчЦфА в сочетании одновременно с анти-PD-1- и анти-LAG-3-Мат (рис. 3, *б*). Двойная ICI-терапия вызвала значительное подавление роста опухоли с ТРО >90 % на 3–5-й дни и 72 %

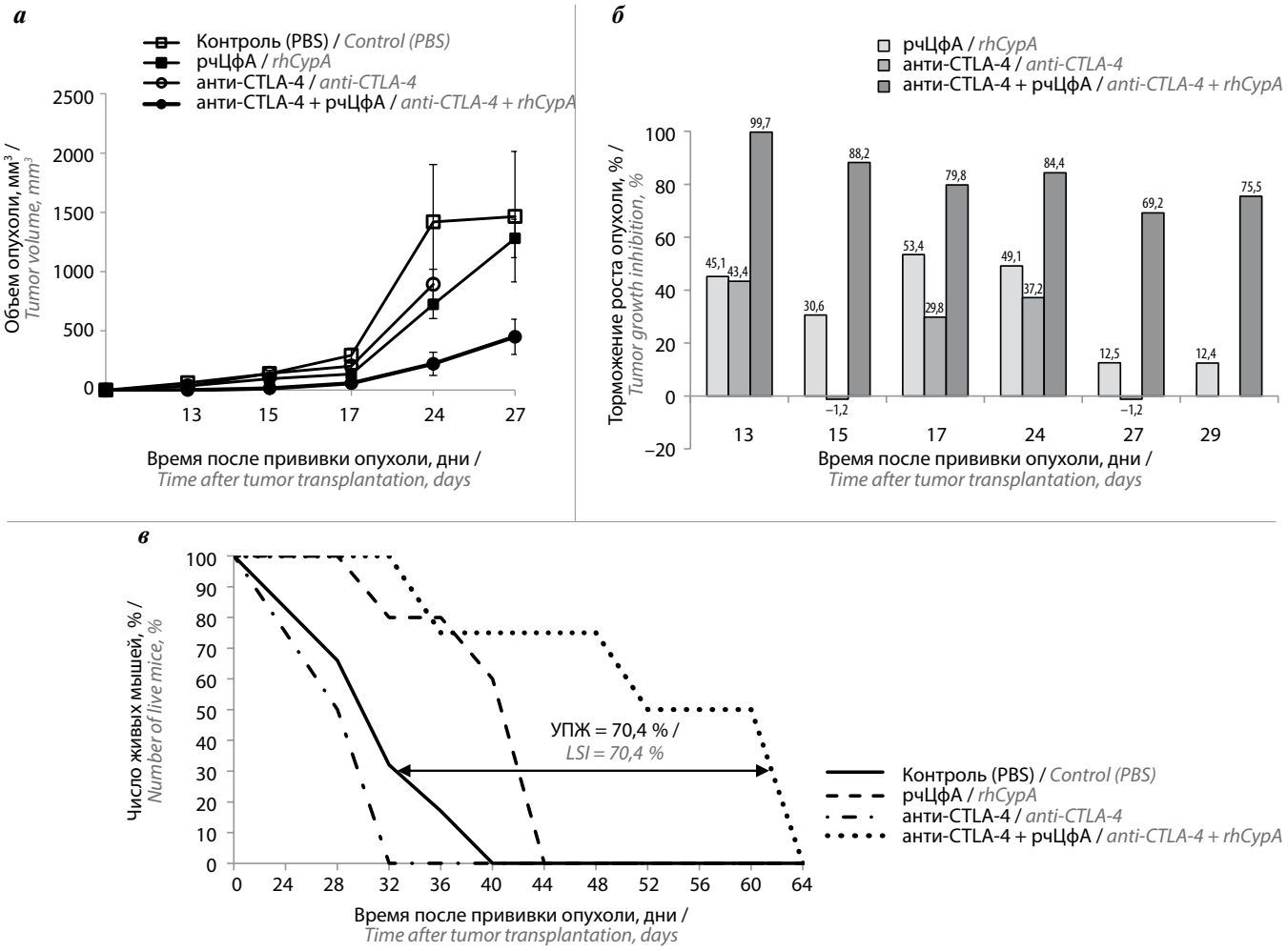


Рис. 2. *Синергический противоопухолевый эффект рекомбинантного циклофилина А человека (рчЦфА) в комбинации с анти-CTLA-4 блокирующими антителами в модели меланомы B16 in vivo: а – средний объем опухоли (мм³) в указанные сроки после прививки меланомы B16; б – индексы торможения роста опухоли (%) в указанные сроки после прививки меланомы B16; в – динамика гибели животных и показатель увеличения продолжительности жизни (УПЖ) (%). Мышам C57BL/6 прививали подкожно меланому B16. На 6-й и 9-й дни после прививки опухоли вводили внутривенно блокирующие моноклональные антитела к CTLA-4 в дозе 100 мкг/мышь. Рекомбинантный циклофилин А человека вводили подкожно на 6–10-й дни после прививки опухоли в дозе 100 мкг/мышь. В качестве контроля мышам аналогично вводили только анти-CTLA-4 моноклональные антитела или рчЦфА. Животным без терапии вводили фосфатно-солевой буфер (PBS) аналогично схеме введения рчЦфА. Представлены данные одного из двух репрезентативных экспериментов как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 5–7)*

Fig. 2. *Synergic anti-tumor effects of recombinant human cyclophilin A (rhCypA) and anti-CTLA-4 blocking antibodies in the melanoma B16 model in vivo: a – the mean tumor volume (mm³) at the indicated time points post-tumor transplantation; б – tumor growth inhibition indices (%) at the indicated time points post-tumor transplantation; в – the survival curve of tumor-bearing mice and the increase in life span index (LSI) (%). C57BL/6 mice were subcutaneously transplanted with melanoma B16. On days 6 and 9 post-tumor transplantation, blocking monoclonal antibodies to CTLA-4 were injected intravenously at the dose of 100 μg/mouse. Recombinant human cyclophilin A was injected subcutaneously at the dose of 100 μg/mouse on days 6–10 post-tumor transplantation. Mice similarly dosed with anti-CTLA-4 monoclonal antibodies or rhCypA only were used as controls. Mice without therapy were injected with phosphate-buffered saline (PBS) similarly to rhCypA injections. Data of one of two representative experiments are shown as mean ± standard error of the mean (n = 5–7)*

на 7-й день по окончании терапии (13–15-й и 17-й дни после прививки меланомы B16 соответственно) (см. рис. 3, *б*). Однако комбинированная рчЦфА + + ICI-терапия не подавила роста меланомы B16, и на всем сроке наблюдения (до 20-го дня после прививки опухоли) средний объем опухоли в данной группе был сопоставим со значениями в контроле (PBS) (см. рис. 3, *б*). Полученные данные свидетельствуют об отмене противоопухолевых эффектов двойной анти-PD-1 + анти-LAG-3-терапии при ее комбинировании с курсовым введением рчЦфА.

Противоопухолевые эффекты рекомбинантного циклофилина А в комбинации с блокирующими антителами анти-PD-L1, анти-CD276 и анти-PD-L2. Известно, что меланома B16 и компоненты ее микроокружения экспрессируют ингибиторные молекулы PD-L1, PD-L2 и CD276 [16, 29–31], что опосредует подавление эффекторных функций опухоль-инфильтрирующих Т-клеток [1, 4, 6].

В нашей работе при анти-PD-L1-терапии наблюдался незначительный противоопухолевый эффект с торможением роста меланомы B16 на 58,9 % только

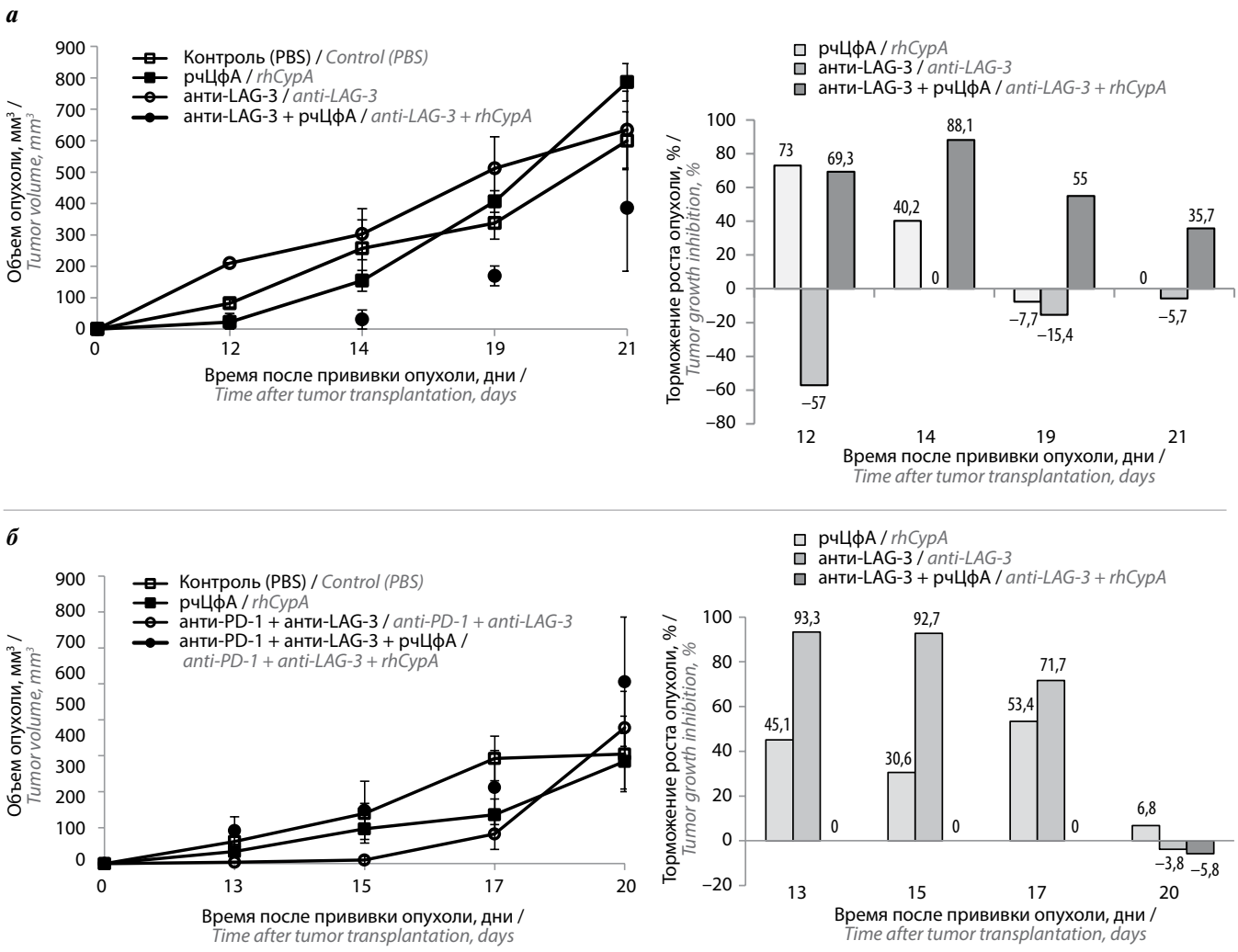


Рис. 3. *Эффекты комбинации рекомбинантного циклофилина А человека (рчЦфА) и блокаторов белка гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3) и рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1) на рост меланомы B16 in vivo. Мышам C57BL/6 прививали подкожно меланому B16. На 6-й и 9-й дни после прививки опухоли внутривенно вводили блокирующие моноклональные антитела (Мат) к молекуле LAG-3 (а) или одновременно к LAG-3 и PD-1 (б) в дозе 100 мкг/мышь каждого Мат. Рекомбинантный циклофилин А человека вводили подкожно на 6–10-й дни после прививки опухоли в дозе 100 мкг/мышь. В качестве контроля мышам аналогично вводили только Мат или рчЦфА. Животным без терапии вводили фосфатно-солевой буфер (PBS) аналогично схеме введения рчЦфА. На указанные сроки после прививки меланомы B16 измеряли объем опухоли (мм³) и рассчитывали показатели торможения роста опухоли (%) после сочетанной иммунотерапии с использованием рчЦфА и анти-LAG-3-Мат (а) или комбинации анти-LAG-3- и анти-PD-1-Мат (б). Представлены данные одного из двух репрезентативных экспериментов как среднее ± ± стандартная ошибка среднего (n = 4–7)*

Fig. 3. *Effects of recombinant human cyclophilin A (rhCypA) in combination with inhibitors of lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3) and programmed cell death 1 (PD-1) on melanoma B16 growth in vivo. C57BL/6 mice were subcutaneously transplanted with melanoma B16. On days 6 and 9 post-tumor transplantation, blocking monoclonal antibodies (mAbs) to LAG-3 (a) or simultaneously to LAG-3 and PD-1 (б) were injected intravenously at the dose of 100 μg/mouse each mAb. Recombinant human cyclophilin A was injected subcutaneously at the dose of 100 μg/mouse on days 6–10 post-tumor transplantation. Mice similarly dosed with mAbs or rhCypA only were used as controls. Mice without therapy were injected with phosphate-buffered saline (PBS) similarly to rhCypA injections. At the indicated time points post-tumor transplantation, the tumor volume (mm³) was measured and tumor growth inhibition indices (%) were calculated after the combined immunotherapy with rhCypA and anti-LAG-3 mAbs (a) or the combination of anti-LAG-3 and anti-PD-1 mAbs (б). Data of one of two representative experiments are shown as mean ± standard error of the mean (n = 4–7)*

на 3-й день по окончании терапии (13-й день после прививки опухоли) (рис. 4, *а*). Результаты других исследований также показали кратковременный эффект анти-PD-L1-терапии [32]. Введение блокирующих анти-CD276-антител не привело к подавлению роста меланомы B16 (рис. 4, *б*). Напротив, начиная с 5-го дня по окончании терапии (15-й день после прививки опухоли) отмечена тенденция к стимуляции роста опухоли в группе анти-CD276-терапии (см. рис. 4, *б*).

Комбинированная иммунотерапия с использованием рчЦфА и анти-PD-L1-Мат улучшила противоопухолевые эффекты ICI-терапии с торможением роста меланомы B16 на 86,8–93,5 % до 15-го дня после прививки опухоли (5-й день по окончании терапии)

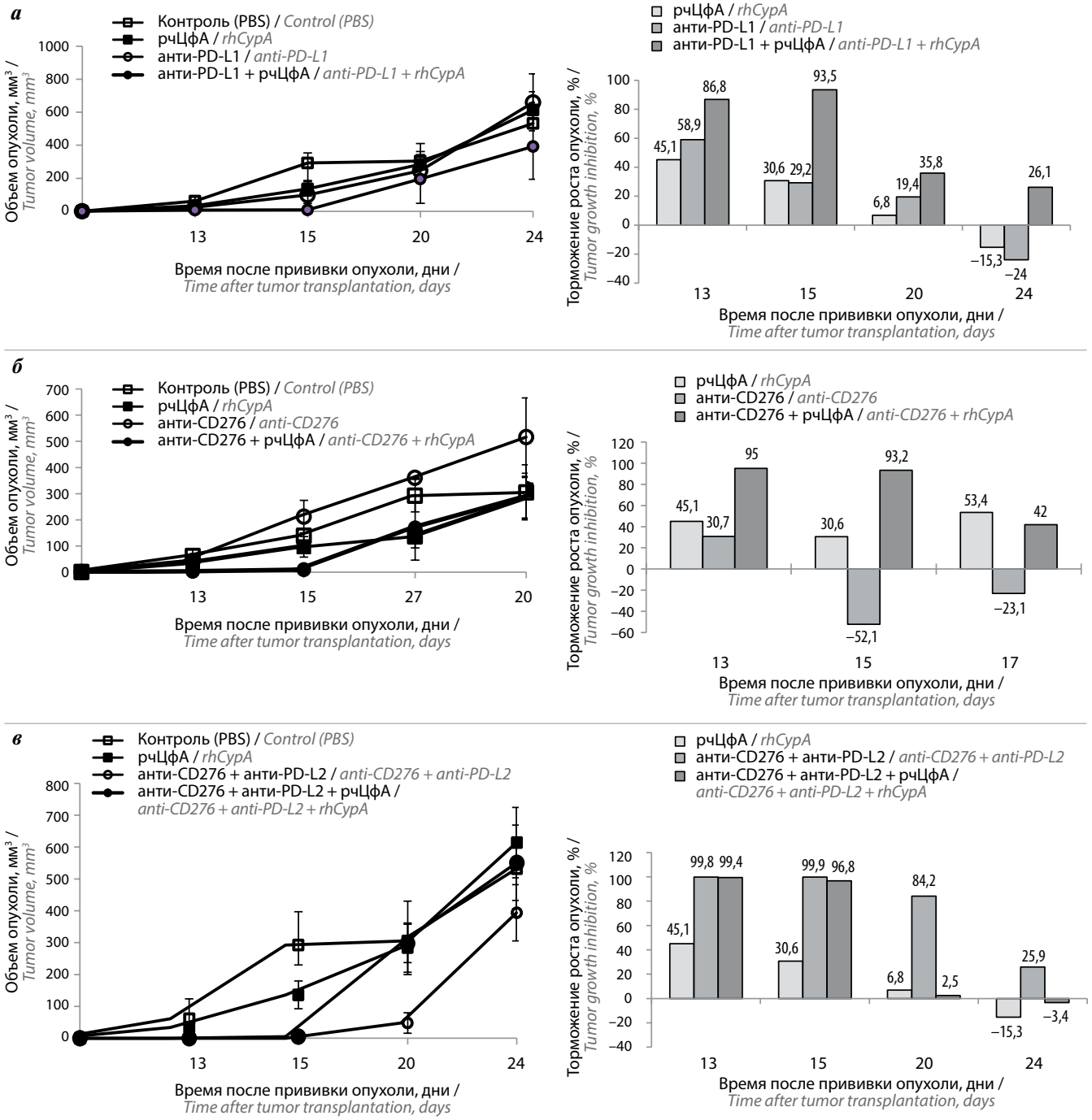


Рис. 4. *Влияние комбинации рекомбинантного циклофилина А и блокаторов лигандов 1 (PD-L1) и 2 (PD-L2) рецептора программируемой клеточной гибели 1 и молекулы CD276 на рост меланомы B16 in vivo. Мышам C57BL/6 подкожно прививали меланому B16. На 6-й и 9-й дни после прививки опухоли внутривенно вводили блокирующие моноклональные антитела (Мат) к молекулам PD-L1 (а), CD276 (б) или одновременно CD276 и PD-L2 (в) в дозе 100 мкг/мышь каждого Мат. Рекомбинантный циклофилин А вводили подкожно на 6–10-й дни после прививки опухоли в дозе 100 мкг/мышь. В качестве контроля мышам аналогично вводили только Мат или рчЦфА. Животным без терапии вводили фосфатно-солевой буфер (PBS) аналогично схеме введения рчЦфА. На указанные сроки после прививки меланомы B16 измеряли объем опухоли (мм³) и рассчитывали показатели торможения роста опухоли (%) после комбинированной иммунотерапии с использованием рчЦфА и анти-PD-L1-Мат (а), анти-CD276-Мат (б) или комбинации анти-CD276- и анти-PD-L2-Мат (в). Представлены данные одного из двух репрезентативных экспериментов как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 4–7)*

Fig. 4. *Effects of recombinant human cyclophilin A (rhCypA) in combination with programmed cell death-ligand 1 (PD-L1), programmed cell death-ligand 2 (PD-L2), and CD276 inhibitors on melanoma B16 growth in vivo. C57BL/6 mice were subcutaneously (s/c) transplanted with melanoma B16. On days 6 and 9 post-tumor transplantation, blocking monoclonal antibodies (mAbs) to PD-L1 (a), CD276 (б), or simultaneously to CD276 and PD-L2 (в) were injected intravenously at the dose of 100 μg/mouse each. Recombinant human cyclophilin A was injected subcutaneously at the dose of 100 μg/mouse on days 6–10 post-tumor transplantation. Mice similarly dosed with mAbs or rhCypA only were used as controls. Mice without therapy were injected with phosphate-buffered saline (PBS) similarly to rhCypA injections. At the indicated time points post-tumor transplantation, the tumor volume (mm³) was measured and tumor growth inhibition indices (%) were calculated after the combined immunotherapy with rhCypA and anti-PD-L1 mAbs (a), anti-CD276 mAbs (б), or the combination of anti-CD276 and anti-PD-L2 mAbs (в). Data of one of two representative experiments are presented as mean ± standard error of the mean (n = 4–7)*

(см. рис. 4, *а*). Как было отмечено выше, курсовое введение рчЦфА индуцирует накопление в опухоли $CD8^+PD\text{-}1^+$-Т-клеток (см. рис. 1, *д*), предположительно более чувствительных по сравнению с $CD4^+$-Т-лимфоцитами к анти-PD-1/PD-L1-терапии в связи с высоким уровнем экспрессии PD-1 (см. табл. 1). Этот эффект рчЦфА может обусловливать его синергическое действие в сочетании с анти-PD-L1-антителами (см. рис. 4, *а*).

При сочетании рчЦфА и анти-CD276-Мат наблюдалось подавление роста меланомы B16 на 93–95 % до 15-го дня после прививки опухоли (см. рис. 4, *б*). Стоит отметить, что, несмотря на усиление эффективности анти-PD-L1- и анти-CD276-ICI-терапии при сочетании с курсовым введением рчЦфА, синергическое действие комбинированной иммунотерапии было кратковременным, и ее эффекты отмечались только на ранних сроках (до 5-го дня) после окончания терапии (рис. 4, *а*, *б*).

С учетом исходной неэффективности анти-CD276-терапии (см. рис. 4, *б*) на следующем этапе работы мы оценили противоопухолевое действие комбинации блокирующих антител анти-CD276 и анти-PD-L2 (см. рис. 4, *в*). Одновременное введение двух ICIs вызвало значительное подавление роста меланомы B16: показатель ТРО составил 99,8 % на 3–5-й дни и 84,2 % на 10-й день по окончании терапии (13, 15 и 20-й дни после прививки опухоли соответственно) (см. рис. 4, *в*). Рекомбинантный циклофилин А не проявил аддитивных эффектов в комбинации с двумя ICIs на ранних сроках по окончании терапии (3–5-й дни), и показатели ТРО при рчЦфА + ICI-терапии были сопоставимы с аналогичными показателями при ICI-терапии (рис. 4, *в*). Однако начиная с 10-го дня по окончании комбинированной иммунотерапии (20-й день после прививки опухоли) наблюдалась отмена эффекта блокирующих антител с тенденцией к стимуляции роста меланомы в этой экспериментальной группе (см. рис. 4, *в*).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании был оценен противоопухолевый эффект комбинированной иммунотерапии с использованием рчЦфА и блокаторов функционально различных контрольных точек иммунитета.

Гликопротеин цитотоксических лимфоцитов 4 (CTLA-4) экспрессируется на всех активированных Т-лимфоцитах [11, 33] и регуляторных Т-клетках (Treg) [33]. Посредством связывания с лигандами CD80 и CD86 на антигенпрезентирующих клетках CTLA-4 подавляет активацию и пролиферацию Т-клеток [33, 34]. Блокирование данного рецептора элиминирует или снижает активность Treg и обусловленную этим иммуносупрессию, а также усиливает эффекторные функции Т-клеток [11, 33].

Белок гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3) экспрессируют истощенные Т-клетки в опухолевом микроокружении [11]. При взаимодействии LAG-3 с его лигандами подавляется передача сигнала от Т-клеточного рецептора, ингибируется Т-клеточная пролиферация и продукция ИФН-γ [33]. Блокирование LAG-3 стимулирует инфильтрацию опухоли $CD8^+$-Т-клетками, усиливает продукцию ИФН-γ, подавляет активность Treg в опухолевом микроокружении [33], а также улучшает функциональную активность дендритных клеток, макрофагов и NK-клеток [11].

Рецептор программируемой клеточной гибели 1 (PD-1) преимущественно экспрессируется на примированных антигеном активированных Т-клетках [11]. Данный рецептор взаимодействует с PD-L1 и PD-L2, что приводит к подавлению активации и пролиферации Т-клеток и снижению продукции цитотоксических цитокинов [12]. Стоит отметить, что PD-L1 регулирует несколько ингибиторных путей в Т-клетках, взаимодействуя, помимо PD-1, с CD80 и CD86 [11]. Лиганд PD-1 также индуцирует формирование и усиливает иммуносупрессорные функции Treg [12]. Блокирование взаимодействия PD-1 с PD-L1/PD-L2 отменяет анергию Т-клеток и стимулирует их эффекторные функции [11].

Наряду с PD-L1 и PD-L2 различные клетки опухолевого микроокружения экспрессируют другую ингибиторную молекулу – CD276 (B7-H3) [11, 13, 33]. CD276 подавляет пролиферацию $CD4^+$- и $CD8^+$-Т-лимфоцитов, а также снижает продукцию ИФН-γ и ряда цитокинов, в том числе ИЛ-2 [13, 33]. Было показано, что блокирование B7-H3 подавляет активность Treg, усиливает активацию эффекторных Т-клеток и стимулирует инфильтрацию опухоли NK-клетками и $CD8^+$-Т-лимфоцитами [11, 13].

Результаты нашего исследования показали, что наиболее выраженное и продолжительное противоопухолевое действие иммунотерапии меланомы B16 наблюдалось при использовании рчЦфА в сочетании с блокаторами CTLA-4 и LAG-3 (см. рис. 2, 3, *а*). Поскольку CTLA-4 широко экспрессируется на Т-клетках организма, анти-CTLA-4-терапия оказывает системный эффект по сравнению с ингибитором LAG-3 [11, 33]. Вследствие этого рчЦфА + анти-CTLA-4-терапия была значительно эффективнее рчЦфА + анти-LAG-3-терапии, она вызывала более сильное и пролонгированное подавление роста опухоли и значительно улучшала показатели выживаемости экспериментальных животных (см. рис. 2). Наблюдаемый синергический эффект комбинированной иммунотерапии, возможно, был обусловлен костимуляторным действием рчЦфА в отношении Т-лимфоцитов [23], эффекторные функции которых поддерживались за счет блокирования данных ингибиторных рецепторов. Кроме того, рчЦфА мог усилить действие ICI-терапии посредством модуляции опухолевого микроокружения и обогащения его функционально активными эффекторами (см. рис. 1).

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о перспективности использования

комбинации нескольких ICIs для достижения наилучших терапевтических эффектов [11–13]. В частности, комбинированная анти-PD-1- + анти-LAG-3-иммунотерапия одобрена для лечения метастатической меланомы [14]. Стоит особо отметить, что в нашей работе при оценке сочетанного действия рчЦфА одновременно с анти-PD-1- и анти-LAG-3-Мат наблюдалась рчЦфА-опосредованная отмена противоопухолевого эффекта двойной ICI-терапии (см. рис. 3, *в*). Исходя из этого можно предположить, что блокирование одновременно двух супрессорных путей в Т-клетках в опухолевом микроокружении [34] в сочетании с воздействием иммуностимулирующего рчЦфА [22, 23] вызывает избыточную активацию Т-лимфоцитов, что может привести к их активационному апоптозу или анергии.

При этом интересно, что рчЦфА в комбинации одновременно с анти-CD276- и анти-PD-L2-Мат не отменял эффекта двойной ICI-терапии (см. рис. 4, *в*). Поскольку ингибиторные молекулы CD276, PD-L1 и PD-L2 экспрессируются на опухолевых [12, 13, 33], антигенпрезентирующих (дендритных клетках и макрофагах) [11, 34] и стромальных клетках опухолевого микроокружения [11, 33], их блокаторы действуют на Т-лимфоциты опосредованно. Вследствие этого при сочетанном действии рчЦфА и данных ICIs поддержание функциональной активности Т-клеток может быть менее эффективным по сравнению с комбинированным эффектом рчЦфА и ICIs, блокирующими ингибиторные рецепторы непосредственно на Т-клетках (CTLA-4, PD-1, LAG-3). На это может указывать краткосрочность синергического действия рчЦфА в комбинации с анти-PD-L1- или анти-CD276-антителами (см. рис. 4, *а, б*) по сравнению с рчЦфА + + анти-CTLA-4- и рчЦфА + анти-LAG-3-иммунотерапией (см. рис. 2, 3, *а*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение механизмов противоопухолевой активности рчЦфА выявило его способность стимулировать накопление Т-клеток в инфильтрате меланомы B16 и модулировать экспрессию отдельных контрольных точек иммунитета в микроокружении данной опухоли (см. рис. 1, табл. 1). Ранее также было показано, что рчЦфА усиливает эффекторные функции опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов [23]. В совокупности эти эффекты рчЦфА могут обусловливать его синергию в комбинации с ICIs, действие которых направлено на отмену анергии Т-клеток и поддержание их функциональной активности. Наиболее выраженное и пролонгированное синергическое противоопухолевое действие наблюдалось при сочетании рчЦфА с ингибиторами CTLA-4 и LAG-3. Между тем комбинация рчЦфА одновременно с блокаторами PD-1 и LAG-3 приводит к отмене противоопухолевых эффектов как рчЦфА-монотерапии, так и двойной ICI-терапии предположительно из-за индукции активационного апоптоза или анергии Т-клеток в опухолевом микроокружении вследствие получения ими избыточных костимуляторных сигналов.

Результаты данной работы косвенно указывают на способность рчЦфА регулировать функциональную активность Т-клеток в микроокружении опухоли и свидетельствуют о перспективности его использования в комбинации с отдельными блокаторами контрольных точек иммунитета для иммунотерапии онкологических заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rui R., Zhou L., He S. Cancer immunotherapies: advances and bottlenecks. Front Immunol 2023;14:1212476. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1212476
2. Ren X., Guo S., Guan X. et al. Immunological classification of tumor types and advances in precision combination immunotherapy. Front Immunol 2022;13:790113. DOI: 10.3389/fimmu.2022.790113
3. Tsimberidou A.M., Fountzilas E., Nikanjam M., Kurzrock R. Review of precision cancer medicine: evolution of the treatment paradigm. Cancer Treat Rev 2020;86:102019. DOI: 10.1016/j.ctrv.2020.102019
4. Toor S.M., Sasidharan Nair V., Decock J., Elkord E. Immune checkpoints in the tumor microenvironment. Semin Cancer Biol 2020;65:1–12. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.06.021
5. Jia H., Yang H., Xiong H., Luo K.Q. NK cell exhaustion in the tumor microenvironment. Front Immunol 2023;14:1303605. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1303605
6. Sanchez-Correa B., Lopez-Sejas N., Duran E. et al. Modulation of NK cells with checkpoint inhibitors in the context of cancer immunotherapy. Cancer Immunol Immunother 2019;68(5):861–70. DOI: 10.1007/s00262-019-02336-6
7. Wang L., Geng H., Liu Y. et al. Hot and cold tumors: Immunological features and the therapeutic strategies. MedComm 2020;4(5):e343. DOI: 10.1002/mco2.343
8. Webb E.S., Liu P., Baleeiro R. et al. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. J Biomed Res 2018;32(5):317–26. DOI: 10.7555/JBR.31.20160168
9. Naidoo J., Page D.B., Li B.T. et al. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. Ann Oncol 2015;26(12):2375–91. DOI: 10.1093/annonc/mdv383
10. Alsaab H.O., Sau S., Alzhrani R. et al. PD1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. Front Pharmacol 2017;8:561. DOI: 10.3389/fphar.2017.00561
11. Khair D.O., Bax H.J., Mele S. et al. Combining immune checkpoint inhibitors: established and emerging targets and strategies to improve outcomes in melanoma. Front Immunol 2019;10:453. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00453
12. Wang Y., Wang Y., Ren Y. et al. Metabolic modulation of immune checkpoints and novel therapeutic strategies in cancer. Semin Cancer Biol 2022;86(Pt. 3):542–65. DOI: 10.1016/j.semcancer.2022.02.010

13. Zhou W.T., Jin W.L. B7-H3/CD276: an emerging cancer immunotherapy. Front Immunol 2021;12:701006. DOI: 10.3389/fimmu.2021.701006
14. Albrecht L.J., Livingstone E., Zimmer L., Schadendorf D. The latest option: nivolumab and relatlimab in advanced melanoma. Curr Oncol Rep 2023;25(6):647–57. DOI: 10.1007/s11912-023-01406-4
15. Duan Q., Zhang H., Zheng J., Zhang L. Turning cold into hot: firing up the tumor microenvironment. Trends Cancer 2020;6(7):605–18. DOI: 10.1016/j.trecan.2020.02.022
16. Mehdi A., Attias M., Mahmood N. et al. Enhanced anticancer effect of a combination of s-adenosylmethionine (SAM) and immune checkpoint inhibitor (ICPi) in a syngeneic mouse model of advanced melanoma. Front Oncol 2020;10:1361. DOI: 10.3389/fonc.2020.01361
17. Berraondo P., Sanmamed M.F., Ochoa M.C. et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. Br J Cancer 2019;120(1):6–15. DOI: 10.1038/s41416-018-0328-y
18. Bharadwaj U., Zhang R., Yang H. et al. Effects of cyclophilin A on myeloblastic cell line KG-1 derived dendritic like cells (DLC) through p38 MAP kinase activation. J Surg Res 2005;127(1):29–38. DOI: 10.1016/j.jss.2005.02.020
19. Xu Q., Leiva M.C., Fischkoff S.A. et al. Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. J Biol Chem 1992;267(17):11968–71.
20. Dawar F.U., Xiong Y., Khattak M.N.K. et al. Potential role of cyclophilin A in regulating cytokine secretion. J Leukoc Biol 2017;102(4):989–92. DOI: 10.1189/jlb.3RU0317-090RR
21. Kalinina A., Golubeva I., Kudryavtsev I. et al. Cyclophilin A is a factor of antitumor defense in the early stages of tumor development. Int Immunopharmacol 2021;9:107470. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107470
22. Kalinina A., Silaeva Y., Kazansky D., Khromykh L. The role of recombinant human cyclophilin a in the antitumor immune response. Acta Naturae 2019;11(2):63–7. DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-63-67
23. Kalinina A., Kazansky D., Khromykh L. Recombinant human cyclophilin A in combination with adoptive T-cell therapy improves the efficacy of cancer immunotherapy in experimental models *in vivo*. Biochemistry (Moscow) 2023;88:590–9. DOI:10.1134/S0006297923050024
24. Kalinina A., Kolesnikov A., Kozyr A. et al. Preparative production and purification of recombinant human Cyclophilin A. Biochemistry (Moscow) 2022;87:259–68. DOI: 10.1134/S0006297922030063
25. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. Guidelines for pre-clinical drug evaluations. Pt. 1. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K, 2012. 944 p. (In Russ.).
26. Ma J., Yan S., Zhao Y. et al. Blockade of PD-1 and LAG-3 expression on CD8+ T cells promotes the tumoricidal effects of CD8+ T cells. Front Immunol 2023;14:1265255. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1265255
27. Woo S.R., Turnis M.E., Goldberg M.V. et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. Cancer Res 2012;72(4):917–27. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1620
28. Wei Y., Li Z. LAG3-PD-1 Combo overcome the disadvantage of drug resistance. Front Oncol 2022;12:831407. DOI: 10.3389/fonc.2022.831407
29. Ji S., Lee J., Lee E.S. et al. B16 melanoma control by anti-PD-L1 requires CD8+ T cells and NK cells: application of anti-PD-L1 Abs and Trp2 peptide vaccines. Hum Vaccin Immunother 2021;17(7):1910–22. DOI: 10.1080/21645515.2020.1866951
30. Singh M., Khong H., Dai Z. et al. Effective innate and adaptive antimelanoma immunity through localized TLR7/8 activation. J Immunol 2014;193(9):4722–31. DOI: 10.4049/jimmunol.1401160
31. Garcia M.G., Deng Y., Murray C. et al. Immune checkpoint expression and relationships to anti-PD-L1 immune checkpoint blockade cancer immunotherapy efficacy in aged versus young mice. Aging Cancer 2022;3(1):68–83. DOI: 10.1002/aac2.12045
32. Iwai Y., Ishida M., Tanaka Y. et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99(19):12293–7. DOI: 10.1073/pnas.192461099
33. Dutta S., Ganguly A., Chatterjee K. et al. Targets of immune escape mechanisms in cancer: basis for development and evolution of cancer immune checkpoint inhibitors. Biology (Basel) 2023;12(2):218. DOI: 10.3390/biology1202021 8
34. He Y., Rivard C.J., Rozeboom L. et al. Lymphocyte-activation gene-3, an important immune checkpoint in cancer. Cancer Sci 2016;107(9):1193–7. DOI: 10.1111/cas.12986

Вклад авторов
А.А. Калинина: проведение экспериментов, анализ результатов, статистический анализ, анализ литературы, написание текста статьи;
Д.Б. Казанский, Л.М. Хромых: анализ результатов, редактирование.
Authors' contributions
A.A. Kalinina: conducting experiments, results analysis, statistical analysis, literature analysis, article writing;
D.B. Kazansky, L.M. Khromykh: results analysis, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors
А.А. Калинина / A.A. Kalinina: https://orcid.org/0000-0002-6912-5579
Д.Б. Казанский / D.B. Kazansky: https://orcid.org/0000-0002-4179-8421
Л.М. Хромых / L.M. Khromykh: https://orcid.org/0000-0002-5793-0271

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-00004).
Funding. The study was carried out with the support of the Russian Science Foundation (grant No. 22-75-00004).

Соблюдение правил биоэтики

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

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

Compliance with principles of bioethics

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

The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 14.02.2024. **Принята к публикации:** 20.06.2024. **Опубликована онлайн:** 09.10.2024.
Article submitted: 14.02.2024. **Accepted for publication:** 20.06.2024. **Published online:** 09.10.2024.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-92-102

CC BY 4.0

Молекулярные механизмы действия нового селективного агониста глюкокортикоидного рецептора в клетках рака молочной железы

Е.М. Жидкова[1], В.П. Максимова[1], Д.Д. Григорьева[1], В.З. Ширинян[2], М.Г. Якубовская[1, 3], Е.А. Лесовая[1, 3, 4]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;
[2]ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук»; Россия, 119991 Москва, Ленинский пр-кт, 47;
[3]ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;
[4]ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 390026 Рязань, ул. Высоковольтная, 9

Контакты: Екатерина Михайловна Жидкова *e.zhidkova@ronc.ru*

Введение. Глюкокортикоиды (GC) широко применяются в терапии рака молочной железы (РМЖ) в качестве средства сопроводительной терапии для снижения побочных действий цитостатических препаратов. При этом они могут проявлять антипролиферативное действие на клетки люминального РМЖ. Биологическое действие GC опосредовано активацией глюкокортикоидного рецептора (GR) по двум механизмам: трансрепрессии, обусловливающей терапевтический эффект GC, и трансактивации, ассоциированной с развитием побочных эффектов, резистентности к цитотоксическим препаратам, а также с прогрессией и метастазированием РМЖ. В настоящее время ведется активный поиск безопасной альтернативы GC-терапии. Селективные агонисты GC (SEGRA), особенностью механизма действия которых является избирательный запуск трансрепрессии, можно рассматривать как перспективную альтернативу GC. Одним из наиболее полно охарактеризованных препаратов группы SEGRA является соединение Compound A (CpdA). Нестабильность CpdA ограничивает возможность его применения в клинической практике. Ранее наш коллектив синтезировал и охарактеризовал новый SEGRA – производное CpdA CpdA-03.

Цель исследования – сравнение влияния SEGRA CpdA-03, CpdA и дексаметазона на пролиферативную активность клеток РМЖ, а также на ядерную транслокацию рецептора и активацию GR-зависимых генов в клетках РМЖ.

Материалы и методы. В работе использовали клеточные линии РМЖ люминального (MCF-7) и трижды негативного (TH, MDA-MB-231) подтипов. Влияние CpdA-03 на пролиферацию оценивали прямым подсчетом живых клеток. Распределение клеток по фазам клеточного цикла анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии с окрашиванием йодистым пропидием. Для оценки изменения экспрессии GR-зависимых генов под действием CpdA-03 использовали количественную полимеразную цепную реакцию. Способность нового SEGRA индуцировать трансактивацию GR оценивали методом вестерн-блоттинга.

Результаты. Выявлено, что CpdA-03 подавляет пролиферацию клеток люминального и трижды негативного РМЖ и при этом не стимулирует ассоциированное с трансактивацией фосфорилирование и транслокацию GR в ядро, а также подавляет экспрессию генов белков, регулирующих межклеточную адгезию и миграцию в клетках трижды негативного подтипа РМЖ.

Заключение. Наблюдаемое подавление пролиферации клеток, а также способность CpdA-03 регулировать экспрессию ряда GC-индуцируемых генов в клетках трижды негативного РМЖ указывают на актуальность разработки лекарственного препарата на основе молекулы CpdA-03 для применения в комплексной терапии злокачественных новообразований, в том числе РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, глюкокортикоид, глюкокортикоидный рецептор, метастазирование, селективный агонист глюкокортикоидного рецептора, химиотерапия, побочный эффект

Для цитирования: Жидкова Е.М., Максимова В.П., Григорьева Д.Д. и др. Молекулярные механизмы действия нового селективного агониста глюкокортикоидного рецептора в клетках рака молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(3):92–102.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-92-102

Molecular mechanisms of novel selective glucocorticoid receptor agonist action in breast cancer cells

E.M. Zhidkova[1], V.P. Maksimova[1], D.D. Grigoreva[1], V.Z. Shirinian[2], M.G. Yakubovskaya[1, 3], E.A. Lesovaya[1, 3, 4]

[1]N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;
[2]N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences; 47 Leninsky Prospekt, Moscow 119991, Russia;
[3]Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;
[4]I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 9 Vysokovoltnaya St., Ryazan 390026, Russia

Contacts: Ekaterina Mikhailovna Zhidkova *e.zhidkova@ronc.ru*

Introduction. Glucocorticoids (GC) are widely used in breast cancer (BC) therapy to reduce the side effects of cytostatic drugs and may exhibit antiproliferative effects on luminal BC cells. The biological action of GC is mediated by glucocorticoid receptor (GR) by two mechanisms: transrepression, which determines the therapeutic effect of GC, and transactivation (associated with the development of side effects, resistance to cytotoxic drugs, cancer progression and metastasis). Selective GR agonists (SEGRA) which may selective activate transrepression are a promising alternative to GC to use in combination cancer therapy. One of the most studied SEGRA is Compound A (CpdA). The instability of CpdA limits its use in clinical practice. So recently we performed synthesis and evaluation of biological activities of the CpdA analogue, CpdA-03.

Aim. To compare the effects of SEGRA CpdA-03 and CpdA and dexamethasone on proliferative activity of breast cancer cells, as well as receptor nuclear translocation and activation of GR-dependent genes in breast cancer cells.

Materials and methods. Luminal (MCF-7) and triple negative (MDA-MB-231) BC cell lines were used. The effect of CpdA-03 on proliferation was evaluated by direct counting of viable cells with trypan blue staining. The effect of the compound on cell distribution by cell cycle phases was assessed by flow cytofluorimetry with propidium iodide staining. Changes in the expression of GR-dependent genes after incubation with CpdA-03 were evaluated by quantitative polymerase chain reaction. Additionally, the ability of the new SEGRA to induce transactivation-associated translocation of the receptor to the nucleus was evaluated by Western blotting.

Results. CpdA-03 was shown to suppress proliferation of luminal and triple negative BC cells. This compound causes changes in the expression of a number of GC-inducible genes, but does not stimulate GR phosphorylation and translocation to the nucleus in BC cells.

Conclusion. The observed suppression of cell proliferation, as well as the ability of CpdA-03 to reduce gene expression of proteins regulating intercellular adhesion and cell migration, intracellular signaling, stress response, and transcription in BC cells makes it relevant for further development of the drug for use in the combination therapy of cancers including breast cancer.

Keywords: breast cancer, glucocorticoid, glucocorticoid receptor, metastasis, selective glucocorticoid receptor agonist, chemotherapy, side effect

For citation: Zhidkova E.M., Maksimova V.P., Grigoreva D.D. et al. Molecular mechanisms of novel selective glucocorticoid receptor agonist action in breast cancer cells. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(3):92–102. (In Russ.).

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-92-102

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) в настоящее время занимает 1-е место по распространенности (22,4 % случаев) и смертности у женского населения России [1, 2]. Современная молекулярная классификация РМЖ выделяет 3 основных подтипа РМЖ: люминальный (гормонозависимый), HER2-положительный (HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа) и трижды негативный (ТНРМЖ) [3, 4]. Выявление молекулярного подтипа опухоли определяет стратегию терапии. При РМЖ люминального подтипа наблюдается повышенный уровень экспрессии рецептора эстрогена (ER), что обусловливает высокую эффективность гормональной терапии. Опухоли HER2-положительного подтипа характеризуются отсутствием экспрессии ERα, но в то же время чувствительны к таргетной анти-HER2-терапии. При ТНРМЖ отсутствуют мишени для специфической терапии, поэтому назначают адъювантную терапию, которая сочетает в себе хирургическое вмешательство и курсовую химиотерапию производными таксанов, антрациклинов или препаратов платины [4]. В случае развития резистентности или рецидива гормонозависимого РМЖ также проводят адъювантную химиотерапию [4].

Современные исследования роли ядерных рецепторов в патогенезе РМЖ не ограничиваются анализом роли рецепторов эстрогена и прогестерона. Изучение действия экспрессии рецептора глюкокортикоидов (GR) и его эндо- и экзогенных лигандов на прогрессию РМЖ также является актуальным прикладным направлением

биомедицинской науки. Прежде всего, это связано с тем, что в рекомендуемые режимы адъювантной/постнеоадъювантной терапии РМЖ включены синтетические глюкокортикоиды (GC) [4]. Их применяют для снятия побочных эффектов химиотерапии и расширения терапевтического интервала препаратов.

В настоящее время отсутствует дифференцированный подход к использованию GC в терапии РМЖ. Их назначают симптоматически при люминальном РМЖ и в качестве обязательного компонента при проведении неоадъювантной химиотерапии ТНРМЖ. Особо стоит отметить, что GC в высоких дозах применяются в качестве компонентов местной и общей анестезии при проведении биопсии и резекции опухоли. Активация GR может подавлять эстрогензависимую пролиферацию клеток [5] и увеличивать продолжительность жизни пациентов с гормонозависимыми опухолями [6, 7]. В то же время в клетках HER2-положительного РМЖ и ТНРМЖ активация GR ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [8]. Глюкокортикоиды снижают терапевтический эффект доксорубицина, паклитаксела и трастузумаба за счет ингибирования индуцируемого препаратами апоптоза в клетках РМЖ различных подтипов [9–13] в связи с активацией киназ SGK-1 и MKP-1 [9] и аутофагии [14–16].

Реализация биологического действия GR может протекать по двум основным механизмам. Доминирующий механизм, реализуемый при формировании комплекса GC-GR, включает стадии образования гомодимера, фосфорилирования GR по остатку Ser211, транслокации комплекса в ядро и связывания с респонсивными элементами GR (GRE). Поскольку данный механизм ассоциирован с транслокацией рецептора в ядро и последующей активацией транскрипции генов, он носит название трансактивации [17]. Механизм трансрепрессии предполагает образование гетеродимерного комплекса GR с другими транскрипционными факторами в цитоплазме клеток (например, AP1, транскрипционного ядерного фактора κB (NF-κB), STAT). Такое белок-белковое взаимодействие (тетеринг) приводит к инактивации факторов транскрипции, снижению экспрессии их респонсивных генов и опосредует терапевтическое действие GC [18].

В последние десятилетия разрабатывают селективные модуляторы рецептора GR (SEGRA), которые рассматривают в качестве возможной замены GC в клинической практике. При связывании с препаратами группы SEGRA GR теряет способность формировать гомодимер и реализовывать механизм трансактивации. В то же время механизм трансрепрессии и терапевтическое действие запускаются в полном объеме [19, 20]. Данная группа препаратов не ограничивается структурными аналогами GC. Среди малых молекул выявлен ряд соединений с доказанной активностью SEGRA: AZD7594, AZD5423, ZK245186 и Compound A (CpdA) (рис. 1) [19, 20]. По мнению разработчиков, данные препараты следует применять в основном в терапии

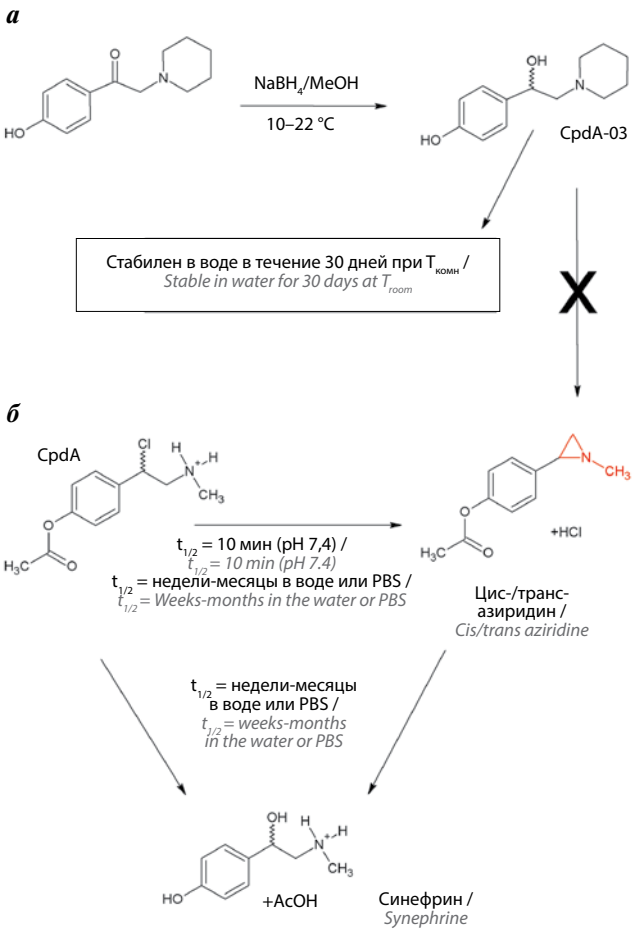


Рис. 1. *Сравнение CpdA и CpdA-03: а – схема синтеза CpdA-03 (адаптировано из [25]); б – схема превращений CpdA в растворах (адаптировано из [24]). $T_{комн}$ – комнатная температура; $t_{1/2}$ – время полураспада молекулы*

Fig. 1. *CpdA and CpdA-03 comparison: a – scheme of CpdA-03 synthesis (adapted from [25]); б – scheme of CpdA degradation in water solution (adapted from [24]). T_{room} – room temperature; $t_{1/2}$ – molecule half-life*

астмы и ревматоидного артрита. Исследования их биологического действия в отношении злокачественных новообразований проведены лишь для SEGRA CpdA. Данная молекула имеет высокое сродство к GR и селективно запускает трансрепрессию в клетках лейкозов, лимфом и рака предстательной железы [21–23]. Однако исследования стабильности этого соединения показали, что в водном растворе структура CpdA подвергается конформационным изменениям, которые приводят к формированию структурного аналога азиридина – канцерогена группы 2B (см. рис. 1, *б*) [24]. В связи с этим проведены синтез ряда производных CpdA, а также оценка их лигандных свойств и противоопухолевой активности [24]. В ходе работы получена кандидатная молекула 4-[1-гидрокси-2-(пиперидин-1-ил) этил]фенол (CpdA-03), для которой показано не только сродство к GR, но и отсутствие способности индуцировать трансактивацию. Описаны способность CpdA-03 подавлять экспрессию провоспалительных генов (*IL-1*, *IL-6*) и активность NF-κB, антипролиферативный

и проапоптотический эффекты на клеточных моделях опухолей системы крови *in vitro*, а также способность подавлять прогрессию лимфомы на мышиной модели *in vivo* [25]. Также стоит отметить, что данная молекула отличается простотой синтеза и, в отличие от CpdA, высокой стабильностью при длительном хранении в водных растворах (рис. 1, *а*) [25], что делает ее перспективной для внедрения в клиническую практику.

Цель исследования – оценка действия синтетического SEGRA CpdA-03 на клетки РМЖ. Проведено сравнение влияния SEGRA CpdA-03, CpdA и дексаметазона (Dex) на клеточную пролиферацию и прохождение клеток по фазам клеточного цикла, выявлены мишени CpdA-03 и CpdA среди GC-регулируемых генов в клетках РМЖ. Дополнительно оценена способность CpdA-03 индуцировать трансактивацию и ядерную транслокацию GR.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. Клеточные линии люминального РМЖ (MCF-7) и ТНРМЖ (MDA-MB-231) культивировали в стандартной среде, как описано ранее [26]. Клеточные сублинии с подавленной экспрессией GR (MCF-7/shGR и MDA-MB-231/shGR) получены путем вирусной трансдукции [27].

Подсчет клеток. Клетки высевали в 24-луночные планшеты по 30 тыс. клеток на лунку. После прикрепления клеток к подложке в культуральную среду вносили 10 нМ CpdA-03; 0,1 % растворителя (диметилсульфоксида, ДМСО) или соединения сравнения (10 нМ Dex (Macklin, Китай) или CpdA (Sigma Aldrich, США)) и инкубировали в течение 120 ч при 37 °C в атмосфере 5 % CO_2. Затем клетки снимали с подложки раствором трипсина-ЭДТА и окрашивали 0,4 % раствором трипанового синего (1:1). Количество живых клеток регистрировали с помощью автоматического счетчика клеток TC-20 (Bio-Rad, США). Число живых клеток в контрольных (обработанных растворителем) образцах принимали за 100 %.

Проточная цитофлуориметрия. Клетки высевали в 24-луночные планшеты, обрабатывали и инкубировали, как описано выше. Затем их фиксировали и окрашивали [26]. Полученные образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (не менее 20 тыс. событий на экспериментальную точку). Все эксперименты проведены в 2 технических и 3 биологических повторах.

Количественная полимеразная цепная реакция. Клетки высевали в 6-луночные планшеты (10 тыс. клеток в лунке), культивировали в присутствии 10 нМ Dex, CpdA или CpdA-03 в течение 24 ч, после чего с помощью реагента ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия) по протоколу производителя выделяли тотальную РНК и с использованием набора MMLV RT (ЗАО «Евроген», Россия) проводили реакцию обратной транскрипции. В плашку с лиофилизованными праймерами (RT² Profiler™ PCR Array Human Glucocorticoid Signaling (PAHS-154Z), Qiagen, Германия) вносили 500 мкг комплементарной ДНК и 20 мкл qPCRmix-HS (ЗАО «Евроген», Россия). Амплификацию проводили в соответствии с рекомендациями производителя (95 °C – 15 мин, 40 циклов: 95 °C – 15 с, 60 °C – 60 с).

Вестерн-блоттинг. Для сравнения уровня GR в клетках РМЖ 500 тыс. клеток лизировали 60 мин при 4 °C и постоянном перемешивании в буфере RIPA (10 мМ Трис; pH 7,4; 150 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА; 0,1 % додецилсульфат натрия; 0,5 % дезоксихолат натрия; 1 % Тритон-X 100; 10 % глицерин) с добавлением ингибитора протеиназ (Sigma Aldrich, США) и ингибитора фосфатаз (Sigma Aldrich, США). Для оценки влияния лигандов на степень ядерной транслокации GR клетки высевали в 6-луночные планшеты по 500 тыс. клеток в лунке, инкубировали с 10 нМ Dex, CpdA или CpdA-03 в течение 2, 4 и 8 ч. Для выделения тотальной фракции клетки лизировали буфером RIPA. Для выделения ядерной фракции их ресуспендировали в буфере FB (10 мМ HEPES (pH 7,4); 10 мМ KCl; 1,5 мМ $MgCl_2$; 1 мМ ЭДТА; 1 мМ EGTA, ингибитор протеинкиназ), лизировали путем продавливания через иглу калибра 26, инкубировали на льду 20 мин и центрифугировали (720 g, 4 °C, 20 мин). Осадок ресуспендировали в буфере FB и продавливали 10 раз через иглу калибра 23. Центрифугировали в тех же условиях, осадок ресуспендировали в трис-солевом буфере (pH 7,4) и обрабатывали ультразвуком (3 с, 4 °C, мощность 2 амплитуды).

Концентрацию белка измеряли классическим методом Бредфорда [28]. Разделение белков проводили в полиакриламидном геле с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Затем мембрану гибридизировали 16 ч с антителами к pGR-Ser211 (PA5-17668, Invitrogen, США), GR (sc-12763, Santa Cruz Biotechnology, США), гистону H3 (A16235, Abclonal, Китай) или глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе GAPDH (Abcam, Великобритания). Далее проводили гибридизацию со вторичными антителами (Abcam, Великобритания). Количественный анализ выполняли с помощью набора Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad, США) с последующей обработкой изображений в программе ImageJ.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты выполнены в 3 биологических повторах. Для проверки на нормальность применяли критерий Колмогорова–Смирнова. По полученным с помощью вестерн-блоттинга и проточной цитофлуориметрии данным вычислены средние значения (M) и стандартная ошибка среднего (SEM). Результаты представлены в формате M ± SEM. Статистические различия вычислены с помощью пакета программ GraphPad Prizm 8 с применением *t*-критерия Стьюдента. Для статистической обработки результатов количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали программное обеспечение GeneGlobe (Qiagen, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка антипролиферативного действия CpdA-03. Для оценки влияния уровня экспрессии GR на ответ клеток проведен сравнительный анализ уровня экспрессии GR в клетках РМЖ, а также получены сублинии с нокдауном GR (MCF-7/shGR и MDA-MB-231/shGR). Экспрессия GR в линии MDA-MB-231 оказалась в 1,5 раза выше, чем в MCF-7 (рис. 2, *а*). В полученных сублиниях подавление GR составило 75 ± 5% для линии MCF-7/shGR и 66 ± 5 % для MDA-MB-231/shGR (рис. 2, *б*). Визуальные наблюдения свидетельствовали о том, что нокдаун GR не способствовал гибели или снижению пролиферативной активности клеток РМЖ.

Глюкокортикоиды, как и SEGRA, обладают антипролиферативным действием на клетки РМЖ [26, 29], при этом они применяются курсами в качестве вспомогательных, но не цитотоксических агентов в терапии РМЖ. В связи с этим мы сравнили антипролиферативное влияние CpdA-03, Dex и CpdA путем прямого подсчета жизнеспособных клеток при длительной (120 ч) инкубации в нецитотоксичных дозах (10 нМ), моделируя таким образом курсовое воздействие GC и SEGRA. Выявлено, что за 120 ч CpdA-03 снижает пролиферацию клеток MCF-7 и MDA-MB-231 на 31 ± 15 и 21 ± 8 % соответственно (рис. 3, *а*). В то же время пролиферативная активность клеток указанных линий с подавленной экспрессией GR (MCF-7/shGR и MDA-MB-231/shGR) остается неизменной. Соединение CpdA-03 индуцирует накопление клеток РМЖ в стационарной (G1) фазе клеточного цикла (рис. 3, *б*). Доля клеток линий MCF-7 и MDA-MB-231 в фазе G1 увеличилась с 60 ± 0,4 до 78 ± 2,0 % и с 49 ± 1,9 до 69 ± 0,4 % соответственно

Анализ влияния CpdA-03 на экспрессию зависимых от глюкокортикоидного рецептора генов. Оценка влияния CpdA-03 на уровень экспрессии GR-зависимых генов в клетках РМЖ проведена с использованием панели лиофилизованных праймеров с помощью количественной ПЦР (рис. 4). Панель генов включает широкий спектр GC-регулируемых генов, степень активации/подавления которых может зависеть от концентраций и времени воздействия. Для сравнительной оценки изменения профилей экспрессии панели генов мы выбрали время инкубации 24 ч. В линии MCF-7 Dex, CpdA и CpdA-03 регулируют экспрессию 18, 19 и 61 гена соответственно, в линии MDA-MB-231 – 77, 82 и 53 генов соответственно. CpdA-03 оказывает ингибирующее действие на гены, кодирующие белки межклеточной адгезии и миграции клеток (*HAS2*, *RHOB*, *RHOJ*, *SNTA1*, *PLEKHF1*, *EHD3*), участвующие в передаче внутриклеточных сигналов (*BMPER*, *PLD1*, *SPHK1*,

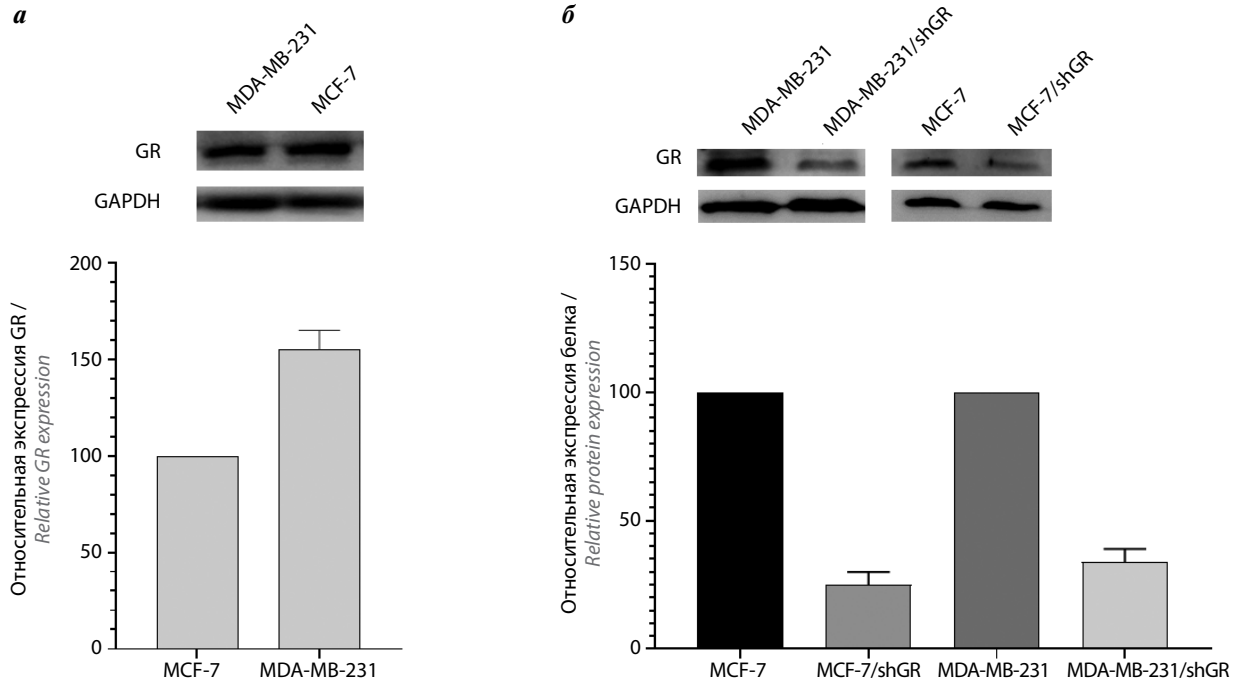


Рис. 2. *Относительная экспрессия глюкокортикоидного рецептора (GR) в клетках рака молочной железы. Анализ проведен методом вестерн-блоттинга с использованием антител к GR и GAPDH: а – сравнение уровня экспрессии GR в клетках рака молочной железы. Экспрессия GR в MCF-7 принята за 100 %; б – относительная экспрессия GR в сублиниях MCF-7/shGR и MDA-MB-231/shGR. Клетки с нокаутом GR получены путем лентивирусной трансдукции вектора, несущего короткую шпилечную РНК к матричной РНК рецептора. Результаты представлены в процентах относительно контроля*

Fig. 2. *The relative expression of glucocorticoid receptor (GR) in breast cancer cells. The analysis was performed using Western blotting with antibodies to GR and GAPDH: a – comparison of the GR expression level in breast cancer cells. Glucocorticoid receptor expression in MCF-7 is assumed to be 100 %; б – relative expression of GR in the MCF-7/shGR and MDA-MB-231/shGR. Glucocorticoid receptor knockout cells were obtained by lentiviral transduction of a short hairpin RNA to GR matrix RNA vector. The results are presented as a percentage relative to the control*

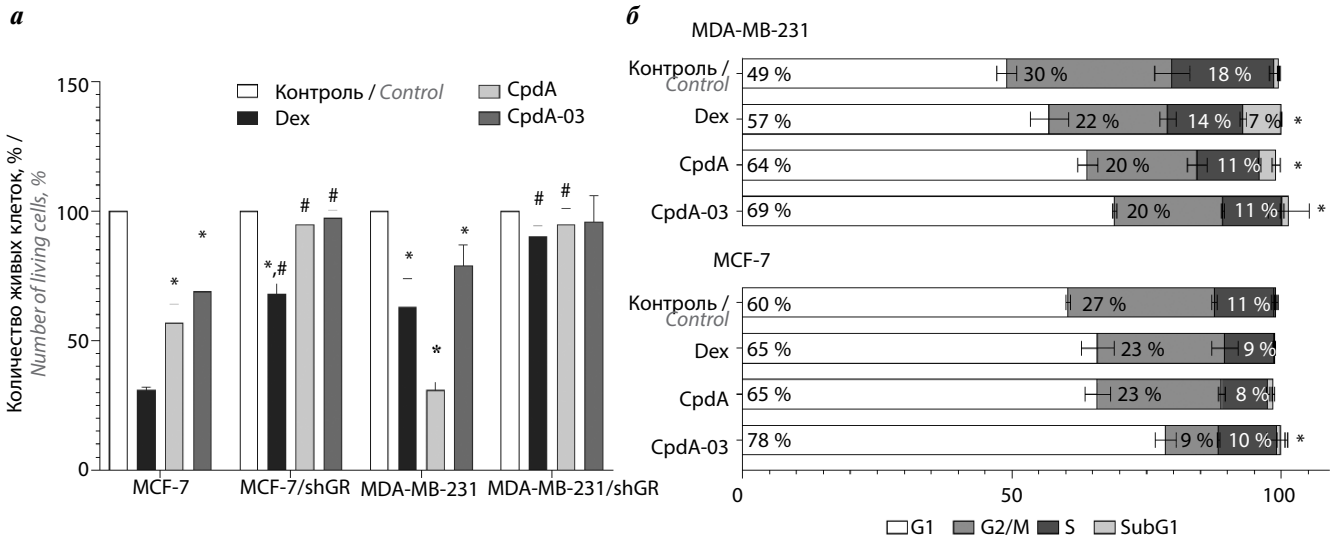


Рис. 3. *Антипролиферативное действие CpdA-03 на клетки рака молочной железы: а – результаты прямого подсчета клеток. Клетки инкубировали 120 ч с 10 нМ дексаметазона (Dex), CpdA, CpdA-03 или диметилсульфоксида (ДМСО). Затем проводили подсчет живых клеток методом исключения с использованием красителя трипанового синего. Результаты представлены в виде % от числа клеток в контрольных образцах; б – результаты проточной цитофлуориметрии. Клетки инкубировали 120 ч с 10 нМ Dex, CpdA, CpdA-03 или ДМСО. Затем фиксировали в этаноле, проводили отмывку центрифугированием в PBS, ресуспендировали в PI-буфере и анализировали на проточном цитофлуориметре. *Различия статистически значимы по сравнению с группой контроля (p <0,05). #Статистически значимое различие с соответствующим образцом на линии с нокдауном глюкокортикоидного рецептора*

Fig. 3. *Antiproliferative effect of CpdA-03 in breast cancer cells: a – live cell count. Cells were cultivated in the presence of 10 nM dexamethasone (Dex), CpdA, CpdA-03 or dimethyl sulfoxide (DMSO) for 120 h, then cells were collected and stained with trypan blue and live cell were counted. Data are presented as % of cells from control; б – cytometry with PI staining. Cells were cultivated in the presence of 10 nM Dex, CpdA, CpdA-03 or DMSO for 120 h, then cells were fixed with ethanol. Then cell were washed and stained with PI and analyzed by flow cytometry. *A statistically significant difference from the control (p <0.05). #A statistically significant difference between results for wild type and shGR cell lines*

TNF, *USP2*), ответе на стресс (*DDIT4*, *PDCD7*, *SESN1*), процессинге РНК (*ADARB1*), а также факторы транскрипции (*FOSL2*, *TBL1XR1*, *TNFAIP3*, *TSC22D3*, *VDR*, *ZFP3*, *ZHX3*).

Исследование влияния CpdA-03 на динамику транслокации глюкокоротикоидного рецептора в ядро и фосфорилирование по Ser211. В отличие от Dex исследуемый SEGRA CpdA-03 не индуцирует ассоциированное с запуском трансактивации фосфорилирование GR по Ser211 (рис. 5). В линии MCF-7 наиболее высокий уровень pGR-Ser211 в ядре и цитоплазме наблюдали через 2 ч инкубации с Dex. При этом через 4 ч активный GR находился только в ядре клеток, в тотальной фракции уровень pGR-Ser211 снижался до базального. В то же время в линии ТНРМЖ (MDA-MB-231) наблюдалось времязависимое увеличение pGR-Ser211 в ядерной фракции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Стандартные протоколы терапии РМЖ включают высокие дозы Dex. Этот препарат обладает антипролиферативным действием в отношении опухолевых клеток, а также способностью снижать побочные эффекты цитостатических препаратов. Однако применение GC ассоциировано с возникновением большого количества нежелательных явлений начиная от дисбаланса всех метаболических систем организма и заканчивая усилением метастазирования. Активация транскрипции GR-зависимых генов в клетках РМЖ приводит к инвазии и миграции опухолевых клеток, развитию резистентности клеток РМЖ к противоопухолевым препаратам, а также к ряду метаболических осложнений [5–14]. Препараты класса SEGRA обладают терапевтическим действием, сравнимым с действием классических GC, при этом их применение не вызывает трансактивацию GR и реализацию связанных с ней нежелательных явлений. Эффективность препаратов класса SEGRA показана для многих нозологий, включая опухоли системы крови [19–25].

Результаты нашего исследования показали, что новый препарат класса SEGRA (CpdA-03) обладает сравнимым с CpdA и Dex цитостатическим действием на клетки люминального РМЖ и ТНРМЖ. Необходимо отметить, что данный эффект зависел от количества активного GR в клетках, поскольку на пролиферативную активность клеток с подавленной экспрессией GR (MCF-7/shGR и MDA-MB-231/shGR) CpdA и CpdA-03 не влияли. Дексаметазон снижал пролиферацию клеток люминального РМЖ с подавленной экспрессией GR (MCF-7/shGR), поскольку GC обладают способностью регулировать ERα [30]. Отсутствие подобной корреляции в цитостатических эффектах SEGRA косвенно свидетельствует о том, что они не являются лигандами ERα. Данное наблюдение подтверждает, что

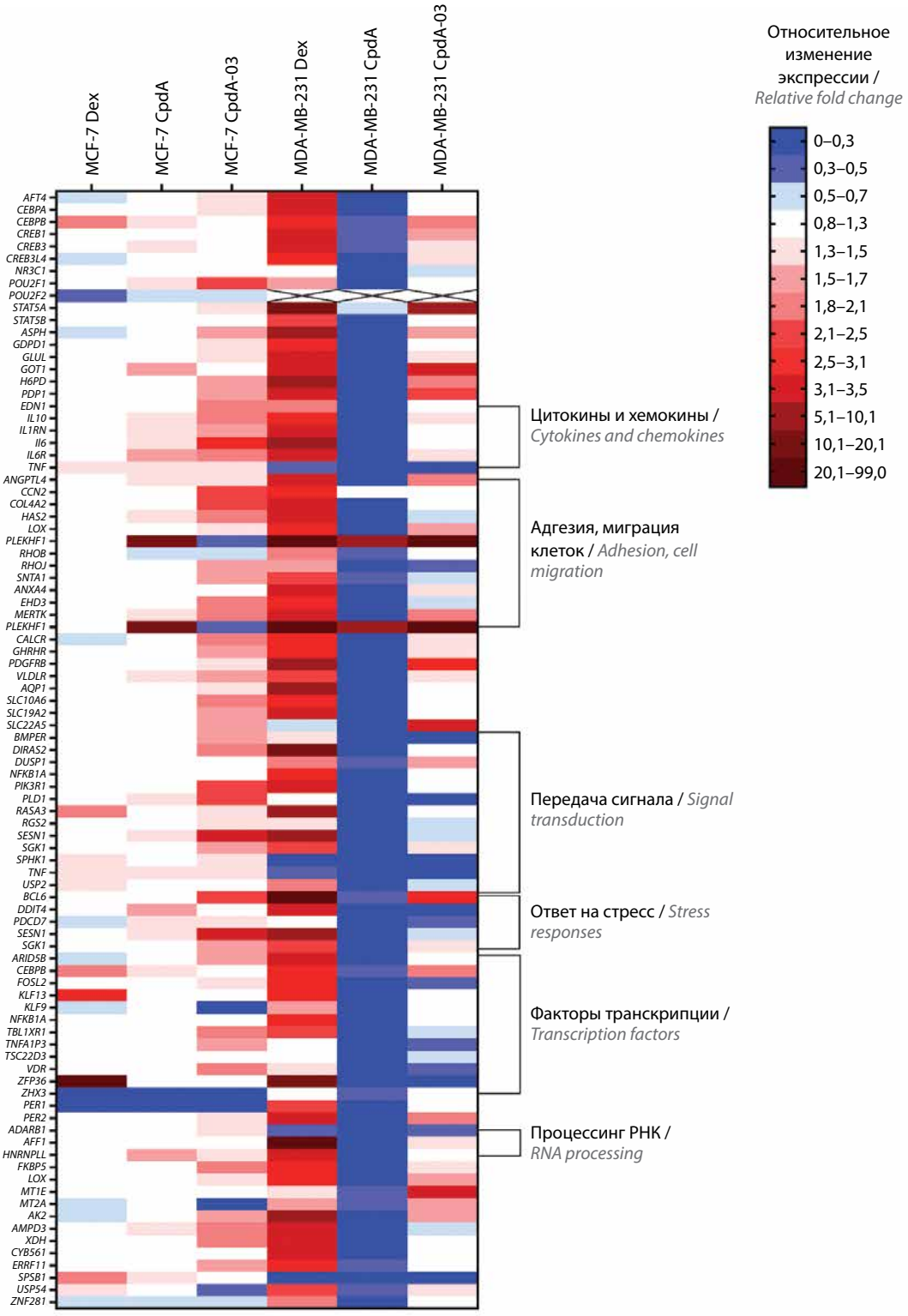


Рис. 4. *Оценка экспрессии глюкокортикоид-респонсивных генов в клетках рака молочной железы. Клетки инкубировали с 10 нМ CpdA-03, CpdA или дексаметазона (Dex) в течение 24 ч. Относительное изменение экспрессии оценивали с помощью набора RT2 Profiler™ PCR Array Human Glucocorticoid Signaling PAHS-154Z (Qiagen, Германия). Результаты анализа представлены в виде тепловой диаграммы, иллюстрирующей относительное изменение экспрессии генов*

Fig. 4. *Analysis of glucocorticoid-response genes expression. Cells were cultivated in the presence of 10 nM CpdA-03, CpdA or dexamethasone (Dex) for 24 h. Relative fold change were evaluated by RT2 Profiler™ PCR Array Human Glucocorticoid Signaling PAHS-154Z (Qiagen, Germany) assay. Data were presented as heat map of relative fold change*

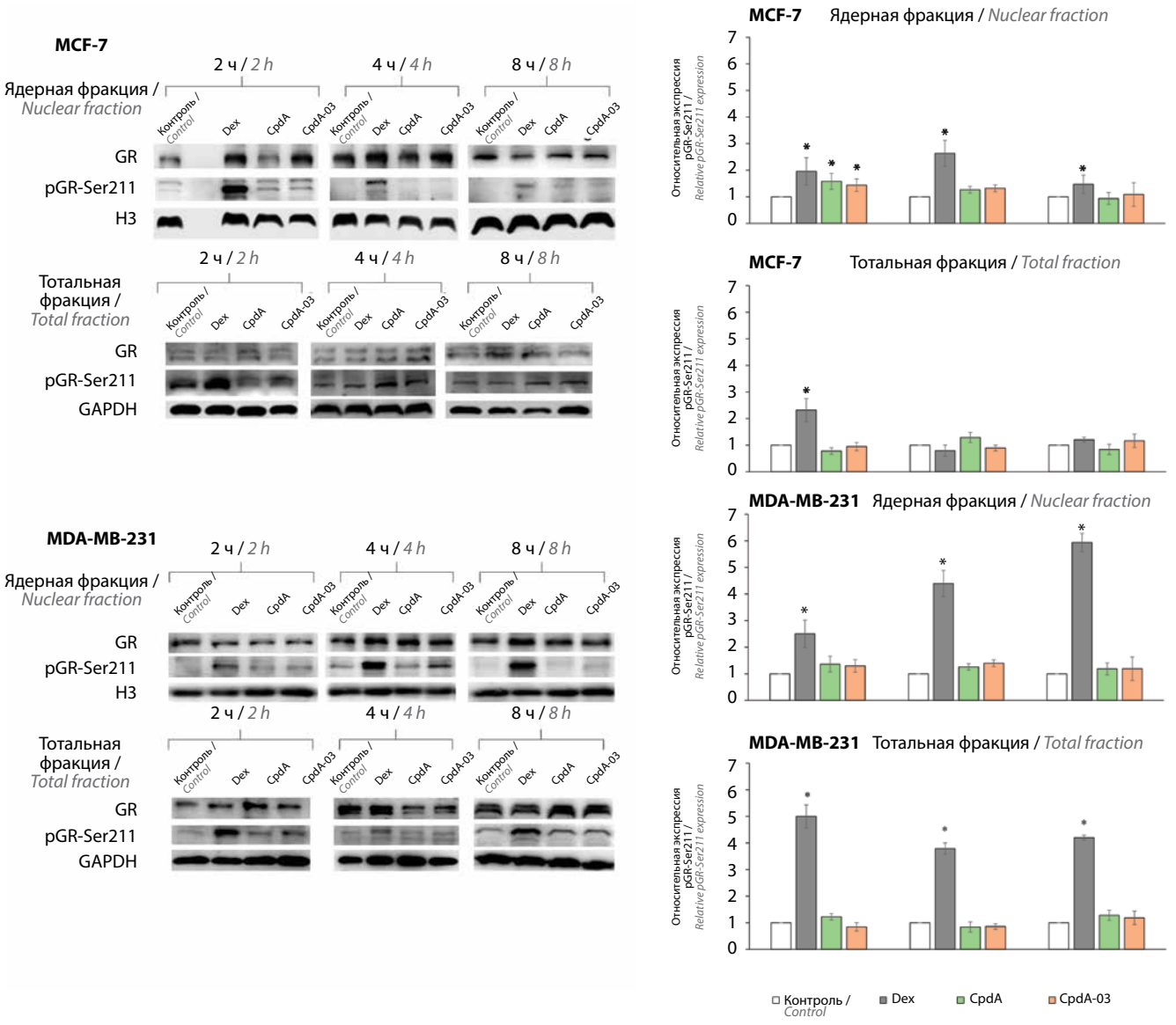


Рис. 5. *Динамика транслокации и фосфорилирования глюкокортикоидного рецептора (GR). Клетки инкубировали с 10 нМ CpdA-03, CpdA и дексаметазона (Dex) в течение 2, 4 или 8 ч. Уровень экспрессии белков определяли методом вестерн-блоттинга с использованием специфичных антител к GR или pGR-Ser211. Представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно уровня гистона H3 или GAPDH. *Различия статистически значимы по сравнению с группой контроля (p <0,05)*

Fig. 5. *Glucocorticoid receptor (GR) nuclear translocation and phosphorylation. Cells were cultivated in the presence of 10 nM dexamethasone (Dex), CpdA, CpdA-03 for 2, 4 or 8 h, then western blot analysis of GR and pGR-Ser211 in total and nuclear protein fraction were performed. GAPDH or histone H3 served as loading control. *A statistically significant difference from the control (p <0.05)*

антипролиферативное действие CpdA-03 в клетках РМЖ различных биологических подтипов реализуется посредством активации GR. Результаты цитофлуориметрического анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла продемонстрировали, что CpdA-03 вызывает арест клеток РМЖ в фазе G1 клеточного цикла. В целом показано, что клетки линии ТНРМЖ (MDA-MB-231) более восприимчивы к лигандам GR, чем клетки люминального РМЖ (MCF-7). Стоит отметить, что клетки MCF-7 изначально обладают менее агрессивным фенотипом, меньшим миграционным потенциалом и слабой подвижностью по сравнению с линией MDA-MB-231 [31].

Известно, что фосфорилирование в положении Ser211 является основным маркером трансактивации GR [32], которая связана с реализацией основных побочных эффектов GC. В клетках РМЖ Dex индуцирует фосфорилирование довольно быстро (за 2–4 ч), в то время как при действии соединений класса SEGRA уровень фосфорилирования рецептора остается неизменным относительно контроля. Результаты нашего исследования показали, что CpdA и CpdA-03 не индуцируют не только ядерную транслокацию, но и трансактивационное фосфорилирование GR. CpdA и его синтетический аналог CpdA-03 также не приводят к увеличению транскрипции GC-зависимых транскрипционных

факторов (*NFKBIA*, *KLF9*, *KLF13*, *FOSL2*) и кофакторов GR (семейство CREB). Более того, SEGRA снижают экспрессию гена *NR3C1*, кодирующего GR, в клетках ТНРМЖ.

Реализация антипролиферативных и иных эффектов SEGRA CpdA и CpdA-03, вероятно, не связана с ядерной транслокацией GR и опосредуется тетерингом (белок-белковым взаимодействием комплекса лиганда с GR и других транскрипционных факторов). Индукция фосфорилирования и ядерной транслокации, а также запуск GC-зависимых генов при действии Dex наиболее выражены в клетках ТНРМЖ, что, вероятно, связано с разницей в базальном уровне экспрессии GR в клетках. Изменение профиля экспрессии GR-зависимых генов в клетках MDA-MB-231 после воздействия препаратов группы SEGRA также более выражено по сравнению с ответом клеток люминального РМЖ (MCF-7) (затрагивает большее число генов, уровень изменений также более выражен).

Стоит отметить, что SEGRA, в отличие от Dex, не вызывают активации гена *DDIT4*, опосредующего развитие GC-индуцированного остеопороза и атрофии кожи [33]. Также CpdA и CpdA-03 снижают уровень экспрессии киназ RHOB и RHOJ, гиперэкспрессия которых коррелирует с неблагоприятным прогнозом и высоким риском метастазирования РМЖ [34, 35]. В целом под действием CpdA наблюдается подавление большей части исследуемых GR-зависимых генов (81 из 83), при этом CpdA-03 ингибирует 52 из 83 исследуемых генов или не влияет на их экспрессию. Данные различия связаны с более высоким сродством CpdA к GR, что показано нами ранее *in vitro* [25]. Поскольку в литературе описаны связь экспозиции GC и усиление метастатического потенциала РМЖ [7, 8, 36], наблюдаемые различия во влиянии GC и изучаемых SEGRA на группу генов, регулирующих адгезию и миграцию клеток ТНРМЖ, представляют особый интерес. В частности, в настоящее время назначение GC пациенткам с РМЖ проводится на основании симптомов без учета молекулярного подтипа опухоли и уровня экспрессии GR. Более широкое исследование влияния GC и SEGRA на экспрессию генов и белков данной группы позволит выявить молекулярные механизмы GR-опосредованного метастазирования РМЖ, ввести в диагностическую практику определение статуса GR у пациенток с данной патологией и персонализировать лечение.

Также стоит отметить, что ниша противовоспалительных лекарственных препаратов на основе SEGRA довольно широка, а исследования их активности в отношении опухолей проведены только для нестабильного низкомолекулярного соединения CpdA. Полученные нами данные продемонстрировали GR-зависимое антипролиферативное действие нового соединения класса SEGRA CpdA-03 в отношении клеток РМЖ *in vitro*. Показан избирательный запуск трансрепрессии GR, опосредующий снижение жизнеспособности клеток. Высокая стабильность молекулы CpdA-03 и ее селективность в отношении активации GR делают ее первым перспективным препаратом класса SEGRA, способным заменить GC в онкологической практике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клеточные линии РМЖ с высоким базальным уровнем экспрессии GR чувствительны к действию SEGRA CpdA-03. Новый SEGRA CpdA-03 потенциально является более безопасной альтернативой классическим GC в терапии ТНРМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bray F., Laversanne M., Sung H. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2024;74(3):229–63. DOI: 10.3322/caac.21834
2. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой, И.В. Лисичниковой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2023. 275 с.
   Malignant tumors in Russia in 2022 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova, I.V. Lisichnikova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU "NMITS radiologii" Minzdrava Rossii, 2023. 275 p. (In Russ.).
3. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000;406(6797):747–52. DOI: 10.1038/35021093
4. Тюляндин С.А., Артамонова Е.В., Жигулев А.Н. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака молочной железы. Злокачественные опухоли 2023;13(3s2):157–200. DOI: 10.18027/2224-5057-2023-13-3s2-1-157-200
   Tyulyandin S.A., Artamonova E.V., Zhigulev A.N. et al. Practical recommendations for the drug treatment of breast cancer. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors 2023;13(3s2):157–200. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2023-13-3s2-1-157-200
5. Karmakar S., Jin Y., Nagaich A.K. Interaction of glucocorticoid receptor (GR) with estrogen receptor (ER) α and activator protein 1 (AP1) in dexamethasone-mediated interference of ERα activity. J Biol Chem 2013;288(33):24020–34. DOI: 10.1074/jbc.M113.473819
6. Keith B.D. Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on nonhematologic malignancy. BMC Cancer 2008;8:84. DOI: 10.1186/1471-2407-8-84
7. West D.C., Pan D., Tonsing-Carter E.Y. et al. GR and ER coactivation alters the expression of differentiation genes and associates with improved ER+ breast cancer outcome. Mol Cancer Res 2016;14(8):707–19. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0433
8. Pan D., Kocherginsky M., Conzen S.D. Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer. Cancer Res 2011;71(20):6360–70. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0362
9. Wu W., Chaudhuri S., Brickley D.R. et al. Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. Cancer Res 2004;64(5):1757–64. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-2546

10. Sumikawa T., Shigeoka Y., Igishi T. et al. Dexamethasone interferes with trastuzumab-induced cell growth inhibition through restoration of AKT activity in BT-474 breast cancer cells. Int J Oncol 2008;32(3):683–8.
11. Kim M.J., Chae J.S., Kim K.J. et al. Negative regulation of SEK1 signaling by serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase 1. EMBO J 2007;26(13):3075–85. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601755
12. Pang D., Kocherginsky M., Krausz T. et al. Dexamethasone decreases xenograft response to Paclitaxel through inhibition of tumor cell apoptosis. Cancer Biol Ther 2006;5(8):933–40. DOI: 10.4161/cbt.5.8.2875
13. Sui M., Chen F., Chen Z., Fan W. Glucocorticoids interfere with therapeutic efficacy of paclitaxel against human breast and ovarian xenograft tumors. Int J Cancer 2006;119(3):712–7. DOI: 10.1002/ijc.21743
14. Zambrano J., Yeh E.S. Autophagy and apoptotic crosstalk: mechanism of therapeutic resistance in HER2-positive breast cancer. Breast Cancer (Auckl) 2016;10:13–23. DOI: 10.4137/BCBCR.S32791
15. Karantza-Wadsworth V., Patel S., Kravchuk O. et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. Genes Dev 2007;21(13):1621–35. DOI: 10.1101/gad.1565707
16. Wu W.K., Coffelt S.B., Cho C.H. et al. The autophagic paradox in cancer therapy. Oncogene 2012;31(8):939–53. DOI: 10.1038/onc.2011.295
17. Groeneweg F.L., van Royen M.E., Fenz S. et al. Quantitation of glucocorticoid receptor DNA-binding dynamics by single-molecule microscopy and FRAP. PLoS One 2014;9(3):e90532. DOI: 10.1371/journal.pone.0090532
18. Ramamoorthy S., Cidlowski J.A. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. Endocr Dev 2013;24:41–56. DOI: 10.1159/000342502
19. Sundahl N., Bridelance J., Libert C. et al. Selective glucocorticoid receptor modulation: new directions with non-steroidal scaffolds. Pharmacol Ther 2015;152:28–41. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.001
20. Van Moortel L., Gevaert K., De Bosscher K. Improved glucocorticoid receptor ligands: fantastic beasts, but how to find them? Front Endocrinol (Lausanne) 2020;11:559673. DOI: 10.3389/fendo.2020.559673
21. Lesovaya E.A., Yemelyanov A.Y., Kirsanov K.I. et al. Antitumor effect of non-steroid glucocorticoid receptor ligand CpdA on leukemia cell lines CEM and K562. Biochemistry (Mosc) 2011;76(11):1242–52. DOI: 10.1134/S000629791111006X
22. Yemelyanov A., Czwornog J., Gera L. et al. Novel steroid receptor phyto-modulator Compound A inhibits growth and survival of prostate cancer cells. Cancer Res 2008;68(12):4763–73. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6104
23. Tanner T.M., Verrijdt G., Rombauts W. et al. Anti-androgenic properties of Compound A, an analog of a non-steroidal plant compound. Mol Cell Endocrinol 2003;201(1–2):155–64. DOI: 10.1016/s0303-7207(02)00411-2
24. Wüst S., Tischner D., John M. et al. Therapeutic and adverse effects of a non-steroidal glucocorticoid receptor ligand in a mouse model of multiple sclerosis. PLoS One 2009;4(12):e8202. DOI: 10.1371/journal.pone.0008202
25. Zhidkova E.M., Tilova L.R., Fetisov T.I. et al. Synthesis and anti-cancer activity of the novel selective glucocorticoid receptor agonists of the phenylethanolamine series. Int J Mol Sci 2024;25(16):8904. DOI: 10.3390/ijms25168904
26. Жидкова Е.М., Кузин К.А., Тилова Л.Р. и др. Сравнительный анализ биологических эффектов селективного агониста глюкокортикоидного рецептора CpdA на клеточные линии рака молочной железы различных молекулярных подтипов. Сибирский онкологический журнал 2017;16(6):41–6. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-6-41-46
Zhidkova E.M., Kuzin K.A., Tilova L.R. et al. Comparative analysis of biological effects of selective activator of the glucocorticoid receptor CpdA on different subtypes of breast cancer cell lines. Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology 2017;16(6): 41–6. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-6- 41-46
27. Lesovaya E., Yemelyanov A., Kirsanov K. et al. Combination of a selective activator of the glucocorticoid receptor Compound A with a proteasome inhibitor as a novel strategy for chemotherapy of hematologic malignancies. Cell Cycle 2013;12(1):133–44. DOI: 10.4161/cc.23048
28. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248–54. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
29. Chen Z., Lan X., Wu D. et al. Ligand-dependent genomic function of glucocorticoid receptor in triple-negative breast cancer. Nat Commun 2015;6:8323. DOI: 10.1038/ncomms9323
30. Tonsing-Carter E., Hernandez K.M., Kim C.R. et al. Glucocorticoid receptor modulation decreases ER-positive breast cancer cell proliferation and suppresses wild-type and mutant ER chromatin association. Breast Cancer Res 2019;21(1):82. DOI: 10.1186/s13058-019-1164-6
31. Neve R.M., Chin K., Fridlyand J. et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer Cell 2006;10(6):515–27. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.10.008
32. Wang Z., Frederick J., Garabedian M.J. Deciphering the phosphorylation “code” of the glucocorticoid receptor *in vivo*. J Biol Chem 2002;277(29):26573–80. DOI: 10.1074/jbc.M110530200
33. Baida G., Bhalla P., Kirsanov K. et al. REDD1 functions at the crossroads between the therapeutic and adverse effects of topical glucocorticoids. EMBO Mol Med 2015;7(1):42–58. DOI: 10.15252/emmm.201404601
34. Bou Malhab L.J., Nair V.A., Qaisar R. et al. Towards understanding the development of breast cancer: the role of rhoj in the obesity microenvironment. Cells 2024;13(2):174. DOI: 10.3390/cells13020174. DOI: 10.3390/cells13020174
35. Fritz G., Brachetti C., Bahlmann F. et al. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. Br J Cancer 2002;87(6):635–44. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600510
36. Obradovic M.M.S., Hamelin B., Manevski N. et al. Glucocorticoids promote breast cancer metastasis. Nature 2019;567(7749):540–4. DOI: 10.1038/s41586-019-1019-4

Вклад авторов
Е.М. Жидкова: выполнение ПЦР, подсчет клеток, анализ и интерпретация результатов, подготовка иллюстраций, написание текста статьи;
В.П. Максимова: проведение проточной цитофлуориметрии;
Д.Д. Григорьева: проведение вестерн-блоттинга;
В.З. Ширинян: проведение синтеза CpdA-03, подготовка иллюстраций, написание текста статьи;
М.Г. Якубовская: написание текста статьи;
Е.А. Лесовая: подготовка иллюстраций, написание текста статьи.
Authors' contributions
E.M. Zhidkova: performing PCR, counting cells, analyzing and interpreting the results, preparing illustrations, article writing;
V.P. Maksimova: conducting flow cytofluorimetry;
D.D. Grigoreva: conducting Western blotting;
V.Z. Shirinyan: carrying out the synthesis of CpdA-03, preparing illustrations, article writing;
M.G. Yakubovskaya: article writing;
E.A. Lesovaya: preparing illustrations, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors
Е.М. Жидкова / E.M. Zhidkova: https://orcid.org/0000-0003-3318-9391
В.П. Максимова / V.P. Maksimova: https://orcid.org/0000-0003-0896-2952
Д.Д. Григорьева / D.D. Grigoreva: https://orcid.org/0000-0003-2675-089X
В.З. Ширинян / V.Z. Shirinyan: https://orcid.org/0000-0001-9480-3565
М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: https://orcid.org/0000-0002-9710-8178
Е.А. Лесовая / E.A. Lesovaya: https://orcid.org/0000-0002-1967-9637

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

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

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики
Исследование одобрено 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 local biomedical ethics committees of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

Статья поступила: 20.08.2024. **Принята к публикации:** 15.09.2024. **Опубликована онлайн:** 09.10.2024.
Article submitted: 20.08.2024. **Accepted for publication:** 15.09.2024. **Published online:** 09.10.2024.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-103-113

BY 4.0

Механизмы лекарственной устойчивости к неоадъювантной химиотерапии при раке молочной железы

К.А. Алиев, Е.Ю. Зяблицкая, Т.П. Макалиш, Л.Е. Сорокина, Э.Р. Асанова

Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»; Россия, 295051 Симферополь, б-р Ленина, 5/7

Контакты: Евгения Юрьевна Зяблицкая *evgu79@mail.ru*

Введение. Динамические взаимоотношения между опухолевыми клетками и их микроокружением имеют решающее значение в развитии, прогрессировании злокачественного процесса и формировании лекарственной резистентности.

Цель исследования – изучить молекулярно-генетические характеристики опухолевого микроокружения и механизмы клеточной гибели при резистентном местно-распространенном раке молочной железы (РМЖ).

Материалы и методы. В исследование включены 48 пациенток с РМЖ T2–4N0–3M0–1 (средний возраст 55,6 ± 9,8 года) и 29 пациенток сопоставимого возраста с фиброаденомой молочной железы. Согласно дизайну работы больные разделены на группы: в 1-ю группу вошли женщины с РМЖ, резистентным к неоадъювантной химиотерапии (n = 23), во 2-ю – с РМЖ и полным ответом на неоадъювантную химиотерапию (n = 25), в контрольную – с фиброаденомой (n = 29). Экспрессию CD4+, CD8+, CD20+, CD68+, фактора некроза опухоли α (TNF-α), фактора роста эндотелия сосудов A (VEGF A), Ang-2, матриксной металлопротеиназы 12 (MMP-12), индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), bcl-2, p53 и CD95 оценивали с помощью иммуногистохимического метода.

Результаты. При фенотипировании иммунных клеток выявлены следующие различия: в ткани опухоли пациенток 1-й группы отмечено значимое снижение числа цитотоксических $CD8^+$-клеток по сравнению с тканью опухоли пациенток 2-й (p = 0,001) и контрольной (p = 0,032) групп, во 2-й группе –значимое увеличение числа $CD68^+$-клеток по сравнению с 1-й группой (p = 0,027). Цитокиновый профиль опухолевого микроокружения в 1-й группе характеризовался статистически значимой гиперэкспрессией TNF-α по сравнению со 2-й (p >0,001) и контрольной (p = 0,01) группами. В отношении апоптотических факторов отмечено значимое снижение экспрессии bcl-2 и p53 в 1-й группе по сравнению со 2-й группой (p = 0,001 и p = 0,02 соответственно).

Заключение. Представленные результаты могут послужить основой для создания диагностических алгоритмов, обладающих высокой предсказательной значимостью в отношении эффективности неоадъювантной химиотерапии, а также помочь в идентификации новых мишеней для обоснования применения комбинированных методов лечения РМЖ на ранних этапах.

Ключевые слова: рак молочной железы, неоадъювантная химиотерапия, лекарственная устойчивость, микроокружение опухоли

Для цитирования: Алиев К.А., Зяблицкая Е.Ю., Макалиш Т.П. и др. Механизмы лекарственной устойчивости к неоадъювантной химиотерапии при раке молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(3):103–13.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-103-113

Mechanisms of drug resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer

K.A. Aliev, E.Yu. Zyablitskaya, T.P. Makalish, L.E. Sorokina, E.R. Asanova

Order of the Red Banner of Labor of the Medical Institute named after S.I. Georgievsky, V.I. Vernadsky Crimean Federal University; 5/7 Lenina Bul'var, Simferopol 295006, Russia

Contacts: Evgenia Yur'evna Zyablitskaya *evgu79@mail.ru*

Introduction. The dynamic relationship between tumor cells and their microenvironment is critical in the development, and progression of the malignant process, and the formation of drug resistance.

Aim. To study the molecular genetic characteristics of the tumor microenvironment and the mechanisms of cell death in resistant locally advanced breast cancer.

Materials and methods. The study included 48 patients with breast cancer T2–4N0–3M0–1 (mean age 55.6 ± 9.8 years), and 29 patients of comparable age with breast fibroadenoma. According to the design of the study, patients were divided into groups: Group 1 included women with breast cancer resistant to neoadjuvant chemotherapy (n = 23), Group 2 – with breast cancer and a complete response to neoadjuvant chemotherapy (n = 25), control Group – with fibroadenoma (n = 29). The expression of markers CD4+, CD8+, CD20+, CD68+, tumor necrosis factor α (TNF-α), vascular endothelial growth factor A (VEGF A), Ang-2, matrix metalloproteinase 12 (MMP-12), inducible nitric oxide synthase (iNOS), bcl-2, p53, CD95 was assessed using immunohistochemistry.

Results. When phenotyping immune cells, the following differences were obtained: in the tumor tissue of patients in Group 1, a significant decrease in the number of cytotoxic CD8+ cells was noted compared to Group 2 (p = 0.001) and control (p = 0.032). In Group 2, a significant increase in the number of CD68+ cells was revealed in relation to Group 1 (p = 0.027). The cytokine profile of the tumor microenvironment in Group 1 is characterized by statistically significant overexpression of TNF-α compared to Group 2 (p >0.001) and the control Group (p = 0.01). With regard to apoptotic factors, noteworthy is the significant decrease in the expression of bcl-2 and p53 in Group 1 compared to Group 2 (p = 0.001 and p = 0.02 accordingly).

Conclusion. The presented results can serve as the basis for the creation of diagnostic algorithms that have predictive value regarding the effectiveness of NCT, and also to help identify new targets to justify the use of combined breast cancer treatments in the early stage.

Keywords: breast cancer, non-adjuvant chemotherapy, drug resistance, tumor microenvironment

For citation: Aliev K.A., Zyablitskaya E.Yu., Makalish T.P. et al. Mechanisms of drug resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(3):103–13. (In Russ.).

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-103-113

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные новообразования молочной железы по-прежнему занимают ведущие позиции в структуре онкопатологии среди женщин всего мира [1, 2]. Медико-социальная значимость проблемы рака молочной железы (РМЖ) продиктована ростом заболеваемости, высокими показателями инвалидизации и смертности, в том числе среди женщин молодого возраста. Несмотря на раннюю диагностику, основной причиной, обусловливающей высокие показатели летальных исходов, является прогрессирование заболевания на разных этапах онкологического процесса на фоне безуспешной или недостаточно эффективной терапевтической стратегии [3]. Известно, что для РМЖ характерна высокая гетерогенность как опухолевых клеток, так и их клеточного микроокружения, что, в свою очередь, может способствовать развитию лекарственной резистентности опухоли и повышению ее метастатического потенциала [4].

Результаты исследований последних лет показали, что вариабельность клеточного состава и функциональная активность клеток, инфильтрирующих строму опухоли, могут выступать в качестве ключевых факторов регуляции развития злокачественного процесса [5]. Согласно данным литературы, в процессе формирования ландшафта опухоли участвуют клетки (макрофаги, дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты) [6], сигнальные молекулы (синтазы оксида азота) [7], ростовые факторы (фактор роста эндотелия сосудов А (VEGF-A), Ang-2) [8], хемокины и цитокины (фактор некроза опухоли α, TNF-α) [9], ферменты (матриксная металлопротеиназа 12, MMP-12) [10], выполняющие роль метаболических регуляторов и обеспечивающие миграцию, инвазию, ангиогенез и модуляцию динамического взаимодействия всех звеньев канцерогенеза. Большая роль в опухолевой прогрессии и формировании лекарственной резистентности также отводится онкобелкам и гликопротеинам (bcl-2, Fas/APO (CD95), p53) [11]; изменение их экспрессии может способствовать снижению эффективности иммунного надзора и препятствовать апоптотической гибели опухолевых клеток.

Роль указанных маркеров при РМЖ исследуется давно, однако опубликованные результаты фрагментарны, о механизмах развития лекарственной резистентности нет единого мнения. При этом в случае определения молекулярно-генетических характеристик опухолевого микроокружения наиболее оправданными и информативными становятся многопараметрические иммуногистохимические (ИГХ) методы, которые позволяют определить взаиморасположение популяций клеток, что является важным фактором изучения межклеточных взаимодействий в канцерогенезе. Таким образом, комплексная детекция целевых биомаркеров опухоли и ее микроокружения может открыть новые терапевтические точки приложения и предложить новые тактические подходы для увеличения периода ремиссии и долгосрочной выживаемости пациенток с РМЖ [12].

Цель исследования – изучить молекулярно-генетические характеристики опухолевого микроокружения и механизмы клеточной гибели при резистентном местно-распространенном РМЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 48 пациенток с РМЖ T2–4N0–3M0–1 (средний возраст 55,6 ± 9,8 года) и 29 пациенток сопоставимого возраста с фиброаденомой, наблюдавшихся с 2020 по 2023 г. в Крымском республиканском онкологическом клиническом диспансере им. В.М. Ефетова. Согласно дизайну работы больные разделены на группы: в 1-ю группу вошли женщины с РМЖ, резистентным к неоадъювантной химиотерапии (НХТ) ($n = 23$), во 2-ю – с РМЖ и полным ответом на НХТ ($n = 25$), в контрольную – с фиброаденомой ($n = 29$). Обследование пациенток до начала терапии было стандартным. Использовали визуализирующие методы исследования структуры молочной железы (маммографию, ультразвуковое исследование, эластографию, маммолимфосцинтиграфию) и морфологическую верификацию изменений на тканевом уровне при микроскопии трепанобиоптатов с последующим ИГХ-анализом данных образцов.

В неоадъювантном режиме пациенткам проводили химиотерапию по схеме FAC (5-фторурацил в дозе 500 мг/м^2, доксорубицин в дозе 50 мг/м^2, циклофосфамид в дозе 500 мг/м^2). После НХТ выполняли операцию в объеме радикальной мастэктомии, радикальной резекции или секторальной резекции с аксиллярной лимфаденэктомией. Эффективность НХТ оценивали по результатам клинических, инструментальных и морфологических исследований, согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения.

Исследования проводили в Центральной научно-исследовательской лаборатории Медицинского института им. С.И. Георгиевского Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. Изучали фрагменты тканей первичного очага опухоли, полученные на разных этапах лечения. Кусочки ткани после фиксации, обезвоживания и стандартной проводки заливали в парафиновые блоки согласно инструкциям производителя рекомендованного гистологического оборудования фирмы Leica (Германия). Мы изучили с помощью ИГХ-метода экспрессию следующих опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток: CD4+- и CD8+-Т-лимфоцитов, CD20+-В-лимфоцитов и CD68+-макрофагов. Также исследовали экспрессию цитокина TNF-α, VEGF-A и Ang-2, MMP-12, маркера гипоксии индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), факторов онкогенеза и апоптоза (bcl-2, p53, CD95).

Иммуногистохимический анализ выполнен с использованием стейнера Bond-MAX (Leica Biosystems Melbourne Pty Ltd., Австралия). Парафиновые срезы толщиной 4 мкм помещали на высокоадгезивные стекла и окрашивали по протоколу, соответствующему каждому антителу (CD4 (clone 4B12, Leica, Великобритания), CD8 (clone YN00246m, Elabscience, США; разведение 1:200), CD20 (clone L26, Leica, Великобритания; разведение 1:100), CD68 (clone 125212, Abcam, США; разведение 1:100), TNF-α (clone 220210, Abcam, США; разведение 1:100), VEGF A (clone RB-9031-P1, Thermo Scientific, Великобритания; разведение 1:100), Ang-2 (clone 8452, Abcam, США; разведение 1:100), MMP-12 (clone 137443, Abcam, США; разведение 1:500), iNOS (clone 230456, Abcam, США; разведение 1:100), bcl-2 (clone BCL-2/100/D5, Leica, Великобритания; разведение 1:100), p53 (clone DO-7, Leica, Великобритания; разведение 1:200), CD95 (clone 13/Fas, BD Biosciences, США; разведение 1:100)), с системой визуализации Bond Polymer Refine Detection Systems (Leica Biosystems, Великобритания). Протокол реакции включал этапы депарафинизации, высокотемпературной демаскировки в буферном растворе, подавления эндогенной пероксидазы перекисью водорода, инкубации с первичным, вторичным и третичным антителами, меченными полимером, и окрашивания ядер гематоксилином (табл. 1). Использованы протоколы постановки реакции, рекомендованные производителями соответствующих клонов антител.

Таблица 1. *Характеристика антител и особенности протоколов реакции*

Table 1. *Characteristics of antibodies and features of reaction protocols*

Антитело Antibody	Клон Clon	Производитель Manufacturer	Разведение Dilution	Демаскировка, pH (мин) Retrieval, pH (min)	Инкубация, мин Incubation, min
CD4	4B12	Leica, Великобритания	–	6,0 (20)	15
CD8	YN00246m	Elabscience, США	1:200	9,0 (20)	15
CD20	L26	Leica, Великобритания	1:100	9,0 (20)	15
CD68	125212	Abcam, США	1:100	9,0 (20)	15
TNF-α	220210	Abcam, США	1:100	6,0 (30)	15
VEGF A	RB-9031-P1	Thermo Scientific, Великобритания	1:100	6,0 (30)	15
Ang-2	8452	Abcam, США	1:100	6,0 (20)	15
MMP12	137443	Abcam, США	1:500	6,0 (30)	15

Окончание табл. 1
End of table 1

Антитело Antibody	Клон Clon	Производитель Manufacturer	Разведение Dilution	Демаскировка, pH (мин) Retrieval, pH (min)	Инкубация, мин Incubation, min
iNOS	230456	Abcam, США	1:100	6,0 (30)	15
bcl-2	BCL-2/100/D5	Leica, Великобритания	1:100	6,0 (30)	15
P53	DO-7	Leica, Великобритания	1:200	6,0 (20)	15
CD95	13/Fas	BD Biosciences, США	1:100	6,0 (20)	15

Примечание. *TNF-α – фактор некроза опухоли α; VEGF A – фактор роста эндотелия сосудов А; MMP-12 – металлопротеиназа 12; iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота.*
Note. *TNF-α – tumor necrosis factor α; VEGF A – vascular endothelial growth factor A; MMP-12 – metalloproteinase 12; iNOS – inducible nitric oxide synthase.*

Препараты заключали под покровное стекло и просматривали под микроскопом Leica DM2000 (Leica Microsystems, Германия). Интенсивность окрашивания оценивали не менее чем в 10 полях зрения в каждом случае. Для маркеров дифференцировки лимфоцитов, а также bcl-2, p53 и iNOS подсчитывали абсолютное число положительно окрашенных клеток в поле зрения, для TNF-α, VEGF A, Ang-2, MMP12 и CD95 – процент окрашенных клеток в поле зрения и интенсивность окрашивания по 4-балльной шкале от 0 до 3 (0 баллов – отсутствие окрашивания, 1 балл – окрашивание слабой интенсивности, 2 балла – окрашивание средней интенсивности, 3 балла – интенсивное окрашивание), а также абсолютное количество положительно окрашенных клеток.

Статистический анализ выполнен с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Нормальное распределение ввиду малой выборки оценивали по критериям Шапиро–Уилка. Сравнительный анализ выполнен с использованием точного теста Фишера. Взаимосвязь между показателями оценивали методом ранговой корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общая характеристика больных РМЖ представлена в табл. 2.

При проведении ИГХ-исследования образцов ткани молочной железы пациенток трех обследуемых групп выявлены особенности параметров иммунитета

Таблица 2. *Общая характеристика пациенток с раком молочной железы, абс. (%)*
Table 2. *General characteristics of patients with breast cancer, abs. (%)*

Параметр Parameter	Группа 1 (n = 23) Group 1 (n = 23)	Группа 2 (n = 25) Group (n = 25)
Размер опухоли (T): Tumor size (T):		
T1	2 (8,7)	5 (20,0)
T2	18 (78,3)	11 (44,0)
T3	1 (4,3)	4 (16,0)
Tx	2 (8,7)	5 (20,0)
Наличие регионарных метастазов (N): Presence of regional metastases (N):		
N0	6 (26,1)	5 (20,0)
N1	9 (39,1)	10 (40,0)
N2	7 (30,4)	8 (32,0)
N3	1 (4,4)	2 (8,0)
Стадия заболевания: Disease stage:		
IIA	8 (34,8)	5 (20,0)
IIB	7 (30,4)	9 (36,0)
IIIA	7 (30,4)	9 (36,0)
IIIC	1 (4,4)	2 (8,0)

Окончание табл. 2
End of table 2

Параметр Parameter	**Группа 1 (*n* = 23)** Group 1 (*n* = 23)	**Группа 2 (*n* = 25)** Group (*n* = 25)
Степень злокачественности (G): Grade of malignancy (G):		
G_2	3 (13,0)	7 (28,0)
G_3	20 (87,0)	18 (72,0)
Экспрессия рецептора эстрогена α (ERα): Expression of estrogen receptor (ERα):		
ERα+	6 (26,1)	6 (24,0)
ERα–	17 (73,9)	19 (76,0)
Экспрессия рецепторов прогестерона (PR): Expression of progesterone receptors (PR):		
PR+	5 (21,7)	9 (36,0)
PR–	18 (78,3)	16 (64,0)
Экспрессия рецепторов эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2): Expression of human epidermal growth factor 2 receptors (HER2):		
HER2+	6 (26,1)	6 (24,0)
HER2–	17 (73,9)	19 (76,0)

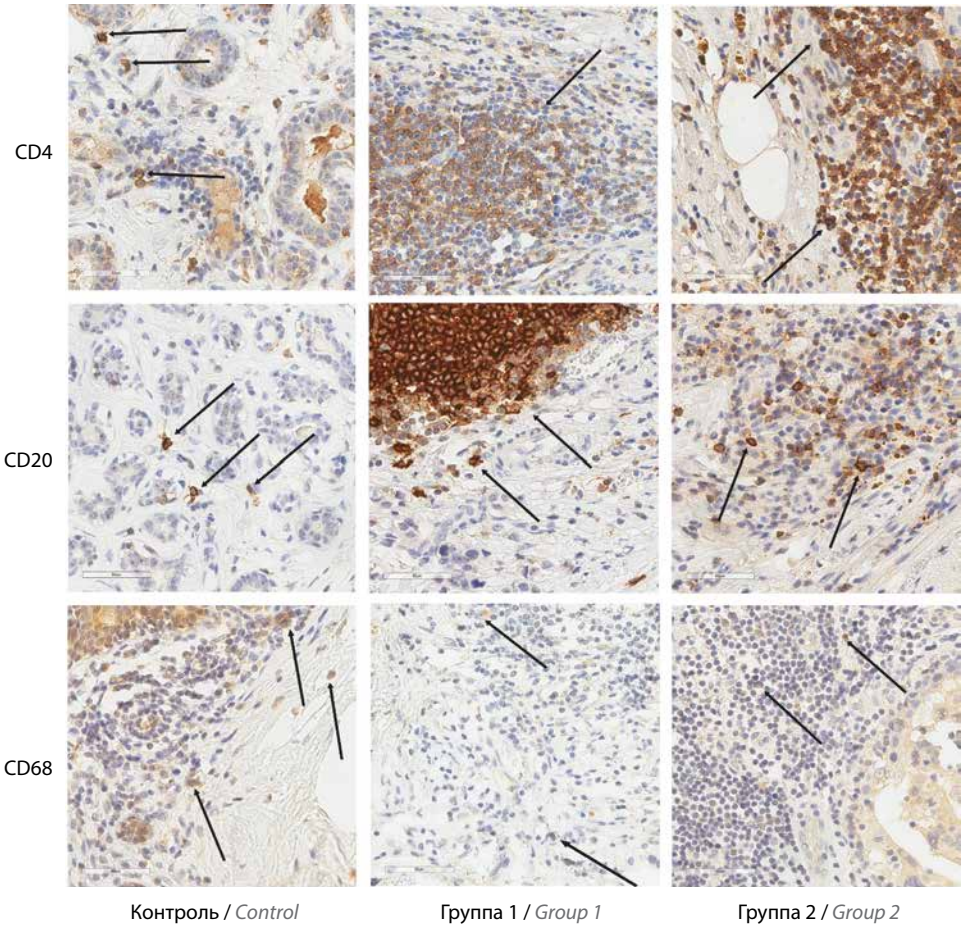


Рис. 1. *Экспрессия маркеров дифференцировки лимфоцитов в контрольной и экспериментальных группах. Стрелками указаны положительно окрашенные клетки*
Fig. 1. *Expression of lymphocyte differentiation markers in the control and experimental groups. The arrows indicate positively stained cells*

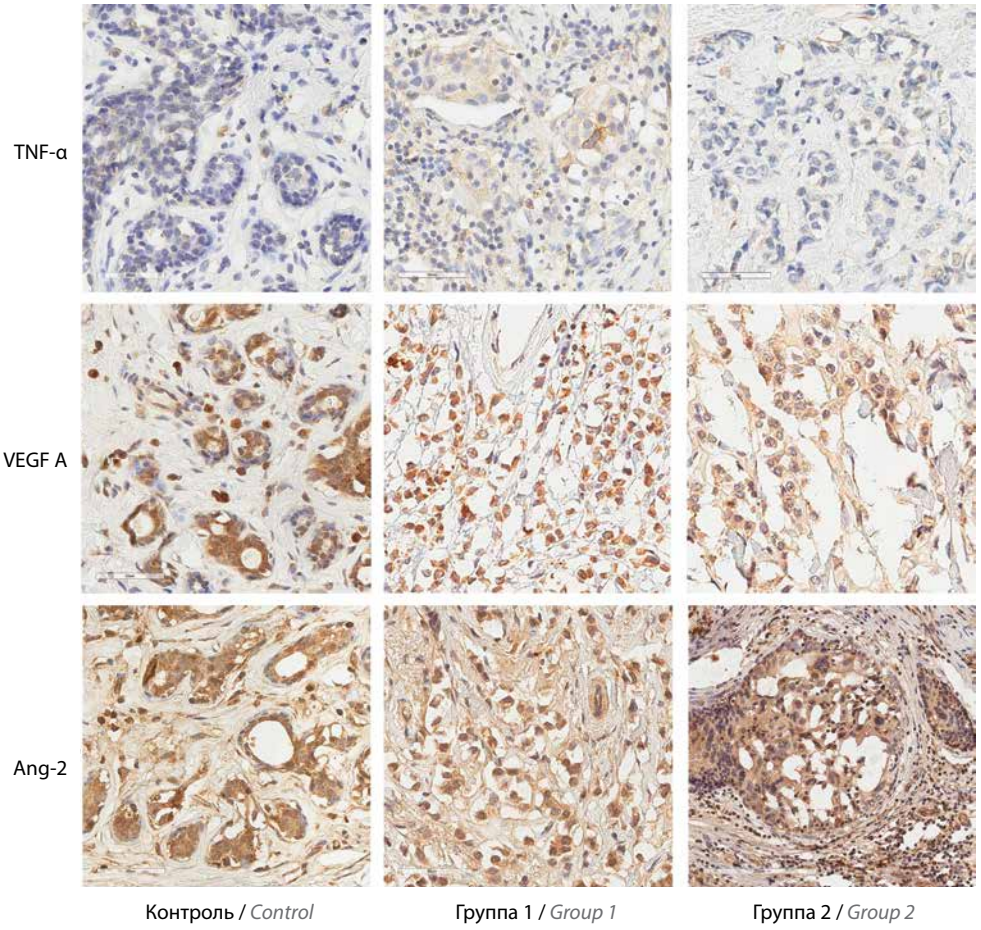


Рис. 2. *Экспрессия маркеров ангиогенеза и фактора некроза опухоли α в ткани молочной железы женщин контрольной и экспериментальных групп. Стрелками указаны положительно окрашенные клетки. TNF-α – фактор некроза опухоли α; VEGF A – фактор роста эндотелия сосудов А*
Fig. 2. *Expression of angiogenesis markers and tumor necrosis factor α in breast tissue of women from the control and experimental groups. The arrows indicate positively stained cells. TNF-α – tumor necrosis factor α; VEGF A – vascular endothelial growth factor A*

в зависимости от степени ответа на НХТ. Количество неактивированных В-лимфоцитов (CD20+) в группе контроля редко превышало 5 клеток в поле зрения. Для пациенток 1-й и 2-й групп установлена следующая зависимость: в строме опухоли популяция В-лимфоцитов малочисленна, в то время как в зоне демаркации, в лимфоидных скоплениях количество CD20+-клеток превышало контрольные значения, достигая максимума в группе резистентных форм РМЖ (рис. 1). Т-хелперы (CD4+) образовывали скопления в лимфоидных узелках, сформированных в демаркационной зоне больных 1-й и 2-й групп. Представленность CD4+ в строме опухоли экспериментальных групп не имела значимых различий и соответствовала показателям пациенток контрольной группы (см. рис. 1). Отмечено также достоверное снижение уровня Т-киллеров (CD8+) как в строме опухоли, так и в демаркационной зоне в 1-й группе по сравнению со 2-й ($p = 0,001$) и контрольной ($p = 0,032$) группами. Наиболее распространенными во всех группах оказались клетки макрофагальной линии, идентифицируемые в ходе ИГХ-анализа с помощью антител к CD68+. В группе контроля их количество в среднем составило 5 (4–6) клеток в поле зрения (см. рис. 1). В 1-й и 2-й группах в участках зоны демаркации и условно здоровой ткани за границами опухоли количество макрофагов было значительно меньше. При этом макрофагальная популяция оказалась больше во 2-й группе по сравнению с 1-й группой ($p = 0,027$).

Интенсивность экспрессии TNF-α различалась в зависимости от группы и исследуемого участка ткани. В ткани пациенток контрольной группы TNF-α-положительными в среднем оказались 10 % клеток стромы и 30 % железистых клеток (рис. 2). Во 2-й группе (у пациенток с полным ответом на НХТ) уровень экспрессии TNF-α в стромальных клетках (макрофагах, эндотелиоцитах, адипоцитах) не отличался от этого показателя в группе контроля. В 1-й же группе (у больных с резистентными формами РМЖ) уровень экспрессии этого биомаркера в образцах ткани был достоверно выше по сравнению со 2-й ($p > 0,001$) и контрольной ($p = 0,01$) группами.

В отношении сосудистых факторов получены следующие данные: эпителий молочной железы в ткани

пациенток с фиброаденомой характеризуется высоким уровнем экспрессии VEGF A и Ang-2 (см. рис. 2). В строме насчитывается в среднем 22 (16–28) VEGF A+-клетки в поле зрения, 1/4 из которых составляют эндотелиоциты кровеносных сосудов. Несколько выше экспрессия Ang-2 в строме молочной железы – 39 (26–42) клеток в поле зрения. В группах пациенток с РМЖ интенсивность экспрессии в опухолевых и в здоровых клетках снижается как по яркости окрашивания, так и по числу окрашенных клеток. Также в строме опухолевой и условно здоровой ткани достоверно уменьшалось количество VEGF A+-клеток. Экспрессия Ang-2 в резистентной ткани пациенток экспериментальных групп была значительно повышена как в эндотелиоцитах, так и в опухолевой строме по сравнению с этим показателем в здоровой ткани.

При оценке уровня MMP-12 в здоровом эпителии выявлена его экспрессия средней интенсивности более чем в 60 % клеток. В группе полного ответа на терапию наблюдалась тенденция к снижению интенсивности экспрессии, а резистентный РМЖ, наоборот, экспрессировал MMP-12 сильнее, однако различия не были статистически значимыми. Количество здоровых клеток, экспрессирующих iNOS, составило в среднем 6 (5–7) эпителиоцитов в поле зрения (рис. 3). В строме количество iNOS-положительных клеток оказалось в 2 раза ниже. В 1-й и 2-й группах их количество в строме и эпителии оказалось значительно меньше, независимо от лечения ($p = 0{,}029$ и $p = 0{,}040$ соответственно). Экспрессия апоптотического маркера FAS в эпителии и строме здоровой и опухолевой тканей не имела значимых различий. В единичных случаях у пациенток с РМЖ, резистентным к НХТ, наблюдалось снижение экспрессии данного маркера. Антиапоптотический фактор bcl-2 экспрессировался в большинстве эпителиоцитов ткани группы контроля (в среднем 410 (324–516) клеток в поле зрения), а также в клетках стромы (50 (40–66) клеток в поле зрения). В 1-й и 2-й группах наблюдалось статистически значимое снижение экспрессии bcl-2 как в эпителии, так и в строме опухоли и условно здоровой ткани (см. рис. 3). При этом в 1-й группе данная особенность оказалась более выраженной по сравнению со 2-й группой ($p = 0{,}001$). Антионкогенный p53 умеренно экспрессировался в ядрах нормальных эпителиоцитов (25 (21–37) клеток в поле

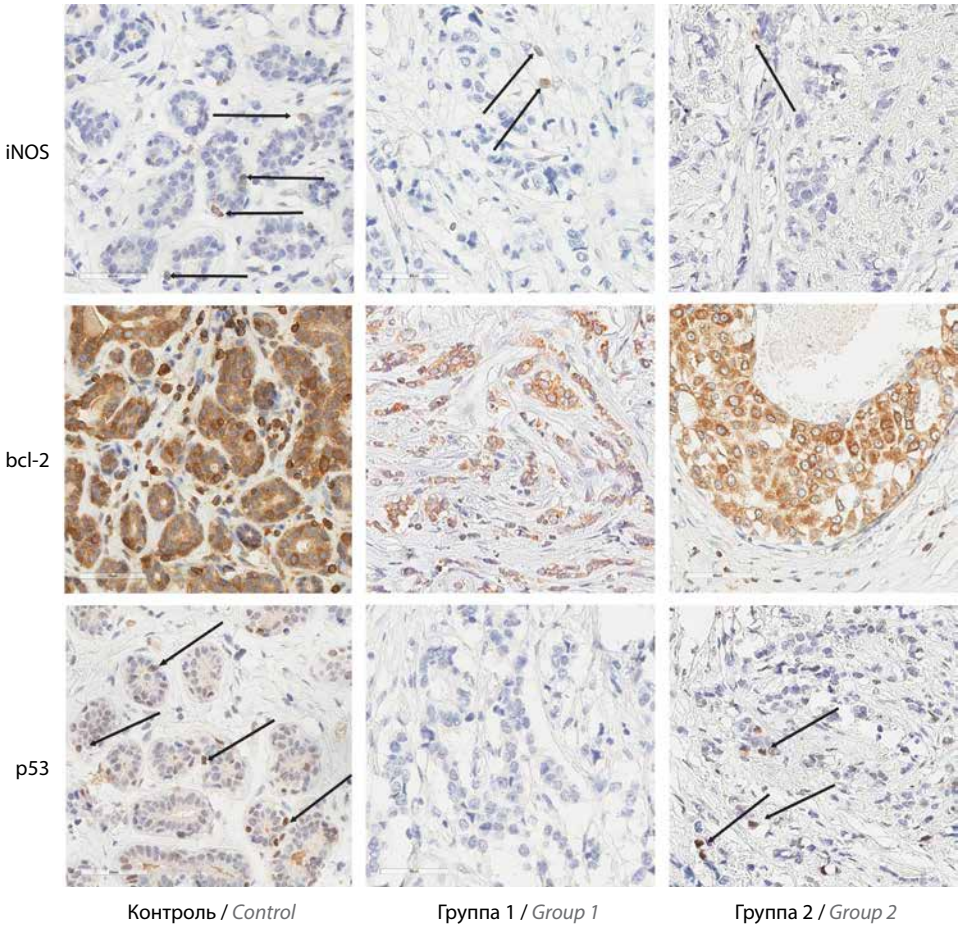


Рис. 3. *Экспрессия индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), bcl-2 и p53 в ткани опухоли молочной железы и в контрольной группе. Стрелками указаны положительно окрашенные клетки*

Fig. 3. *Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), bcl-2 and p53 markers in breast tumor tissue and in the control group. The arrows indicate positively stained cells*

зрения) и отсутствовал в клетках стромы. В опухолевой ткани уровень экспрессии p53 снижался, особенно при резистентных формах РМЖ по сравнению с РМЖ с полным ответом на НХТ ($p = 0,02$). При этом в участках условно здоровой ткани в группах с ответом на НХТ и резистентных к ней p53 детектировался только в эпителиоцитах и также статистически значимо меньше, чем в ткани контрольной группы ($p = 0,004$).

В ходе корреляционного анализа выявлены значимые связи различной силы и направленности между экспрессией маркеров. Так, CD4+- и CD8+-клетки в ткани опухоли РМЖ характеризовались положительными корреляционными взаимосвязями с маркерами MMP-12 (r = 0,510), iNOS (r = 0,493), p53 (r = 0,656), bcl-2 (r = 0,590) и VEGF A (r = 0,457). Экспрессия VEGF A в строме опухоли и здоровой ткани имела положительные связи с уровнями MMP-12 (r = 0,680 и r = 0,558 соответственно) и TNF-α (r = 0,491 и r = 0,579 соответственно). Аналогичная ассоциация выявлена для TNF-α и Ang-2 (r = 0,497 и r = 0,619 соответственно). Повышение интенсивности экспрессии FAS в строме условно здоровой ткани опухолевых образцов имело обратные корреляционные связи с Ang-2 (r = –0,539), MMP12 (r = –0,523), TNF-α (r = –0,493) и iNOS (r = –0,563). При этом экспрессия iNOS, VEGF A, Ang-2, MMP-12 и TNF-α в опухолевой ткани была положительно связана с количеством FAS+-клеток и интенсивностью экспрессии этого белка в эпителии опухоли. Ang-2 и MMP-12 в строме опухоли ассоциированы с экспрессией p53 в опухолевых клетках (r = 0,512 и r = 0,503 соответственно). Аналогичная ассоциация экспрессии p53 и TNF-α (r = 0,510) и MMP-12 (r = 0,672) отмечена в контрольных образцах. Антиапоптотический белок bcl-2 в строме ткани железы имел связь с Ang-2 (r = 0,714), MMP-12 (r = 0,742) и TNF-α (r = 0,663).

ОБСУЖДЕНИЕ

В современной литературе содержится много данных о взаимосвязи механизмов лекарственной резистентности и аберрантной активации ростовых факторов, цитокинов, ферментов, дерегуляцией экспрессии их рецепторов, сигнальных каскадов, мутациями в онкогенах и генах-супрессорах опухолей [5]. Мы изучили молекулярно-генетические характеристики опухолевого микроокружения и механизмы клеточной гибели при резистентном РМЖ. Полученные данные позволили выделить как минимум 2 значимых звена в процессе формирования лекарственной устойчивости опухоли.

Первый механизм, вероятно, связан с подавлением иммунного ответа и формированием провоспалительного профиля микроокружения опухоли. Мы выявили, что отсутствие ответа на НХТ сопряжено со смещением соотношения субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4+/CD8+) в сторону снижения цитотоксических CD8+-клеток и повышения экспрессии TNF-α. Т-клеточный иммунитет является одним из компонентов противоопухолевой защиты [13], дефицит пула CD8+-клеток в ткани резистентных форм РМЖ говорит об уклонении опухоли от иммунного надзора. Схожие данные получены и другими авторами [14, 15], выявившими, что значительная инфильтрация лимфоцитами опухоли молочной железы связана с более высокой вероятностью полного ответа на НХТ, а для ткани железы после завершения курсов терапии характерно повышенное соотношение уровней экспрессии CD8+ и CD4+, а также рост гранзима B, стимулятора пироза и апоптоза клеток карциномы при РМЖ. Результаты исследования ИГХ-статуса тканей пациенток с РМЖ показали положительную зависимость эффективности терапии антрациклином и таксанами от наличия в опухолевом микроокружении опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов Foxp3+ и CD8+ [16]. Фактор некроза опухоли α также участвует в механизмах опухоль-супрессивных эффектов иммунных клеток. Такая стимуляция провоспалительного профиля микроокружения опухоли связана с модулированием иммунного ответа и необходимостью поддержания оптимального соотношения CD4+- и CD8+-клеток и является важной задачей повышения эффективности терапии РМЖ [17]. Большая роль в реализации иммунного противоопухолевого ответа принадлежит и опухолеассоциированным макрофагам. В ходе исследований тканей опухоли РМЖ трижды негативного иммунофенотипа не выявлено значимых корреляций CD68+ с общей и безрецидивной выживаемостью. При этом высокая плотность CD68+ в инвазивном РМЖ напрямую связана со снижением показателей общей выживаемости [18]. Эти данные свидетельствуют о вовлеченности CD68+ в супрессивный тип ответа. В нашем исследовании выраженность CD68+-инфильтрации опухоли у больных с резистентной формой РМЖ не отличалась от таковой у пациенток контрольной группы, тогда как у женщин с ответом на лечение она была существенно выше. В целом из-за высокой гетерогенности популяции CD68+-клеток их прогностическое значение при РМЖ не до конца ясно.

Второй механизм возникновения резистентности опухоли к химиотерапии, идентифицированный в нашем исследовании, проявляется в виде ухода клеток от апоптоза (повышение уровня bcl-2 и снижение уровня FAS) и блокировки ферментов клеточного метаболизма (p53).

Программируемая гибель опухолевых клеток может быть индуцирована по внешнему и внутреннему путям. Применяемые препараты могут действовать через рецептор-лигандную систему CD95 (Fas/APO-1) [19]. Взаимодействие Fas-лиганда с экстрацеллюлярным доменом Fas-рецептора, активируя каспазу 8 в опухолевой клетке, запускает механизм клеточной гибели по внешнему пути. Отсутствие экспрессии CD95-рецептора в клетках является еще одним механизмом ухода от иммунного надзора, приводящего к блокиро-

ванию апоптоза [20]. Цитотоксические препараты и лучевая терапия также могут способствовать активации внутреннего пути апоптоза, ассоциированного с каспазой 9 [21]. Наиболее изученными белками, участвующими в управлении данным процессом, являются продукты протоонкогена bcl-2 и гена-супрессора опухолевого роста *p53*. Продемонстрировано, что повышенная экспрессия bcl-2 зачастую связана с люминальными типами РМЖ, а его ингибирование повышает эффективность химиотерапевтических агентов [22–24]. В ходе нашего исследования мы не выявили статистических корреляций и различий между группами в зависимости от рецепторного статуса ER-α/PR (PR – рецептор прогестерона), однако, по нашему мнению, это перспективное направление дальнейшей работы при существенном увеличении выборки.

Белок p53 также играет большую роль в регуляции опухолевого ландшафта; его дисфункция может быть еще одной причиной гиперэкспрессии TNF-α у пациенток с резистентным к НХТ РМЖ [25]. Важно учесть, что мы не изучали мутации гена *p53*, но данный фактор, несомненно, влияет на способ ответа опухоли на НХТ. Результаты нашего исследования демонстрируют преимущественно отрицательный ИГХ-статус экспрессии данного белка в опухолевой ткани пациенток с отсутствием эффекта от НХТ и положительный ИГХ-статус у больных с адекватным лечебным патоморфозом.

Важно отметить также различную динамику сосудистых факторов: для VEGF A, не зависящего от ответа опухоли на терапию, характерно снижение активности вследствие ее эффекта, а для Ang-2 – уменьшение экспрессии в резистентных очагах. Таким образом, в чувствительном к терапии очаге уровень экспрессии Ang-2 больше, чем VEGF A, а в резистентном – наоборот, что подтверждается результатами работ других исследователей онкоангиопоэза [26].

В целом наблюдается закономерность в ослаблении выявленных взаимосвязей между экспрессией различных маркеров в опухолевой ткани по сравнению с неопухолевой. Обращает на себя внимание снижение числа связей (их потеря). В отдельных случаях (с FAS-рецептором) наблюдается инверсия ассоциации: в неопухолевой ткани она отрицательная (обратная), а в опухоли становится положительной (прямой). Выявлено наибольшее количество связей с маркерами сосудистого роста, отвечающими за метаболизм клетки (p53, iNOS) и структуру ткани (MMP-12, TNF-α), что может свидетельствовать о дисбалансе в сигнальных взаимодействиях внутри опухолевой ткани и с ее микроокружением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лекарственная резистентность при РМЖ обусловлена многими факторами: 1) истощением пула эффекторных противоопухолевых клеточных популяций, в частности Т-цитотоксических клеток; 2) формированием вокруг опухоли провоспалительной микросреды посредством «манипулирования» цитокинами; 3) нарушением программ гибели опухолевых клеток; 4) активацией пути ангиогенеза, зависимого от Ang-2. Полученные результаты могут служить основой для создания диагностических алгоритмов, обладающих предиктивной значимостью в отношении эффективности НХТ, а также в будущем помочь идентифицировать мишени для новых методов комбинированного лечения РМЖ, например с иммунотерапией, применением промоторов внутреннего пути активации апоптоза, ингибиторов Ang-2-зависимого ангиогенеза.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2019 г. (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, 2020. 252 с. Malignant tumors in Russia in 2019 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, A.O. Shahzadova. Mocsow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU "NMITS radiologii" Minzdrava Rossii, 2020. 252 p. (In Russ.).
2. Siegel R.L., Miller K.D., Wagle N.S., Jemal A. Cancer statistics, 2023. CA Cancer J Clin 2023;73(1):17–48. DOI: 10.3322/caac.21763
3. Carioli G., Malvezzi M., Rodriguez T. et al. Trends and predictions to 2020 in breast cancer mortality in Europe. Breast 2017;36:89–95. DOI: 10.1016/j.breast.2017.06.003
4. Caswell-Jin J.L., Lorenz C., Curtis C. Molecular heterogeneity and evolution in breast cancer. Ann Rev Cancer Biol 2021;5(1):79–94. DOI: 10.1146/annurev-cancerbio-060220- 014137
5. Зяблицкая Е.Ю., Кубышкин А.В., Сорокина Л.Е. и др. Клеточное микроокружение как объект таргетной терапии злокачественных новообразований. Успехи молекулярной онкологии. 2023;10(4):8–20. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-4-8-20 Zyablitskaya E.Yu, Kubyshkin A.V., Sorokina L.E. et al. Cellular microenvironment as an object of targeted therapy for malignant neoplasms. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2023;10(4):8–20. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-4-8-20
6. Badr N.M., McMurray J.L., Danial I. et al. Characterization of the immune microenvironment in inflammatory breast cancer using multiplex immunofluorescence. Pathobiology 2023;90(1):31–43. DOI: 10.1159/000524549
7. Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Кривошеева Л.В. и др. Экспрессия iNOS и биосинтез метаболитов оксида азота при росте опухолей различного гистогенеза. Успехи молекулярной онкологии 2016;3(3):73–80. DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-73-80 Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Krivosheeva L.V. et al. iNOS expression and biosynthesis of nitric oxide metabolites in the course of tumor growth of different histogenesis. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2016;3(3):73–80. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-73-80
8. Danza K., Pilato B., Lacalamita R. et al. Angiogenetic axis angiopoietins/Tie2 and VEGF in familial breast cancer. Eur J Hum Genet 2013;21(8):824–30. DOI: 10.1038/ejhg.2012.273

9. Laha D., Grant R., Mishra P., Nilubol N. The role of tumor necrosis factor in manipulating the immunological response of tumor microenvironment. Front Immunol 2021;12:656908. DOI: 10.3389/fimmu.2021.656908
10. Kwon M.J. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in breast cancer. Front Oncol 2023;12:1108695. DOI: 10.3389/fonc.2022.1108695
11. Williams M.M., Cook R.S. Bcl-2 family proteins in breast development and cancer: could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance? Oncotarget 2015;6(6):3519–30. DOI: 10.18632/oncotarget.2792
12. Galván Morales M.A., Barrera Rodríguez R., Santiago Cruz J.R., Teran L.M. Overview of new treatments with immunotherapy for breast cancer and a proposal of a combination therapy. Molecules 2020;25(23):5686. DOI: 10.3390/molecules25235686
13. Ribatti D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. Oncotarget 2017;8(4):7175–80. DOI: 10.18632/oncotarget.12739
14. Denkert C., Loibl S., Noske A. et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. J Clin Oncol 2010;28(1):105–13. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.7370
15. Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science 2011;331(6024):1565–70. DOI: 10.1126/science.1203486
16. West N.R., Milne K., Truong P.T. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. Breast Cancer Res 2011;13(6):R126. DOI: 10.1186/bcr3072
17. Seo A.N., Lee H.J., Kim E.J. et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. Br J Cancer 2013;109(10):2705–13. DOI: 10.1038/bjc.2013.634
18. Jamiyan T., Kuroda H., Yamaguchi R. et al. CD68- and CD163-positive tumor-associated macrophages in triple-negative cancer of the breast. Virch Arch 2020;477(6):767–75. DOI: 10.1007/s00428-020-02855-z
19. Соколовская А.А., Заботина Т.Н., Палкина Т.Н., Блохин Д.Ю. Возможное участие CD95(Apo-1/Fas)/CD95L в лекарственно-индуцированном апоптозе. Российский биотерапевтический журнал 2004;3(3):6–11.
Sokolovskaya A.A., Zabotina T.N., Palkina T.N., Blokhin D.Yu. Possible involvement of CD95(Apo-1/Fas)/CD95L in drug-induced apoptosis. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal 2004;3(3):6–11. (In Russ.).
20. Müschen M., Moers C., Warskulat U. et al. CD95 ligand expression as a mechanism of immune escape in breast cancer. Immunology 2000;99(1):69–77. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2000.00921.x
21. Стукань А.И., Горяинова А.Ю., Чухрай О.Ю. и др. Иммунное опухолевое микроокружение и маркеры апоптоза при раке молочной железы у носительниц наследственных мутаций в гене *BRCA1*. Опухоли женской репродуктивной системы 2022;18(2):29–39. DOI: 10.17650/1994-4098-2022-18-2-29-39
Stukan A.I., Goryainova A.Yu., Chukhray O.Yu. et al. Tumor immune microenvironment and apoptotic markers in breast cancer patients carrying *BRCA1* gene mutations. Opuholi zhenskoy reproduktivnoy sistemy = Tumors of Female Reproductive System 2022;18(2):29–39. (In Russ.).
DOI: 10.17650/1994-4098-2022-18-2-29-39
22. Dawson S.J., Makretsov N., Blows F.M. et al. BCL2 in breast cancer: a favorable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. Br J Cancer 2010;103(5):668–75.
23. Honma N., Horii R., Ito Y. et al. Differences in clinical importance of Bcl-2 in breast cancer according to hormone receptors status or adjuvant endocrine therapy. BMC Cancer 2015;15:698. DOI: 10.1186/s12885-015-1686-y
24. Nguyen C.V., Nguyen Q.T., Vu H.T. Combined p53 and Bcl-2 immunopheno-types in the prognosis of Vietnamese invasive breast carcinoma: a single institutional retrospective analysis. Technol Cancer Res Treat 2020;19:1533033820983081. DOI: 10.1177/1533033820983081
25. Blagih J., Buck M.D., Vousden K.H. p53, cancer and the immune response. J Cell Sci 2020;133(5):jcs237453. DOI: 10.1242/jcs.237453
26. Chen H.H., Weng B.Q., Cheng K.J. et al. Effect of the vascular endothelial growth factor expression level on angiopoietin-2-mediated nasopharyngeal carcinoma growth. Vasc Cell 2014;6(1):4. DOI: 10.1186/2045-824X-6-4

Вклад авторов
К.А. Алиев: сбор биологического материала, формирование базы данных;
Е.Ю. Зяблицкая: разработка концепции и дизайна исследования, редактирование;
Т.П. Макалиш: выполнение морфологического исследования;
Л.Е. Сорокина: написание текста статьи;
Э.Р. Асанова: выполнение микрофотосъемки и статистическая обработка данных.
Authors' contributions
K.A. Aliyev: collection of biological material, database formation;
E.Yu. Zyablitskaya: development of the concept and design of research, article editing;
T.P. Makalish: performing morphological research;
L.E. Sorokina: article writing;
E.R. Asanova: microphotography and statistical data processing.

ORCID авторов / ORCID of authors
К.А. Алиев / K.A. Aliev: https://orcid.org/0000-0003-3911-1245
Е.Ю. Зяблицкая / E.Yu. Zyablitskaya: https://orcid.org/0000-0001-8216-4196
Т.П. Макалиш / T.P. Makalish: https://orcid.org/0000-0003-1884-2620
Л.Е. Сорокина / L.E. Sorokina: https://orcid.org/0000-0002-1862-6816
Э.Р. Асанова / E.R. Asanova: https://orcid.org/0009-0001-0409-3297

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (государственное задание № FZEG-2023-0009 «Изучение гетерогенности микроокружения опухоли как фактора ее агрессивности и резистентности к терапии»).
Funding. The study was financially supported by the Ministry of Education and Science of Russia (State Assignment No FZEG-2023-0009 "Study of the heterogeneity of the tumor microenvironment as a factor in its aggressiveness and resistance to therapy").

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики
Исследование одобрено университетским комитетом по биомедицинской этике (протокол № 7 от 23.06.2023).
Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Compliance with patient rights and principles of bioethics
The study was approved by the University Committee on Biomedical Ethics (Protocol No. 7 dated 06/23/2023).
All patients signed an informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 19.03.2024. **Принята к публикации:** 20.06.2024. **Опубликована онлайн:** 09.10.2024.
Article submitted: 19.03.2024. **Accepted for publication:** 20.06.2024. **Published online:** 09.10.2024.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-114-125

CC BY 4.0

Липидный профиль плазмы крови при глиальных опухолях

Л.М. Обухова[1], Е.В. Балавина[2], Т.А. Веселова[2], И.А. Медяник[1], А.С. Гришин[1], В.Ф. Лазукин[1], М.М. Конторщиков[1]

[1]ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России; Россия, 603950 Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1;
[2]ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; Россия, 603022 Нижний Новгород, пр-кт Гагарина, 23

Контакты: Лариса Михайловна Обухова *ObuhovaLM@yandex.ru*

Введение. При глиальных опухолях обмен липидов нарушается. Анализ компонентов липидного обмена может быть важной характеристикой молекулярно-генетического профиля глиом.
Цель исследования – определить взаимосвязь параметров липидома плазмы и иммуногистохимических характеристик глиальных опухолей и оценить клиническую значимость анализа липидного спектра крови для дооперационной оценки молекулярного профиля глиом.
Материалы и методы. Иммуногистохимическое определение уровня онкомаркеров О-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (*MGMT*), Ki-67, p53, *IDH1* проводили с использованием клонов соответствующих антител. Состав липидов плазмы крови анализировали методом тонкослойной хроматографии.
Результаты. Уже на начальных стадиях глиомагенеза выявлены значимые различия уровней эфиров холестерола, лизофосфатидилхолинов, соотношений фосфатидилхолин (ФХ)/лизофосфатидилхолин (ЛФХ), нейтральные липиды (НЛ)/фосфолипиды (ФЛ) в плазме крови. Показаны значимые корреляционные зависимости онкомаркеров Ki-67, *MGMT* от вышеназванных параметров липидома. Соотношения ФХ/ЛФХ, НЛ/ФЛ в плазме крови пациентов были значимо ниже в группах с высоким (более 10 %) и низким (менее 10 %) митотическими индексами Ki-67 по сравнению со здоровыми людьми. Таким образом, значения параметров липидома позволяют опосредованно судить о пролиферативной активности глиом, что может быть использовано для дооперационной диагностики этих образований. Значимых различий соотношений ФХ/ЛФХ и НЛ/ФЛ в плазме крови между группами с метилированием промотора *MGMT* и его отсутствием не обнаружено. Критериев-предикторов опосредованного выявления метилирования промотора *MGMT* не выявлено.
Заключение. На основе параметров липидного обмена плазмы крови невозможно определить снижение эпигенетической активности соответствующих транскриптов и дооперационный прогноз эффективности терапии с алкилирующим компонентом.

Ключевые слова: плазма крови, липид, эфир холестерола, соотношение фосфатидилхолин/лизофосфатидилхолин, соотношение нейтральные липиды/фосфолипиды, молекулярно-генетический маркер глиомы, *IDH1*, *MGMT*, Ki-67, p53, глиома

Для цитирования: Обухова Л.М., Балавина Е.В., Веселова Т.А. и др. Липидный профиль плазмы крови при глиальных опухолях. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(3):114–25.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-114-125

Blood plasma lipid profile in glial tumors

L.M. Obukhova[1], E.V. Balavina[2], T.A. Veselova[2], I.A. Medyanik[1], A.S. Grishin[1], V.F. Lazukin[1], M.M. Kontorshchikov[1]

[1]Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 10/1 Minina i Pozharskogo Ploshchad', Nizhny Novgorod 603950, Russia;
[2]National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod; 23 Gagarina Prospekt, Nizhny Novgorod 603022, Russia

Contacts: Larisa Mikhailovna Obukhova *ObuhovaLM@yandex.ru*

Introduction. In glial tumors, lipid metabolism becomes abnormal. Analysis of lipid metabolism components can be an important characteristic of molecular and genetic profile of gliomas.
Aim. To determine the correlation between plasma lipidome profile and immunohistochemical characteristics of glial tumors and to evaluate clinical significance of blood lipid spectrum analysis in preoperative assessment of molecular profile of gliomas.
Materials and methods. Immunohistochemical measurement of O-6-methylguanine-DNA-methyl transferase (*MGMT*), Ki-67, p53, *IDH1* tumor markers was performed using the corresponding antibody clones. Composition of plasma lipids was assessed using thin layer chromatography.
Results. Even at the early stages of gliomagenesis, significant differences in cholesterol ethers, lysophosphatidylcholines, phosphatidylcholine (PC)/ lysophosphatidylcholine (LPC) ratio, neutral lipids (NL)/phospholipids (PL) in the blood were observed. Significant correlations between Ki-67, *MGMT* tumor markers and the above-mentioned lipidome parameters were found. The PC/LPC, NL/PL ratios in the blood of the patients from the groups with higher (above 10 %) and lower (below 10 %) Ki-67 mitotic indexes compared to healthy individuals were significantly lower. Therefore, the values of lipidome parameters allow to indirectly assess proliferative activity of gliomas which can be used for preoperative diagnosis of these tumors. No significant differences in the plasma PC/LPC and NL/PL ratios were found between the groups with *MGMT* promoter methylation and without it. No indirect predictor criteria for *MGMT* were found.
Conclusion. It is impossible to determine decreased epigenetic activity of corresponding transcripts and preoperative prognosis for alkylating agent therapy based on the parameters of plasma lipid metabolism.

Keywords: blood plasma, lipid, cholesterol ester, phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio, and neutral lipids/phospholipids ratio, molecular genetic marker of glioma, *IDH1*, *MGMT*, Ki-67, p53, glioma

For citation: Obukhova L.M., Balavina E.V., Veselova T.A. et al. Blood plasma lipid profile in glial tumors. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(3):114–25. (In Russ.).

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-114-125

ВВЕДЕНИЕ

С целью диагностики глиальных новообразований и прогнозирования их поведения в практическом здравоохранении активно исследуют ряд молекулярных маркеров с использованием иммуногистохимического анализа. Наиболее значимыми из них считаются мутации в генах *IDH1* и *IDH2*, *TP53* с аберрантной экспрессией белка p53, метилирование промотора *MGMT*, а также маркер пролиферации клеток Ki-67 [1]. Молекулярные исследования проводят на операционном материале спустя значительное время после хирургического вмешательства. Возможность определения фенотипа опухоли с соответствующим молекулярным профилем до начала операции позволит спрогнозировать поведение новообразования, скорректировать тактику лечения, избежать ненужных хирургических вмешательств у пациентов с труднодоступной локализацией опухоли и предупредить возможные осложнения.

Для совершенствования диагностики и разработки более эффективных методов лечения исследования последних десятилетий были сосредоточены на изучении молекулярных аберраций не только в геноме, но и в метаболоме [2]. Опухолевые клетки, включая клетки глиомы, могут переключаться на липидный метаболизм в результате активации липогенных ферментов [3]. Известно, что клетки глиом демонстрируют повышенный уровень общего содержания липидов по сравнению с немалигнизированными тканями [4, 5]. В связи с наличием гематоэнцефалического барьера липиды как гидрофобные соединения, способные к диффузии через мембраны клеток эндотелия, могут являться потенциальными биомаркерами различных заболеваний головного мозга, в том числе глиом [6]. Однако работ, посвященных использованию отдельных фракций липидов плазмы в комплексной диагностике глиом, не достаточно.

Цель исследования – проанализировать клиническую значимость липидного спектра крови и взаимосвязь параметров липидного обмена и иммуногистохимических характеристик глиальных опухолей для дооперационной оценки молекулярного профиля глиом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали образцы плазмы крови и послеоперационного материала 21 пациента с глиомами в возрасте 39–61 года до проведения противоопухолевой терапии, которым выполнено микрохирургическое удаление опухоли под навигационным и нейрофизиологическим мониторингом с интраоперационным пробуждением и контролем речевой функции. Клинический диагноз пациентов подтвержден данными гистологического исследования в соответствии с классификацией опухолей центральной нервной системы Всемирной организации здравоохранения [1]: опухоли G_1 ($n = 1$), G_2 ($n = 6$), G_3 ($n = 4$), G_4 ($n = 10$). Контролем служила плазма практически здоровых доноров сопоставимого возраста (6 образцов) (табл. 1).

Иммуногистохимическое исследование маркеров глиальных опухолей. Послеоперационный материал фиксировали в 10 % растворе формалина. До окрашивания осуществляли стандартную депарафинизацию и демаскировку.

Использовали следующие клоны антител: Anti-IDH1 R132H (Dianova International, Испания), anti-MGMT (клон EP337) (артикул AC-0307RUO;

Таблица 1. *Характеристика пациентов в зависимости от степени анаплазии глиом*

Table 1. *Characteristics of the patients depending on the level of glioma anaplasia*

Показатель Characteristic	Контроль ($n = 6$) Control ($n = 6$)	Глиома G_1 ($n = 1$) Glioma G_1 ($n = 1$)	Глиома G_2 ($n = 6$) Glioma G_2 ($n = 6$)	Глиома G_3 ($n = 4$) Glioma G_3 ($n = 4$)	Глиома G_4 ($n = 10$) Glioma G_4 ($n = 10$)
Возраст, *n*: Age, *n*: <60 ≥60	 4 2	 1 –	 2 4	 3 1	 3 7
Пол, *n*: Sex, *n*: мужской male женский female	 4 2	 – 1	 2 4	 2 2	 7 3
Средний объем опухоли, см^3 Mean tumor volume, cm^3	–	121,9	99,0	66,6	89,7
Средний индекс массы тела, кг/м^2 Mean body mass index, kg/m^2	24,25	23,7	25,8	24,0	26,3
Число курящих пациентов в группе, % Number of smoking patients in the group, %	16,67	0	16,6	0	20,0

Epitomics, США), Anti-p53 (клон DO-7) (Leica Biosystems, Германия), антитела Ki-67 (клон SP6) (Thermo Scientific, США). О наличии мутации *IDH1* свидетельствовало окрашивание цитоплазмы в опухолевых клетках в коричневый цвет. Уровень маркеров *MGMT*, Ki-67 и p53 оценивали по доле положительного ядерного окрашивания с умеренной или высокой выраженностью. Подсчет Ki-67 и *MGMT* осуществляли в 10 полях зрения при увеличении ×400. Значения результатов выражались как доля окрашенных клеток в 10 полях зрения. При исследовании метилирования промотора *MGMT* ядерное окрашивание менее чем в 10 % клеток считалось положительным результатом. Примеры иммуногистохимической экспрессии маркеров показаны на рис. 1–4.

Исследование состава липидов плазмы крови. Липиды экстрагировали из плазмы крови с использованием смеси хлороформа с метанолом в соотношении 2:1 и применяли для дальнейшего анализа методом тонкослойной хроматографии [7]. Полученные экстракты липидов последовательно фракционировали в системах хлороформ – метанол – вода – н-гептан в соотношении 65:25:4:9 и н-гептан – диэтиловый эфир – уксусная кислота в соотношении 95:4:1 с использованием пластин Sorbfil («ИМИД», Россия) [8]. Идентифицирование отдельных фракций липидов проводили после обработки хроматограмм 10 % раствором фосфорномолибденовой кислоты в этаноле с использованием липидов-свидетелей (Avanti, США). Относительное содержание каждой фракции (% суммы

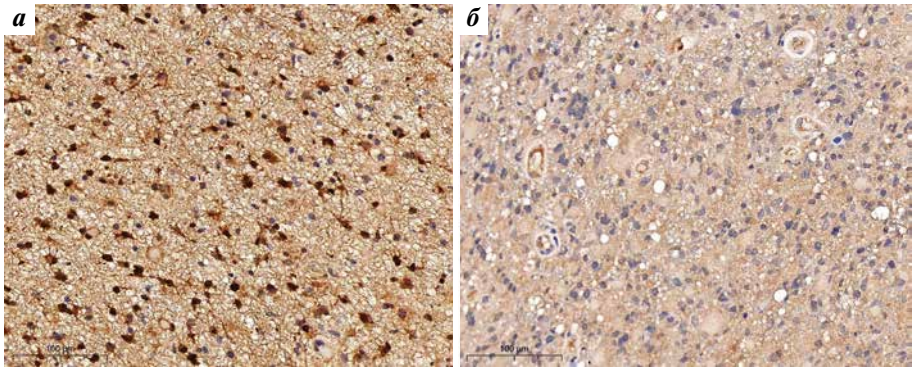


Рис. 1. *Иммуногистохимическое исследование IDH1: а – выраженная цитоплазматическая экспрессия IDH в глиоме G_2; б – отсутствие экспрессии IDH в глиоме G_4, ×200. Шкала – 100 мкм*

Fig. 1. *IDH1 immunohistochemical study: a – marked cytoplasmic IDH expression in G_2 glioma; б – absence of IDH expression in G_4 glioma, ×200. Scale: 100 μm*

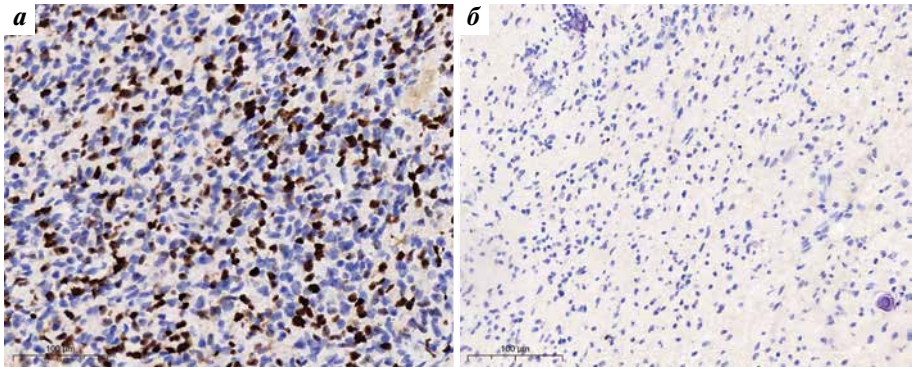


Рис. 2. *Иммуногистохимическое исследование MGMT: а – выраженная ядерная экспрессия MGMT (отсутствие метилирования промотора) в глиоме G_4; б – отсутствие экспрессии MGMT (наличие метилирования промотора) в глиоме G_3, ×200. Шкала – 100 мкм*
Fig. 2. *MGMT immunohistochemical study: a – marked nuclear MGMT expression (absence of promotor methylation) in G_4 glioma; б – absence of MGMT expression (presence of promotor methylation) in G_3 glioma, ×200. Scale: 100 μm*

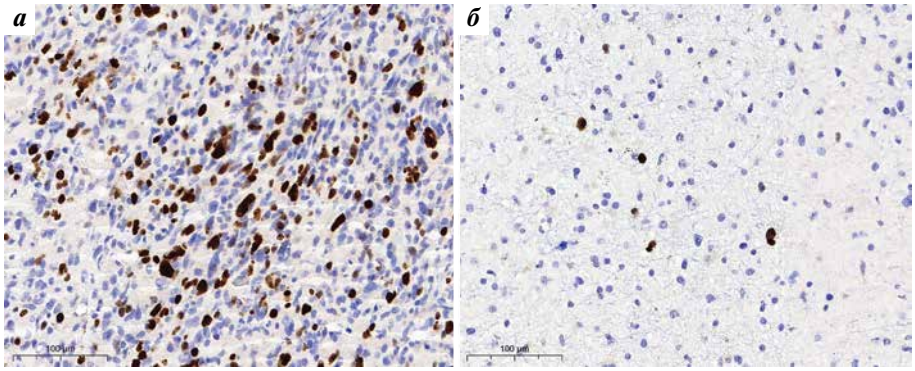


Рис. 3. *Иммуногистохимическое исследование митотического индекса Ki-67: а – высокий уровень экспрессии Ki-67 в глиоме G_4; б – низкий уровень экспрессии Ki-67 в глиоме G_2, ×200. Шкала – 100 мкм*
Fig. 3. *Ki-67 mitotic index immunohistochemical study: a – high level of Ki-67 expression in G_4 glioma; б – low level of Ki-67 expression in G_2 glioma, ×200. Scale: 100 μm*

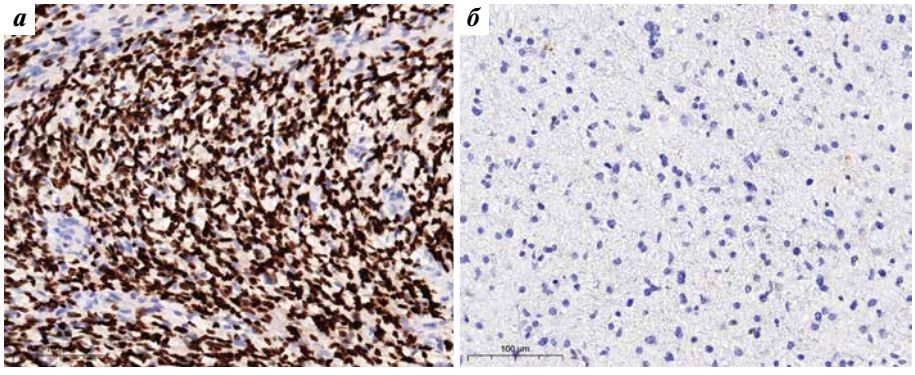


Рис. 4. *Иммуногистохимическое исследование p53: а – выраженная ядерная экспрессия p53 в глиоме G_4; б – отсутствие экспрессии p53 в глиоме G_2, ×200. Шкала – 100 мкм*
Fig. 4. *p53 immunohistochemical study: a – marked nuclear p53 expression in G_4 glioma; б – absence of p53 expression in G_2 glioma, ×200. Scale: 100 μm*

липидов) оценивали с помощью программы ImageJ (https://imagej.net/ij/index.html).

Оценка интенсивности свободнорадикального окисления. Интенсивность свободнорадикального процесса измеряли с помощью программного комплекса биохемилюминесцентного анализа БХЛ-07 («Медозонс», Россия). Оценку свободнорадикальной активности проводили методом индуцированной биохемилюминесценции по интенсивности максимальной вспышки (I_{max}), отражающей способность био-

логического объекта к свободнорадикальному окислению [9].

Статистический анализ данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета AnalystSoft Inc., StatPlusa, версия 6 (www.analystsoft.com/ru/). Статистические критерии выбирали с учетом распределения Гаусса по критериям Колмогорова–Смирнова/Лиллифорса и Шапиро–Уилка. Поскольку распределение данных отличалось от нормального, результаты представлены в виде медианы и 25-го и 75-го квартилей (Q_{25}–Q_{75}). Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Для всех критериев значения считали статистически значимыми при p <0,05. Для маркеров *IDH*, *MGMT*, p53 использовался ранговобисериальный коэффициент корреляции (Rrb), так как полученные результаты представлены в номинальной дихотомической шкале (да/нет), а параметры липидного спектра плазмы крови измеряли в порядковой шкале. Для анализа взаимосвязи маркера Ki-67 и показателей липидного спектра плазмы крови применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена для непараметрических данных с расчетом коэффициента корреляции и уровня его значимости, поскольку митотический индекс Ki-67 имеет численное выражение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменение липидного спектра плазмы крови пациентов с глиомами. Статистически значимое увеличение уровня триглицеридов в плазме крови наблюдалось только на поздних стадиях глиальных опухолей: на 25 и 55 % при глиомах G_3 и G_4 соответственно (см. табл. 2).

Значимое снижение содержания фосфолипидов (ФЛ) плазмы крови также выявлено при глиомах с высокой степенью анаплазии: фосфатидилэтаноламинов – на 46 и 50 % при глиомах G_3 и G_4 соответственно; фосфатидилхолина (ФХ) – на 54 % только при глиомах G_4, сфингомиелинов – на 54 и 58 % при глиомах G_3 и G_4 соответственно (см. табл. 2). Однако задачей данной работы было выявление параметров липидного обмена, уровень которых изменялся бы при всех степенях анаплазии, поскольку именно эти показатели могут быть использованы для ранней дооперационной диагностики глиом. Такими параметрами липидного спектра плазмы крови стали холестерол и его эфиры, лизофосфатидилхолин (ЛФХ) и соотношения ФХ/ЛФХ, нейтральные липиды (НЛ)/ФЛ, а также свободнорадикальная активность (см. табл. 2).

Содержание холестерола в плазме крови было статистически значимо выше по сравнению с практически здоровыми людьми у пациентов с глиомами $G_{1,2}$ на 23 %, G_3 – на 32 %, G_4 – на 54 %. Содержание эфиров

Таблица 2. *Параметры липидного обмена крови в зависимости от степени анаплазии глиом*

Table 2. *Blood lipid metabolism parameters of gliomas with varying degree of anaplasia*

Показатель Parameter	Степень анаплазии Degree of anaplasia	Контроль (n = 6) Control (n = 6)	Глиома $G_{1,2}$ (n = 7) Glioma $G_{1,2}$ (n = 7)	Глиома G_3 (n = 4) Glioma G_3 (n = 4)	Глиома G_4 (n = 10) Glioma G_4 (n = 10)
Эфиры холестерола Cholesterol esters	Медиана, % (Q_{25}–Q_{75}) Median, % (Q_{25}–Q_{75})	28,1 (27,8; 31,3)	21,6 (20,4; 26,3)	31,7 (31,3; 33,1)	33,2 (31,7; 35,4)
	95 % ДИ 95 % confidence interval (CI)	27,6–31,1	19,8–26,0	31,1– 32,7	31,4–35,2
	U-критерий Манна–Уитни Mann–Whitney U-test	–	p = 0,002*	p = 0,046*	p = 0,003*
Триглицериды Triglyce-rides	Медиана, % (Q_{25}–Q_{75}) Median, % (Q_{25}–Q_{75})	15,9 (12,8; 18,5)	16,0 (14,6; 17,8)	19,8 (18,7; 23,8)	21,4 (20,5; 24,0)
	95 % ДИ 95 % CI	13,5–18,4	13,0–19,4	19,3–23,1	21,5 - 23,6
	U-критерий Манна–Уитни Mann–Whitney U-test	–	p = 1,000	p = 0,041*	p = 0,03*
Холестерол Cholesterol	Медиана, % (Q_{25}–Q_{75}) Median, % (Q_{25}–Q_{75})	34,3 (30,0; 38,4)	42,2 (39,2; 44,1)	45,3 (40,2; 51,0)	52,8 (41,0; 59,8)
	95 % ДИ 95 % CI	29,5–38,3	40,7–46,6	39,2–51,8	38,9–60,5
	U-критерий Манна–Уитни Mann–Whitney U-test	–	p = 0,043*	p = 0,008*	p = 0,003*

Окончание табл. 2
End of table 2

Показатель Parameter	**Степень анаплазии** Degree of anaplasia	**Контроль (*n* = 6)** Control (*n* = 6)	**Глиома $G_{1,2}$ (*n* = 7)** Glioma $G_{1,2}$ (*n* = 7)	**Глиома G_3 (*n* = 4)** Glioma G_3 (*n* = 4)	**Глиома G_4 (*n* = 10)** Glioma G_4 (*n* = 10)
Фосатидилэтаноламины Phosatidylethanolamine	Медиана, % (Q_{25}–Q_{75}) Median, % (Q_{25}–Q_{75})	4,23 (2,72; 5,61)	3,48 (1,79; 5,11)	2,30 (2,22; 2,34)	2,13 (2,06; 2,49)
	95 % ДИ 95 % CI	3,0–5,4	1,5–5,6	2,2–2,4	1,5–2,6
	U-критерий Манна–Уитни Mann–Whitney U-test	–	*p* = 0,519	*p* = 0,042*	*p* = 0,013*
Фосфатидилхолины Phosphatidylcholines	Медиана, % (Q_{25}–Q_{75}) Median, % (Q_{25}–Q_{75})	11,6 (9,3; 14,4)	16,4 (9,8; 19,9)	10,5 (7,3; 13,6)	5,4 (2,5; 10,1)
	95 % ДИ 95 % CI	8,9–14,3	9,7–21,8	5,2–15,8	1,2–11,8
	U-критерий Манна–Уитни Mann–Whitney U-test	–	*p* = 0,197	*p* = 0,497	*p* = 0,039*
Сфингомиелины Sphingomyelins	Медиана, % (Q_{25}–Q_{75}) Median, % (Q_{25}–Q_{75})	3,5 (2,2; 4,8)	3,1 (2,6; 4,1)	1,6 (1,6; 2,0)	1,5 (1,4; 1,8)
	95 % ДИ 95 % CI	2,1–5,3	2,0–4,6	1,3–2,1	1,2–2,0
	U-критерий Манна–Уитни Mann–Whitney U-test	–	*p* = 0,699	*p* = 0,046*	*p* = 0,042*
Лизофосфатидилхолин Lysophosphatidylcholines	Медиана, % (Q_{25}–Q_{75}) Median, % (Q_{25}–Q_{75})	1,2 (0,4; 2,1)	2,9 (1,5; 4,4)	2,4 (2,2; 3,1)	2,5 (1,9; 3,7)
	95 % ДИ 95 % CI	0,6–2,1	1,3–4,8	2,1–3,4	1,5–4,1
	U-критерий Манна–Уитни Mann–Whitney U-test	–	*p* = 0,039*	*p* = 0,042*	*p* = 0,039*
Соотношение нейтральные липиды/фосфолипиды Neutral lipids/phospholipids ratio	Медиана (Q_{25}–Q_{75}) Median (Q_{25}–Q_{75})	4,3 (4,2; 4,4)	1,9 (1,8; 2,1)	1,8 (1,5; 2,0)	1,9 (1,4; 4,4)
	95 % ДИ 95 % CI	4,2–4,5	1,7–2,2	1,4–2,2	0,7–4,3
	U-критерий Манна–Уитни Mann–Whitney U-test	–	*p* = 0,003*	*p* = 0,008*	*p* = 0,045*
Соотношение фосфатидилхолин/лизофосфатидилхолин Phosphatidylcholines/lysophosphatidylcholines ratio	Медиана (Q_{25}–Q_{75}) Median (Q_{25}–Q_{75})	11,9 (11,0; 13,9)	4,8 (3,9; 9,2)	4,0 (3,4; 4,3)	2,7 (0,9; 4,3)
	95 % ДИ 95 % CI	10,4–13,5	2,4–10,2	3,05–4,8	0,1–4,9
	U-критерий Манна–Уитни Mann–Whitney U-test	–	*p* = 0,022*	*p* = 0,008*	*p* = 0,003*
I_{max}	Медиана, мВ (Q_{25}–Q_{75}) Median, mV (Q_{25}–Q_{75})	144,0 (106,0; 149,0)	214,0 (162,5; 309,0)	308,0 (297,3; 325,5)	383,5; 229,0; 577,3
	95 % ДИ 95 % CI	111,6–165,3	125,2–338,8	285,8–334,7	240,7–632,1
	U-критерий Манна–Уитни Mann–Whitney U-test	–	*p* = 0,045*	*p* = 0,008*	*p* = 0,003*

**Различия с контролем (практически здоровые люди) статистически значимы.*
Примечание. *I_{max} – интенсивность максимальной вспышки; ДИ – доверительный интервал; Q_{25} – 25-й квартиль; Q_{75} – 75-й квартиль.*
**Differences compared to control (practically healthy individuals) are statistically significant.*
Note. I_{max} – maximum flash intensity; CI – confidence interval; Q_{25} – 25th quartile; Q_{75} – 75th quartile.

холестерола в плазме крови снижалось на начальных стадиях глиальных опухолей на 23 %, но было значимо больше, чем у больных контрольной группы при III (на 13 %) и IV (на 18 %) степени анаплазии (см. табл. 2).

Статистически значимое увеличение уровня ЛФХ в плазме крови по сравнению с контрольной группой выявлено уже на начальных стадиях глиомагенеза: на 149, 105 и 113 % при глиомах $G_{1,2}$, G_3 и G_4 соответственно (см. табл. 2).

Характеристика липидома плазмы крови в зависимости от иммуногистохимического профиля глиом. Для выявления взаимосвязей между параметрами липидома крови и иммуногистохимическими маркерами глиом рассчитаны рангово-бисериальный коэффициент корреляции для *IDH*, *MGMT*, p53 (Rrb) и коэффициент Спирмена для Ki-67 (Rho) (табл. 3). Значимые взаимосвязи выявлены только для Ki-67 и *MGMT*.

Для подтверждения диагностической значимости выявленных параметров липидного обмена плазмы крови данные были разделены по группам в зависимости от иммуногистохимического профиля опухоли по соответствующему маркеру. На рис. 5–7 представлены только данные, значимо различающиеся между группами.

Содержание эфиров холестерола в плазме крови при высоком митотическом индексе Ki-67 (>10 %) было значимо выше, чем при низком (<10 %) (см. рис. 5).

Если содержание эфиров холестерола в плазме крови больных с глиомами с низким митотическим индексом Ki-67 значимо отличалось от такового у здоровых людей (U-критерий Манна–Уитни; p <0,05), то между пациентами с высоким индексом Ki-67 и здоровыми людьми различий по этому показателю обнаружено не было (p >0,05).

Значимые различия между группами здоровых людей, пациентов с низким и высоким митотическими индексами Ki-67 выявлены только для соотношений НЛ/ФЛ (p <0,05) и ФХ/ЛФХ (p <0,05) в плазме крови (см. рис. 6, 7).

Таблица 3. *Корреляция между иммуногистохимическими маркерами глиом и параметрами липидного спектра плазмы крови*
Table 3. *Correlations between immunohistochemical markers of gliomas and parameters of the lipid spectrum of blood plasma*

Параметр липидного спектра Parameter of the lipid spectrum	Маркер опухолевого роста Tumor growth marker			
	***IDH* (Rrb)**	**Ki-67 (Rho)**	***MGMT* (Rrb)**	**p53 (Rrb)**
Эфиры холестерола Cholesterol esters	–0,525; 0,55	0,705*; 0,005	–0,714**; 0,67	0,150; 0,67
Триглицериды Triglycerides	–0,425; 0,55	0,543**; 0,045	–0,857**; 0,67	–0,050; 0,67
Холестерол Cholesterol	–0,175; 0,55	0,497; 0,071	–0,571; 0,67	0,050; 0,67
Фосатидилэтаноламины Phosatidylethanolamines	–0,025; 0,55	0,319; 0,266	–0,571; 0,67	–0,350; 0,67
Фосфатидилхолины Phosphatidylcholines	0,675**; 0,55	–0,253; 0,383	0,857**; 0,67	0,450; 0,67
Сфингомиелины Sphingomyelins	–0,225; 0,55	0,228; 0,432	–0,857**; 0,67	0,050; 0,67
Лизофосфатидилхолины Lysophosphatidylcholines	–0,125; 0,55	0,217; 0,456	–0,429; 0,67	–0,350; 0,67
Соотношение нейтральные липиды/фосфолипиды Neutral lipids/phospholipids ratio	0,438; 0,58	–0,017; 0,957	1,000**; 0,71	0,600; 0,67
Соотноошение фосфатидилхолин/лизофосфатидилхолин Phosphatidylcholines/lysophosphatidylcholines ratio	0,5; 0,55	–0,567**; 0,034	0,714**; 0,67	0,700**; 0,67
I_{max}	–0,45; 0,55	0,363; 0,202	–0,286; 0,67	0,000; 0,67

**Статистически высокозначимые корреляционные взаимосвязи (p <0,01). **Статистически значимые корреляционные взаимосвязи (p <0,05).*
Примечание. *Rho – коэффициент ранговой корреляции Спирмена (для маркера клеточной пролиферации Ki-67); Rrb – рангово-бисериальный коэффициент корреляции (для маркеров IDH, MGMT, p53); I_{max} – интенсивность максимальной вспышки.*
**Statistically highly significant correlations (p <0.01). **Statistically significant correlations (p <0.05).*
Note. *Rho – Spearman's rank correlation coefficient (for cell proliferation marker Ki-67); Rrb – rank-biserial correlation coefficient (for IDH, MGMT, p53 markers); I_{max} – maximum flash intensity.*

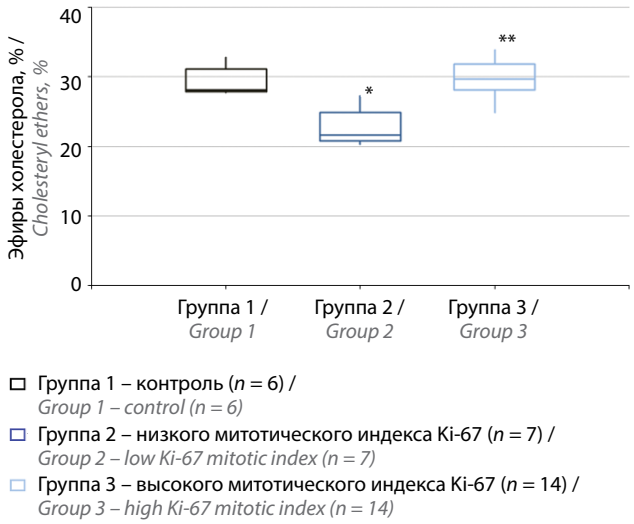


Рис. 5. *Содержание эфиров холестерола в плазме крови в зависимости от величины митотического индекса Ki-67. Есть значимые различия по данному параметру между группами с низким и высоким митотическими индексами Ki-67 (U-критерий Манна–Уитни; p <0,05). *Статистически значимые различия уровня эфиров холестерола по сравнению с контрольной группой (p <0,05). **Статистически значимые различия уровня в группах с низким и высоким митотическим индексом Ki-67 (p <0,05)*

Fig. 5. *Level of cholesteryl ethers in the plasma depending on the value of Ki-67 mitotic index. There are significant differences in this parameter between the groups with low and high Ki-67 mitotic indices (Mann–Whitney U-test; p <0.05). *Statistically significant differences in cholesteryl ether levels compared to the control group (p <0.05). **Statistically significant differences between the groups with high and low Ki-67 mitotic index (p <0.05)*

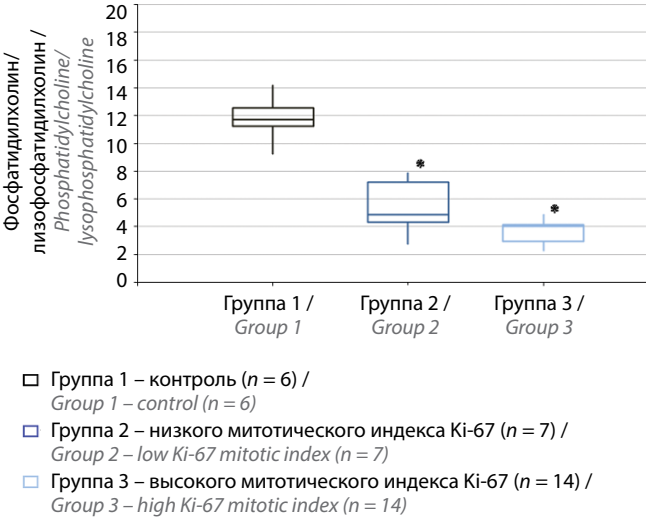


Рис. 7. *Соотношение фосфатидилхолин/лизофосфатидилхолин в плазме крови в зависимости от величины митотического индекса Ki-67. Значимых различий по данному показателю между группами с низким и высоким митотическими индексами Ki-67 не выявлено (U-критерий Манна–Уитни; p >0,05). *Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой (p <0,05)*

Fig. 7. *Phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio in the plasma depending on the value of Ki-67 mitotic index. The are no significant differences in this parameter between the groups with low and high Ki-67 mitotic indices (Mann–Whitney U-test; p >0.05). *Statistically significant differences compared to the control group (p <0.05)*

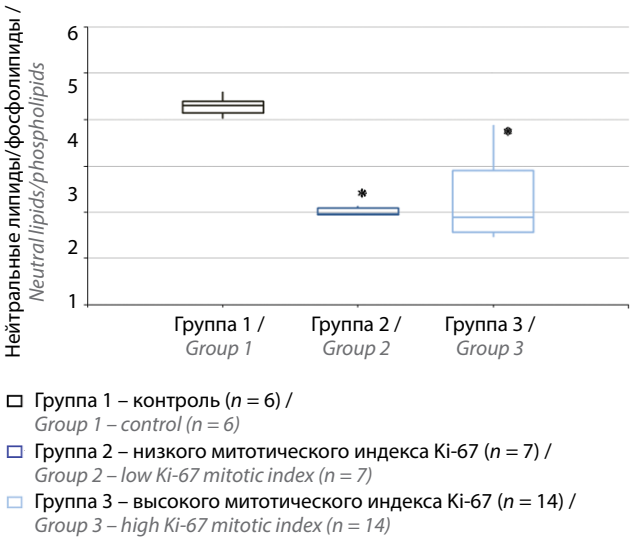


Рис. 6. *Соотношение нейтральные липиды/фосфолипиды в плазме крови в зависимости от величины митотического индекса Ki-67. Значимых различий по данному показателю между группами с низким и высоким митотическими индексами Ki-67 не выявлено (U-критерий Манна–Уитни; p >0,05). *Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой (p <0,05)*

Fig. 6. *Neutral lipids/phospholipids ratio in the plasma depending on the value of Ki-67 mitotic index. The are no significant differences in this parameter between the groups with low and high Ki-67 mitotic indices (Mann–Whitney U-test; p >0.05). *Statistically significant differences compared to the control group (p <0.05)*

При этом значимых различий между группами с низким и высоким митотическими индексами Ki-67 для соотношений ФХ/ЛФХ и НЛ/ФЛ не выявлено (см. рис. 6, 7).

Значимые различия в метилировании промотора гена *MGMT* с контрольной группой в зависимости выявлены только для соотношений ФХ/ЛФХ и НЛ/ФЛ в плазме крови. В группе с метилированным промотором (фермент не экспрессируется) соотношение ФХ/ЛФХ в плазме крови было значимо ниже (U-критерий Манна–Уитни; p <0,05), чем у практически здоровых людей. Между группой пациентов с неметилированным промотором гена *MGMT* и контрольной группой различий по данному параметру выявлено не было (p >0,05). Не обнаружено значимых различий по этому показателю и между группами больных с метилированием *MGMT* и его отсутствием (U-критерий Манна–Уитни; p >0,05). Соотношение ФХ/ЛФХ в плазме крови пациентов с глиальными опухолями было значимо ниже как в группе метилированния промотора *MGMT* (p <0,05), так и в группе без его него (фермент О-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза экспрессируется) (U-критерий Манна–Уитни; p <0,05), чем у практически здоровых людей. Между группами метилирования *MGMT* и без него по данному параметру значимых различий не выявлено (U-критерий Манна–Уитни; p >0,05).

ОБСУЖДЕНИЕ

С учетом небольшого размера выборки далее мы будем говорить о предварительных результатах, которые указывают на определенные тенденции. Однако увеличение объема выборки не может отменить найденные статистически значимые корреляции. Это связано с тем, что критический уровень любого критерия для принятия/непринятия нулевой гипотезы об относительной статистической значимости результата будет понижаться с увеличением выборки [10].

Ткань глиальных опухолей производит избыточное количество холестерола, поддерживающего их рост и пролиферацию [11, 12]. Известно, что клеткам этих опухолей свойственен аномальный метаболизм холестерола: активация его синтеза, поглощения экзогенного холестерола посредством липопротеиновых рецепторов и активная этерификация, опосредованная высокой активностью холестеролацилтрансферазы [13]. Избыточный холестерол преобразуется и сохраняется в форме эфира холестерола с помощью ацил-КоА-холестеролацилтрансферазы (стерол-О-ацилтрансферазы) [14]. Этот дисбаланс отражается в увеличении количества внутриклеточных эфиров холестерола в клетках глиобластом. Эти клетки накапливают липидные капли для удовлетворения своих потребностей в быстром росте [15]. Данные капли представляют собой субклеточные органеллы, которые хранят большое количество НЛ, триглицеридов и/или эфиров холестерола [16]. Накопление липидных капель коррелирует с прогрессированием глиобластом и низкими показателями выживаемости [17].

Расположенный в эндотелиальных клетках капилляров головного мозга гематоэнцефалический барьер обладает специфическими свойствами жесткого контроля, однако они могут быть изменены при патологии [18]. При опухолях головного мозга происходит модификация физических и метаболических свойств гематоэнцефалического барьера, который переименовывают в гематоэнцефалический опухолевый барьер [19]. По мере прогрессирования глиального роста проницаемость этого барьера возрастает [20]. В связи с этим липидные перестройки в глиомах могли послужить причиной накопления в плазме крови пациентов холестерола и его эфиров, триглицеридов, лизофосфолипидов и изменения соотношений ФХ/ЛФХ, НЛ/ФЛ.

Данные об изменениях липидного профиля плазмы при различных типах опухолей, в том числе глиомах, довольно противоречивы. Однако есть предположение, что накопление холестерола и его эфиров в сыворотке крови может служить биомаркером злокачественных опухолей головного мозга [21]. В работе Y. Kou и соавт. [17, 22, 23] и других исследованиях показано, что потенциальными липидными биомаркерами глиом могут быть триглицериды, ФХ и ЛФХ; изменения уровней этих липидов в плазме отражают нарушение метаболизма липидов в тканях глиом (табл. 4).

Митотический индекс Ki-67 активно используется в диагностике глиальных новообразований. Ki-67 является ядерным белком, принимающим участие в синтезе рибосомной РНК [24]. Его экспрессия отражает выраженность пролиферативной активности клеток. В глиальных новообразованиях индекс митотической активности Ki-67 используется для дифференциальной диагностики опухолей $G_{1–2}$ и $G_{3–4}$ [25, 26]. Увеличение его значения, как правило, коррелирует со степенью злокачественности [27, 28].

Таким образом, выявленная положительная корреляция между уровнями триглицеридов и эфиров холестерола в плазме крови и иммуногистохимического маркера активности пролиферации клеток ядерного белка Ki-67 с большой долей вероятности обусловлено увеличением активности ацил-КоА-холестеролацилтрансферазы и повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера при глиобластомах.

Фосфатидилхолины также играют большую роль в развитии глиом [29]. Основным путем деградации ФХ в глиобластомах является образование ЛФХ [30]. В общебиологическом плане развитию патологического процесса в значительной степени способствуют изменения количества ЛФХ и сфингомиелинов и соотношения ФХ/ЛФХ, поскольку эти показатели отражают нарушение функционирования клеточных мембран под действием повреждающего фактора.

Метаболизм мембран во многом определяется интенсивностью процессов перекисного окисления липидов, активация которого обусловлена свободнорадикальными процессами. В представленном исследовании мы продемонстрировали повышение более чем в 1,5 раза свободнорадикальной активности уже на начальной стадии глиомагенеза (см. табл. 2), при этом с увеличением степени анаплазии I_{max} возрастает все более значительно. При активации этого процесса наблюдаются увеличение активности фосфолипазы А2 и превращение ФХ в ЛФХ. Соответственно будет изменяться и количественное соотношение этих фракций.

При назначении химиотерапии наиболее значимым предиктивным маркером является метилирование промотора *MGMT* [31]. О-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза осуществляет репарацию ДНК [32]. Присоединение метильной группы к промотору ограничивает способность ДНК-полимеразы связываться с ним, что делает невозможным дальнейшую экспрессию гена [33]. Это приводит к снижению способности опухолевых клеток восстанавливать поврежденные участки ДНК после действия химиопрепаратов с алкилирующим агентом [34–36].

Выявленные отрицательные корреляционные связи уровня *MGMT* в ткани глиальных опухолей с уровнями общих липидов, триацилглицеридов и эфиров холестерола соответствуют имеющимся литературным данным о худших показателях выживаемости пациентов с высоким уровнем холестерина и липопротеинов

Таблица 4. *Липидом крови при глиальных опухолях (по данным литературы)*

Table 4. *Blood lipidome in glial tumors (literature data)*

Изменения состава липидов в плазме (сыворотке) крови Changes in plasma (serum) lipid composition	Метод определения Measurement technique	Источник Source
Снижение содержания лизофосфатидилхолина, накопление фосфатидилхолина и триглицеридов Decreased lysophosphatidylcholine, accumulation of phosphatidylcholine and triglycerides	Высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия High-performance liquid chromatography and mass spectrometry	[6]
Накопление фосфолипидов, холестерола и его эфиров Accumulation of phospholipids, cholesterol and its ethers	Одноимпульсная спектроскопия ядерного магнитного резонанса (1H, 31P) Single-pulse nuclear magnetic resonance spectroscopy (1H, 31P)	[21]
Высокий уровень холестерина до операции и увеличение содержания липопротеинов низкой плотности от дооперационного периода до его окончания как параметры снижения показателей выживаемости High cholesterol level before surgery and increased low density lipoproteins from the preoperative period until its end as parameters of decreased survival	Ретроспективный анализ пациентов с глиомой Retrospective analysis of patients with glioma	[37]
Повышение уровня липопротеинов низкой плотности как потенциального биомаркера плохого прогноза Increased low density lipoproteins as potential biomarkers of poor prognosis	Газовая хроматография-масс-спектрометрия, жидкостная хроматография и масс-спектрометрия или спектроскопия ядерного магнитного резонанса Gas chromatography-mass spectrometry, liquid chromatography and mass spectrometry or nuclear magnetic resonance spectroscopy	[23]
Изменения содержания триглицеридов, фосфатидилхолина и лизофосфатидилхолина, отражающие нарушения метаболизма липидов в тканях глиом Changes in triglycerides, phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine reflecting abnormal lipid metabolism in glioma tissues	Высокоэффективная жидкостная хроматография High-performance liquid chromatography	[17]

низкой плотности в сыворотке крови до проведения терапии [37]. Однако значимых различий липидного профиля плазмы крови между группами метилирования промотора гена *MGMT* и без него обнаружено не было. Следовательно, дооперационный прогноз эффективности терапии препаратами с алкилирующим механизмом действия на основе параметров липидного обмена плазмы крови маловероятен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, были выявлены параметры липидома плазмы крови, содержание которых значимо меняется уже при минимальной степени анаплазии глиальных опухолей. Из данных показателей как наиболее перспективные для клинических исследований отобраны те, уровень которых значимо различался в зависимости от иммуногистохимического профиля по соответствующему маркеру. Соотношения НЛ/ФЛ и ФХ/ЛФХ в плазме крови позволяют опосредовано судить о пролиферативной активности опухоли, которую отражает митотический индекс Ki-67. Это может быть использовано для дооперационной диагностики глиальных опухолей с неопределенным потенциалом злокачественности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Louis D.N., Perry A., Wesseling P. et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. Neuro Oncol 2021;23(8):1231–51. DOI: 10.1093/neuonc/noab190
2. Marien E., Meister M., Muley T. et al. Non-small cell lung cancer is characterized by dramatic changes in phospholipid profiles. Int J Cancer 2015;137(7):1539–48. DOI: 10.1002/ijc.29517
3. Bensaad K., Favaro E., Lewis C.A. et al. Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1α contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation. Cell Rep 2014;9(1):349–65. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.08.056
4. Guo D., Bell E.H., Chakravarti A. Lipid metabolism emerges as a promising target for malignant glioma therapy. CNS Oncol 2013;2(3):289–99. DOI: 10.2217/cns.13.20
5. El Khayari A., Bouchmaa N., Taib B. et al. Metabolic rewiring in glioblastoma cancer: EGFR, IDH and beyond. Front Oncol 2022;12:901–51. DOI: 10.3389/fonc.2022.901951
6. Zhou J., Ji N., Wang G. et al. Metabolic detection of malignant brain gliomas through plasma lipidomic analysis and support vector machine-based machine learning. BioMedicine 2022;81:104097. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104097
7. Wu X., Geng F., Cheng X. et al. Lipid droplets maintain energy homeostasis and glioblastoma growth via autophagic release of stored fatty acids. iScience 2020;23(10):1–11. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101569
8. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии: в 2 т. М., Мир, 1980. 295 с.
Sharshunova M., Schwarz V., Michalec C. Thin-layer chromatography in pharmacy and clinical biochemistry: in 2 vol. Moscow: Mir; 1980. 295 p. (In Russ.).
9. Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах. В кн.: Межвузовский сборник биохимии и биофизики микроорганизмов. Горький: Волго-Вятское издательство, 1983. С. 179–183.
Kuzmina E.I., Nelyubin A.S., Shchennikova M.K. The use of induced chemiluminescence for the assessment of free radical reactions in biological substrates. In: Interuniversity collection of biochemistry and biophysics of microorganisms. Gor`kiy: Volgo-Vyatskoe izdatel`stvo, 1983. Pp. 179–183. (In Russ.).
10. Горяинова Е.Р., Панков А.Р., Платонова Е.Н. Прикладные методы анализа статистических данных: учеб. пособие для вузов. М.: Издательский дом Высшей школы экономики, 2012. С. 113–151.
Goryainova E.R., Pankov A.R., Platonova E.N. Applied methods for analyzing statistical data: textbook for universities. Moscow: Izdatel'skiy dom Vysshej shkoly ekonomiki, 2012. Pp. 113–151. (In Russ.).
11. Eibinger G., Fauler G., Bernhart E. et al. On the role of 25-hydroxycholesterol synthesis by glioblastoma cell lines. Implications for chemo-tactic monocyte recruitment. Exp Cell Res 2013;319:1828–38. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.03.025
12. Cigliano L., Spagnuolo M.S., Napolitano G. et al. 24S-hydroxychole-sterol affects redox homeostasis in human glial U-87 MG cells. Mol Cell Endocrinol 2019; 486:25–33. DOI: 10.1016/j.mce.2019.02.013
13. Ríos-Marco P., Martín-Fernández M., Soria-Bretones I. et al. Alkylphospholipids deregulate cholesterol metabolism and induce cell-cycle arrest and autophagy in U-87 MG glioblastoma cells. Biochim Biophys Acta 2013;1831(8):1322–34. DOI: 10.1016/j.bbalip.2013.05.004
14. Chang T.Y., Li B.L., Chang C.C., Urano Y. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferases. Am J Physiol Endocrinol Metab 2009;297:E1–9. DOI: 10.1152/ajpendo.90926.2008
15. Geng F., Cheng X., Wu X. et al. Inhibition of SOAT1 suppresses glioblastoma growth via blocking SREBP-1-mediated lipogenesis. Clin Cancer Res 2016;22(21):5337–48. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-17-0063
16. Geng F., Guo D. Lipid droplets, potential biomarker and metabolic target in glioblastoma. Intern Med Rev (Wash D C) 2017;3(5):10.18103. DOI: 10.18103/imr.v3i5.443
17. Kou Y., Geng F., Guo D. Lipid metabolism in glioblastoma: from de novo synthesis to storage. Biomedicines 2022;10(8):1943–25. DOI: 10.3390/biomedicines10081943
18. Deligne C., Hachani J., Duban-Deweer S. et al. Development of a human in vitro blood–brain tumor barrier model of diffuse intrinsic pontine glioma to better understand the chemoresistance. Fluids Barriers CNS 2020;17(1):37. DOI: 10.1186/s12987-020-00198-0
19. Abbott N.J. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. J Inherit Metab Dis 2013;36(3):437–49. DOI: 10.1007/s10545-013-9608-0
20. Sarkaria J.N., Hu L.S., Parney I.F. et al. Is the blood–brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. Neuro-Oncology 2018;20(2):184–91. DOI: 10.1093/neuonc/nox175
21. Красникова О.В., Кондратьева А.Р., Баду С.К. и др. Потенциальные диагностические биомаркеры глиом в жидких средах организма. Журнал медико-биологических исследований 2022;10(1):52–63. DOI: 10.37482/2687-1491-z090
Krasnikova O.V., Kondrat'eva A.R., Badu S.K. et al. Potential diagnostic biomarkers of glioma in the liquid media of the body. Zhurnal mediko-biologicheskikh issledovaniy = Journal of Medical and Biological Research 2022;10(1):52–63. DOI: 10.37482/2687-1491-z090
22. Zhou J., Ji N., Wang G. et al. Metabolic detection of malignant brain gliomas through plasma lipidomic analysis and support vector machine-based machine learning. Articles 2022;81:1–13. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104097
23. Kao T.-J., Lin Ch.-L., Yang W.-B. et al. Dysregulated lipid metabolism in TMZ-resistant glioblastoma: pathways, proteins, metabolites and therapeutic opportunities. Lipids Health Dis 2023;22(114):1–13. DOI: 10.1186/s12944-023-01881-5
24. Bullwinkel J., Baron-Luehr B., Ludemann A. et al. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. J Cell Physiol 2006;206(3):624–35. DOI: 10.1002/jcp.20494
25. Theresia E., Malueka R.G., Pranacipta S. et al. Association between Ki-67 labeling index and histopathological grading of glioma in Indonesian population. Asian Pac J Cancer Prev 2020;21(4):1063–8. DOI: 10.31557/apjcp.2020.21.4.1063
26. Yoda R.A., Marxen T., Longo L. et al. Mitotic index thresholds do not predict clinical outcome for IDH-mutant astrocytoma. J Neuropathol Exp Neurol 2019;78(11):1002–10. DOI: 10.1093/jnen/nlz082
27. Dahlrot R.H., Bangsø J.A., Petersen J.K. et al. Prognostic role of Ki-67 in glioblastomas excluding contribution from non-neoplastic cells. Sci Rep 2021;11(1):17918. DOI: 10.1038/s41598-021-95958-9
28. Chen W.J., He D.S., TangR.X. et al. Ki-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: evidence from a systematic review and meta-analysis. Asian Pac J Cancer Prev 2015;16(2):411–20. DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.2.411
29. Abdul Rashid K., Ibrahim K., Wong J.H.D., Mohd Ramli N. Lipid alterations in glioma: a systematic review. Metabolites 2022;12(12):1280. DOI: 10.3390/metabo12121280
30. Morash S.C., Cook H.W., Spence M.W. Lysophosphatidylcholine as an intermediate in phosphatidylcholine metabolism and glycerophosphocholine synthesis in cultured cells: an evaluation

of the roles of 1-acyl- and 2-acyl-lysophosphatidylcholine. Biochim Biophys Acta 1989;1004(2):221–9. DOI: 10.1016/0005-2760(89)90271-3
31. Butler M., Pongor L., Su Y.T. et al. MGMT status as a clinical biomarker in glioblastoma. Trends Cancer 2020;6(5):380–91. DOI: 10.1016/j.trecan.2020.02.010
32. Tano K., Shiota S., Collier J et al. Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine. Proc Nat Acad Sci USA 1990;87(2):686–90. DOI: 10.1073/pnas.87.2.686
33. Chen X., Zhang M., Gan H. et al. A novel enhancer regulates MGMT expression and promotes temozolomide resistance in glioblastoma. Nat Commun 2018;9(1):2949. DOI: 10.1038/s41467-018-05373-4
34. Pandith A.A., Qasim I., Zahoor W. et al. Concordant association validates MGMT methylation and protein expression as favorable prognostic factors in glioma patients on alkylating chemotherapy (temozolo-mide). Sci Rep 2018;8(1):6704. DOI: 10.1038/s41598-018-25169-2
35. Dahlrot R.H., Larsen P., Boldt H.B. et al. Posttreatment effect of MGMT methylation level on glioblastoma survival. J Neuropathol Exp Neurol 2019;8(7):633–40. DOI: 10.1093/jnen/nlz032
36. Aoki K., Natsume A. Overview of DNA methylation in adult diffuse gliomas. Brain Tumor Pathol 2019;36(2):8491. DOI: 10.1007/s10014-019-00339-w
37. Huang F., Li S., Wang X. et al. Serum lipids concentration on prognosis of high-gradeglioma. Cancer Causes Control 2023;34(9):801–11. DOI: 10.1007/s10552-023-01710-1

Вклад авторов
Л.М. Обухова: разработка концепции и методологии исследования, написание текста статьи, редактирование;
Е.В. Балавина: анализ данных литературы по теме статьи, проведение инструментальных исследований, исследование состава липидов плазмы крови, редактирование;
Т.А. Веселова: интерпретация результатов исследования, редактирование;
И.А. Медяник: проведение инструментальных исследований, микрохирургическое удаление опухоли, сбор и систематизация данных клинических исследований;
А.С. Гришин: проведение инструментальных исследований и иммуногистохимического исследования маркеров глиальных опухолей;
В.Ф. Лазукин: анализ и систематизация экспериментальных данных, статистическая обработка данных;
М.М. Конторщиков: сбор данных литературы, пробоподготовка образцов, проведение инструментальных исследований, оценка интенсивности свободнорадикального окисления.
Authors' contributions
L.M. Obukhova: development of the concept and methodology of research, article writing, editing;
E.V. Balavina: analysis of literature data on the topic of the article, conducting instrumental studies, studying the composition of blood plasma lipids, editing;
T.A. Veselova: interpretation of research results, editing;
I.A. Medyanik: instrumental research, microsurgical tumor removal, collection and systematization of clinical research data;
A.S. Grishin: conducting instrumental studies and immunohistochemical studies of glial tumor markers;
V.F. Lazukin: analysis and systematization of experimental data, statistical data processing;
M.M. Kontorshchikov: collection of literature data, sample preparation of samples, conducting instrumental studies, assessment of the intensity of free radical oxidation.

ORCID авторов / ORCID of authors
Л.М. Обухова / L.M. Obukhova: https://orcid.org/0000-0003-4064-9616
Е.В. Балавина / E.V. Balavina: https://orcid.org/0009-0002-9711-2502
Т.А. Веселова / T.A. Veselova: https://orcid.org/0000-0002-0230-6965
И.А. Медяник / I.A. Medyanik: https://orcid.org/0000-0002-7519-0959
А.С. Гришин / A.S. Grishin: https://orcid.org/0000-0001-7885-8662
В.Ф. Лазукин / V.F. Lazukin: https://orcid.org/0000-0003-0916-0468
М.М. Конторщиков / M.M. Kontorshchikov: https://orcid.org/0000-0002-0262-5448

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Программы развития ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России «Приоритет – 2030» (грант № 204).
Funding. The work was carried out with the financial support of the Development Program "Priority – 2030" of the Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of Russia (grant No. 204).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики
Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России (протокол № 6 от 17.04.2019).
Compliance with patient rights and principles of bioethics
The study protocol was approved by the biomedical ethics committees of Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of Russia (protocol No. 6 dated 17.04.2019).

Статья поступила: 24.03.2024. **Принята к публикации:** 15.07.2024. **Опубликована онлайн:** 09.10.2024.
Article submitted: 24.03.2024. **Accepted for publication:** 15.07.2024. **Published online:** 09.10.2024.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-126-132

CC BY 4.0

Антипролиферативное воздействие дикорастущих ягод и вздутоплодника сибирского Северо-Восточной Сибири на клетки рака молочной железы MCF-7

А.Н. Егоров, Д.Г. Тихонов, А.С. Гольдерова

ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова»; Россия, 677000 Якутск, ул. Белинского, 58

Контакты: Андрей Николаевич Егоров *291219942014@mail.ru*

Введение. Результаты исследований показали, что природные вещества, содержащиеся в различных растениях, включая ягодные культуры, могут обладать противораковой активностью. Мы изучили экстракт вздутоплодника сибирского, а также гомогенаты дикорастущих ягодных культур, таких как боярышник, клюква, шиповник; все они содержат много разных биологически активных веществ – флавоноиды, каротиноиды, антоцианы и другие полифенолы.

Цель исследования – определение цитотоксичности дикорастущих ягод и вздутоплодника сибирского, произрастающих в Северо-Восточной Сибири, на культуре клеток рака молочной железы Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) с использованием МТТ-теста.

Материалы и методы. Мы изучили гомогенаты дикорастущих ягодных культур, таких как боярышник даурский (*Crataegus dahurica Koehne*), клюква мелкоплодная (*Oxycoccus microcarpus Turcz.*), шиповник якутский (лат. *Rosa jacutica Juz.*) и экстракт надземной части (листья, стебли) вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus*). Определение цитотоксичности полученных гомогенатов проводили на клеточной линии MCF-7. Для скрининга гомогенатов использовали колориметрический метод оценки метаболической активности клеток в МТТ-тесте.

Результаты. Выявлено, что боярышник даурский, клюква мелкоплодная и шиповник якутский оказывают статистически значимое цитотоксическое воздействие на опухолевые клетки в концентрации 100 мг/мл в инкубационной среде. Из протестированных ягод самым высоким уровнем подавления роста клеток MCF-7 обладал шиповник якутский, который в дозе 100 мг/мл снизил его на 80,19 % по сравнению с контролем. Исследуемый экстракт из вздутоплодника сибирского в концентрации 10 мг/мл оставлял в живых лишь 4,95 % клеток MCF-7.

Заключение. Дикорастущие ягоды обладают антипролиферативным потенциалом и, являясь съедобными, могут быть полезными в профилактике онкологических заболеваний. Высокая антипролиферативная активность вздутоплодника сибирского, выявленная нами в этом и более раннем исследованиях, дает основание рассматривать его как источник эффективных противоопухолевых соединений.

Ключевые слова: клетки рака молочной железы, *Crataegus dahurica Koehne*, *Oxycoccus microcarpus Turcz.*, *Rosa jacutica Juz.*, *Phlojodicarpus sibiricus*, цитотоксичность

Для цитирования: Егоров А.Н., Тихонов Д.Г., Гольдерова А.С. Антипролиферативное воздействие дикорастущих ягод и вздутоплодника сибирского Северо-Восточной Сибири на клетки рака молочной железы MCF-7. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(3):126–32.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-126-132

Antiproliferative effect of wild berries and North-Eastern Siberian bulbous spleen carp on breast cancer cells MCF-7

A.N. Egorov, D.G. Tikhonov, A.S. Golderova

M.K. Ammosov North-Eastern Federal University; 58 Belinskiy St., Yakutsk 677000, Russia

Contacts: Andrey Nikolaevich Egorov *291219942014@mail.ru*

Introduction. Studies have shown that natural compounds from various plants including berries can have antitumor activity. We examined *Phlojodicarpus sibiricus* extract as well as homogenates of wild berries such as hawthorn, cranberry,

brier; all these plants contain a variety of biologically active compounds: flavonoids, carotenoids, anthocyanins and other polyphenols.

Aim. To evaluate cytotoxicity of wild berries and *Phlojodicarpus sibiricus* growing in Northwestern Siberia in Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) breast cancer cell line using the MTT assay.

Materials and methods. We examined homogenates of wild berries including Dahurian hawthorn (*Crataegus dahurica Koehne*), bog cranberry (*Oxycoccus microcarpus Turcz.*), Yakut brier (*Rosa jacutica Juz.*) and extract of the above-ground part (leaves, stems) of *Phlojodicarpus sibiricus*. Cytotoxicity of the prepared homogenates was evaluated on the MCF-7 cell line. For homogenate screening, colorimetric assay for assessing cell metabolic activity MTT was used.

Results. Dahurian hawthorn, bog cranberry and Yakut brier have statistically significant cytotoxic effect on tumor cells at concentration of 100 mg/mL in incubation medium. Among the evaluated berries, Yakut brier demonstrated the highest suppression of MCF-7 cell line growth: at dose 100 mg/mL it decreased it by 80.19 % compared to control. Extract of *Phlojodicarpus sibiricus* at concentration 10 mg/mL left only 4.95 % of the MCF-7 cells alive.

Conclusion. Therefore, wild berries have antiproliferative potential. Being edible, they can be helpful in prevention of oncological diseases. High antiproliferative activity of *Phlojodicarpus sibiricus* demonstrated by us in this and previous studies indicate that it can be considered a source of effective antitumor compounds.

Keywords: breast cancer cells, *Crataegus dahurica Koehne*, *Oxycoccus microcarpus Turcz.*, *Rosa jacutica Juz.*, *Phlojodicarpus sibiricus*, cytotoxicity

For citation: Egorov A.N., Tikhonov D.G., Golderova A.S. Antiproliferative effect of wild berries and North-Eastern Siberian bulbous spleen carp on breast cancer cells MCF-7. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(3):126–32. (In Russ.).

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-126-132

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным онкологическим заболеванием в России и мире [1]. Согласно данным литературы, ягодные культуры богаты биологически активными веществами, такими как флавоноиды, антоцианы, фенольные кислоты и др. Доказано, что антоцианы и флавоноиды ингибируют рост различных опухолевых клеток, препятствуют свободнорадикальным реакциям, влияют на репарацию ДНК, клеточный цикл, пролиферацию, дифференцировку клеток, апоптоз и другие процессы [2, 3].

Несмотря на успехи в лечении онкологических нозологий, поиск эффективных средств профилактики и терапии злокачественных опухолей продолжается. Недостаточно изученным остается противораковая активность ягод и растений, произрастающих в суровых климато-географических условиях Северо-Восточной Сибири, отличительной особенностью которых является морозоустойчивость. В процессе холодовой адаптации осенне-вегетирующих травянистых и древесных растений в условиях Центральной и Северо-Восточной Якутии в их тканях накапливаются не только белки, сахара, антиоксиданты и каротиноиды (β-каротин, пигменты виолаксантинового цикла), выполняющие энергетическую и защитную функции, но и значительное количество триацилглицеринов и полярных липидов, а также их среднецепочечных полиненасыщенных жирных кислот, регулирующих функциональную активность клеточных мембран при низких положительных (I фаза закаливания) и первых отрицательных (II фаза закаливания) температурах [4]. Изучение этих взаимосвязей может способствовать разработке новых подходов в медицине.

Доказано, что потребление фруктов и овощей снижает риск развития рака и способствует профилактике развития злокачественных новообразований. N.P. Bondonno и соавт. показали, что потребление не менее 1000 мг флавоноидов в день достоверно уменьшает риск смертности от рака; при этом данный эффект более выражен у курящих и лиц, употребляющих алкоголь [5].

В литературе недостаточно освещены результаты исследований цитотоксического влияния ягод и растений Северо-Восточной Сибири на клетки РМЖ.

Цель исследования – определить цитотоксическую активность гомогенатов дикорастущих ягод боярышника даурского (*Crataegus dahurica Koehne*), клюквы мелкоплодной (*Oxycoccus microcarpus Turcz.*), шиповника якутского (*Rosa jacutica Juz.*) и вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus*) Северо-Восточной Сибири с использованием МТТ-теста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мы исследовали цитотоксичность натурального гомогената ягод, произрастающих на территории Якутии: шиповника якутского, боярышника даурского, клюквы мелкоплодной, лекарственного растения вздутоплодника сибирского (надземной его части – стеблей, листьев). Культивирование клеточной линии проводили по стандартной методике.

Подготовка плодов дикорастущих ягод, надземной части вздутоплодника для эксперимента. *Rosa jacutica Juz.* собрана 29 августа 2023 г. на берегу реки Суола в урочище Булгунньах Мегино-Кангаласского улуса (Республика Саха (Якутия)) (географические координаты: 61.726348 северной широты, 131.153670 восточной долготы), *Crataegus dahurica Koehne* – 30 августа 2023 г. в пос. Суола (Республика Саха (Якутия))

на приусадебном участке (географические координаты: 61.730708 северной широты, 131.015601 восточной долготы). Заготовка *Oxycoccus microcarpus Turcz.* проведена 12 сентября 2022 г. около пос. Мындагай Чурапчинского улуса (Республика Саха (Якутия)) (географические координаты: 61.651548 северной широты, 133.111543 восточной долготы). После сбора ягоды хранились в морозильнике; перед экспериментом их размораживали. Надземная часть (листья, стебли) *Phlojodicarpus sibiricus* собрана в период цветения в июле 2022 г. в питомнике на территории Ботанического сада Института биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук (г. Якутск).

Культура клеток. В работе использовали эпителиоподобную клеточную линию Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) (ООО «Альгимед», Россия), полученную из инвазивной аденокарциномы протоков молочной железы человека [6]. Данная клеточная линия широко применяется в исследованиях *in vitro* [7]. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1 % пенициллина-стрептомицина-амфотерицина, при 37 °C в CO_2-инкубаторе с влажной атмосферой, содержащей 5 % CO_2. Клеточные линии культивировали до образования монослоя. Для получения клеточной суспензии монослой клеток трипсинизировали, затем трипсин инактивировали питательной средой. Подсчет клеток проводили на визуализаторе Celena S. Каждая лунка 96-луночного планшета содержала 200 мкл питательной среды, в каждую лунку вносили от 3000 до 5000 клеток. Низкая клеточная плотность делает клетки более уязвимыми к токсинам, тогда как высокая плотность может привести к изоляции определенных клеток от воздействия активных веществ [8]. Суспензию клеток вносили в лунки планшета с помощью многоканального дозатора и стерильных наконечников. Планшет с клетками инкубировали в CO_2-инкубаторе в течение 24 ч для пролиферации и адгезии клеток.

Для оценки цитотоксичности мы использовали колориметрический МТТ-тест, отражающий активность митохондриального дыхания жизнеспособных клеток. Данный метод применяется повсеместно для первичного скрининга растительных субстанций [8]. Исследуемые ягодные культуры взвешивали и измельчали, затем добавляли питательную среду в 1- или 10-кратном размере (предел растворимости). Приготовленный раствор помещали на 3D-шейкер, где он находился в движении на протяжении 24 ч. Затем его фильтровали на сетчатых фильтрах (размер сеток 70 мкм). Экстракт вздутоплодника сибирского получали путем последовательного экстрагирования водно-этанольным 70 % (трехкратно) и 96 % (двукратно) растворами. Полученный экстракт упаривали на роторном испарителе до водной фракции, а затем высушивали на лиофильной установке.

В лунки планшета с клетками вносили по 22 мкл раствора гомогената в дозах 100 и 10 мг/мл. В контрольные лунки планшета вместо анализируемого раствора вносили аналогичный объем питательной среды. Клетки с исследуемыми растворами помещали в CO_2-инкубатор на 72 ч. Затем с помощью аспиратора среду осторожно удаляли. Перед этим готовили смесь для МТТ-теста. К 9 мл питательной среды добавляли 1 мл МТТ-реагента (5 мг/мл в растворе Хенкса). Приготовленный раствор вносили в каждую лунку 96-луночного планшета в объеме 100 мкл и инкубировали 3,5 ч. По истечении времени инкубации питательную среду с МТТ-реагентом удаляли с помощью аспиратора, в каждую лунку планшета вносили 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и инкубировали 10 мин. Появившееся фиолетовое окрашивание детектировали на планшетном ридере при 595 нм (референтная длина волны – 650 нм).

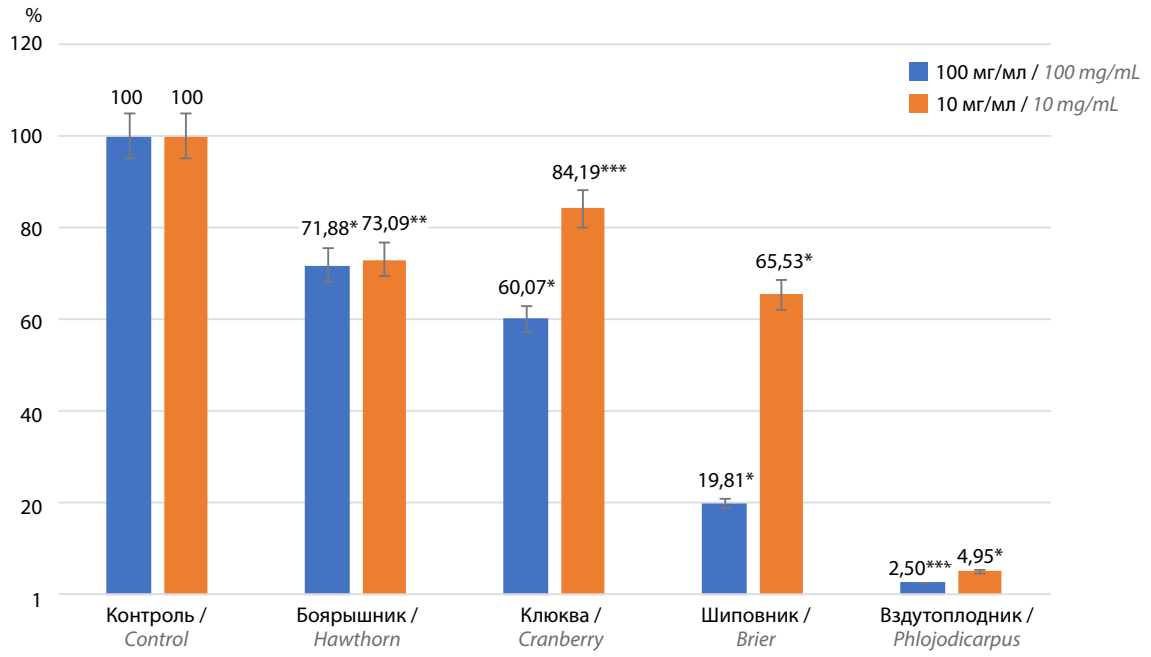
Статистическую обработку результатов проводили с помощью метода однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), также дополнительно использовали *t*-критерий Стьюдента для оценки значимости различий между группами. Анализ данных выполняли с использованием статистического пакета программ GraphPad Prism (версия X.XX, GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Значение показателей в экспериментальной группе выражали в процентах от значений в контрольной группе. Согласно полученным данным гомогенат боярышника даурского в дозе 100 мг/мл уменьшал рост клеток MCF-7 на 28,1 % по сравнению с контролем (p <0,001) (рис. 1). Через 72 ч инкубации в культуре остались 71,9 ± 3,5 % живых клеток. Гомогенат, выделенный из клюквы мелкоплодной, в максимальной дозе проявил умеренную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток: остались живыми 60,1 ± 3,0 % клеток – на 39,9% меньше, чем в контрольной группе (p <0,001). Из испытанных нами дикорастущих ягод Якутии шиповник якутский обладал самым высоким уровнем антипролиферативной активности. При его внесении в культивируемую среду в дозе 100 мг/мл выживаемость опухолевых клеток составила только 19,8 ± 1,8 %, что на 80,2% меньше, чем в контрольной группе (p <0,001).

В ходе анализа антипролиферативной активности вздутоплодника сибирского после 72-часовой инкубации клеток РМЖ с его экстрактом обнаружено резкое снижение их количества до 1,6–3,9 % (среднее количество 2,5 ± 0,3 %). Различия с данными, полученными в контрольной группе, оказались статистически значимыми (см. рис. 1).

Антипролиферативная активность гомогената, полученного из шиповника якутского, в концентрации как 10 мг/мл, так и 100 мг/мл была наиболее высокой.



*Различия статистически значимы при p <0,001. **Различия статистически значимы при p <0,05. ***Различия статистически значимы при p <0,01 /
**Differences are statistically significant at p <0.001. **Differences are statistically significant at p <0,05. ***Differences are statistically significant at p <0.01*

Рис. 1. *Пролиферация клеток рака молочной железы MCF-7 при воздействии натуральных гомогенатов дикорастущих ягод и экстракта вздутоплодника сибирского при инкубации в течение 72 ч. Результаты представлены как средние значения + стандартное отклонение на основе 8 измерений для каждого тестируемого вещества*
Fig. 1. *Proliferation of MCF-7 breast cancer cells under treatment with natural homogenates of wild berries and Phlojodicarpus sibiricus after 72 h incubation. Results are presented as mean + standard deviation of 8 measurements for each tested compound*

Гомогенат, выделенный из боярышника даурского, обладал противоопухолевой активностью в концентрации 10 мг/мл. В низкой концентрации гомогенат, полученный из клюквы мелкоплодной, уступал по способности тормозить рост клеток РМЖ гомогенатам боярышника даурского и шиповника якутского.

При концентрации всех веществ в инкубационной среде, равной 10 мг/мл, регистрировали менее выраженное торможение пролиферативной активности клеток MCF-7, чем при концентрации 100 мг/мл, но различия с показателями в контрольной группе также были статистически значимыми (см. рис. 1).

Обращает на себя внимание сохранение высокой антипролиферативной активности вздутоплодника сибирского при его низкой концентрации (10 мг/мл) в инкубационной среде: выживаемость опухолевых клеток MCF-7 была в 20 раз меньше по сравнению с контролем (p <0,001). Также следует отметить, что при столь существенном снижении концентрации вздутоплодника сибирского (в 10 раз) его цитотоксическая активность по отношению к клеткам MCF-7 уменьшилась только в 2 раза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты были статистически значимыми. Это свидетельствует о том, что влияние гомогенатов *Crataegus dahurica Koehne, Oxycoccus microcarpus Turcz., Rosa jacutica Juz.* и экстракта *Phlojodicarpus sibiricus* на антипролиферативную активность клеточной линии MCF-7 не является случайным и может быть связано с действием активных компонентов.

На территории Якутии произрастают 3 вида шиповника, 2 из которых – *Rosa dahurica Pall.* и *Rosa jacutica Juz.* – схожи друг с другом. Последний отличается тем, что у него полностью отсутствуют железистые опущения, а листья с обеих сторон лишены волосков (голые) [9]. Этот вид шиповника является недостаточно изученным. Наиболее хорошо исследована антиканцерогенная активность шиповника иглистого (*Rosa acicilaris Lindl.*), который широко распространен по всей России. Богатый состав биологически активных соединений, включая флавоноиды, каротиноиды, жирные кислоты, а также высокое содержание витаминов (особенно витамина С) и других ингредиентов определяют фармакологическую активность шиповника. В исследованиях с использованием крыс с химически индуцированными опухолями систематическое введение водного экстракта плодов шиповника оказывало ингибирующее влияние на канцерогенез печени и пищевода, уменьшая частоту хромосомных аберраций в клетках костного мозга животных [10]. В доступной нам литературе мы

не нашли сведений о химическом составе и цитотоксической активности плодов *Rosa jacutica Juz.* Нами впервые получены данные об ингибирующем влиянии плодов этого вида шиповника на пролиферацию опухолевых клеток РМЖ MCF-7. Следует отметить, что плоды *Rosa dahurica Pall.* (близкого к исследуемому нами виду) содержат флавоноиды: гиперозид, рутин, кверцетин и лютеолин [11]. По данным экспериментальных исследований на разных моделях РМЖ, все указанные фитохимические соединения обладают противораковым эффектом [12–15].

В мире насчитывается 280 видов боярышника. На территории Якутии произрастает только один вид этого растения – *Crataegus dahurica Koehne*, который малоизучен. Анализ химического состава *Crataegus* spp. выявил высокие уровни флавоноидов и тритерпеноидов, обладающих широким спектром лечебных свойств [16]. Особенно ценными являются антипролиферативные эффекты, полученные на клеточных линиях рака печени (Hep G2), гормонозависимых (MCF-7) и гормононезависимых (MDA-MB-231) клетках РМЖ [17–19]. Результаты наших исследований продемонстрировали цитотоксическое воздействие вида *Crataegus dahurica Koehne* на опухолевые клетки MCF-7. По данным китайских авторов, цитотоксическое влияние на клетки HepG2 оказывают соединения оксомомеловой и цекропиевой кислот, выделенные из плодов *Crataegus dahurica Koehne* [20].

На территории Якутии произрастают 2 вида клюквы. Один из них – клюква мелкоплодная (*Oxycoccus microcarpus Turcz.*) – распространен по всей территории, является источником полезных веществ, в том числе полифенолов, флавонолов, включая антоцианы, ресвератрол (фитоалексин), содержит умеренное количество витамина С и имеет высокую антиоксидантную активность. Ягоды этого растения обладают жаропонижающим и жаждоутоляющим действиями, обусловленными наличием в нем лимонной кислоты. Некоторые вещества ягод клюквы долго не теряют свои свойства при хранении. Причем это характерно как для самих ягод, так и для продуктов их переработки [21]. Противоопухолевая активность ягод клюквы изучена недостаточно. Они, как и выделенные из них флавонолы – кверцетин (основной флавонол клюквы), проантоцианидины и урсоловая кислота, – обладают противоопухолевым потенциалом *in vitro*, ингибируя пролиферацию, активность матриксных протеиназ и индуцируя апоптоз [22]. Полученные нами данные подтверждают умеренный антипролиферативный потенциал *Oxycoccus microcarpus Turcz.*

Phlojodicarpus sibiricus широко используется в народной медицине Якутии. Это лекарственное растение содержит много биологически активных соединений, таких как флавоноиды, каротиноиды и полифенолы, которые обладают антиоксидантными и противовоспалительными свойствами [23]. В нашей работе мы впервые исследовали цитотоксичность экстракта *Phlojodicarpus sibiricus* в отношении клеток РМЖ MCF-7. Результаты подтвердили, что экстракт этого растения обладает значительным цитотоксическим воздействием на клетки MCF-7, что может указывать на его высокий противоопухолевый потенциал и перспективность для использования в терапии РМЖ. Данные, полученные в ходе проведенных нами ранее исследований, также показали цитотоксическое влияние этого экстракта на клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 [24]. *Phlojodicarpus sibiricus* оказывает минимальное воздействие на выживаемость нормальных клеток костного мозга и селезенки и максимальное цитотоксическое воздействие на клетки большой В-клеточной лимфомы. Этот эффект может быть связан со снижением уровня антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и нарушением мембранного потенциала митохондрий [25]. Соединениями, обладающими антиканцерогенным свойством, могут быть и пиранокумарины [26], которые в большом количестве содержатся во вздутоплоднике сибирском [27]. Таким образом, благодаря своим цитотоксическим свойствам *Phlojodicarpus sibiricus* представляет интерес в качестве перспективного объекта исследований в области противоопухолевой терапии.

Также необходимо выделить из данного растения биологически активные вещества и изучить их противоопухолевую активность как отдельно, так и в комбинации. Это послужит основой для разработки новых противоопухолевых лекарственных препаратов или пищевых добавок для профилактики рака.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные нами эксперименты на клеточной линии РМЖ MCF-7 с использованием натуральных гомогенатов дикорастущих ягод и лекарственного растения позволили выявить статистически значимый цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток боярышника даурского, клюквы мелкоплодной и шиповника якутского в концентрациях 10 и 100 мг/мл в инкубационной среде. Самым высоким уровнем подавления роста клеток MCF-7 обладал шиповник якутский, который в концентрации 100 мг/мл снижал рост опухолевых клеток на 80 % по сравнению с контролем. Широко используемый в народной медицине Северо-Восточной Сибири вздутоплодник сибирский в концентрации 10 мг/мл в ростовой среде оставлял живыми лишь 4,95 % клеток MCF-7.

Таким образом, дикорастущие ягоды и растения Северо-Восточной Сибири обладают антипролиферативным потенциалом и являются перспективными источниками эффективных противоопухолевых субстанций. *Rosa jacutica Juz.*, *Oxycoccus microcarpus Turcz.* и *Crataegus dahurica Koehne*, будучи съедобными растениями, могут использоваться для профилактики развития опухолей, а *Phlojodicarpus sibiricus* требует дальнейшего более углубленного изучения с целью определения содержащихся в нем химических соединений с противоопухолевым эффектом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Тихонов Д.Г., Егоров А.Н., Голубенко М.В. и др. Вариабельность митохондриального генома у больных раком молочной железы в популяции якуток. Сибирский онкологический журнал 2023;22(6):74–82. DOI: 10.21294/1814-4861-2023-22-6-74-82
   Tikhonov D.G., Egorov A.N., Golubenko M.V. et al. Variability of the mitochondrial genome in young Yakut patients with breast cancer. Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology 2023;22(6):74–82. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2023-22-6-74-82
2. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Муфазаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицины. Пущино: Synchrobook, 2013. 310 с.
   Tarahovskiy Yu.S., Kim Yu.A., Abdrasilov B.S., Mufazarov E.N. Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine. Puschino: Synchrobook, 2013. 310 p. (In Russ.).
3. Li D., Wang P., Luo Y. et al. Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: update from recent decade. Crit Rev Food Sci Nutr 2017;57(8):1729–41. DOI: 10.1080/10408398.2015.1030064
4. Угаров Г.С. Теоретические основы гипобиологии. Фундаментальные исследования 2013;6(10):1280–3.
   Ugarov G.S. Theoretical foundations of hypobiology. Fundamentalnie issledovaniya = Basic Research 2013;6(10):1280–3. (In Russ.).
5. Petrov K.A., Dudareva L.V., Nokhsorov V.V. et al. The role of plant fatty acids in regulation of the adaptation of organisms to the cold climate in cryolithic zone of yakutia. J Life Sci 2016;26(5):519–30. DOI: 10.1134/S0041377119050079
6. Bondonno N.P., Dalgaard F., Kyrø C. et al. Flavonoid intake is associated with lower mortality in the Danish Diet Cancer and Health Cohort. Nat Commun 2019;10(1):3651. DOI: 10.1038/s41467-019-11622-x
7. Lee A.V., Oesterreich S., Davidson N.E. MCF-7 cells-changing the course of breast cancer research and care for 45 years. J Natl Cancer Inst 2015;107(7):djv073. DOI: 10.1093/jnci/djv073
8. Lacroix M., Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. Breast Cancer Res Treat 2004;83(3):249–89. DOI: 10.1023/B:BREA.0000014042.54925
9. Gasque K.C.S., Al-Ahj L.P., Oliveira R.C., Magalhães A.C. Cell density and solvent are critical parameters affecting formazan evaluation in MTT assay. Arch Biol Technol 2014;57357(3):381–5. DOI: 10.1590/S1516-89132014005000007
10. Определитель высших растений Якутии. Под ред. А.И. Толмачева. Новосибирск: Наука, 1974. 543 с.
    The determinant of the higher plants of Yakutia. Ed. by A.I. Tolmachev. Novosibirsk: Nauka, 1974. 543 p. (In Russ.).
11. Болиева Л.З., Букреев Ю.М., Власенкова Н.К. и др. Антиканцерогенные и антитоксические свойства водных экстрактов солодки, шиповника, чаги и препарата «томатол». Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):12.
    Bolieva L.Z., Bukreev Y.M., Vlasenkova N.K. et al. Anticarcinogenic and antitoxic properties of aqueous extracts of licorice, rosehip, chaga and the drug "tomato". Rossiiskiy bioterapevticheskiy jurnal = Russian Biotherapeutic Journal 2013;12(2):12. (In Russ.).
12. Song D.I., Zhong F., Zhang X. et al. Simultaneous determination of flavonoids in fruits of *Rosa davurica pall.* by HPLC and measurement of their activities *in vitro*. Food Machinery 2019;35(8):16. DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.08.016
13. Li Q., Xu D., Gu Z. et al. Rutin restrains the growth and metastasis of mouse breast cancer cells by regulating the microRNA-129-1-3p-mediated calcium signaling pathway. J Biochem Mol Toxicol 2021;35(7):e22794. DOI: 10.1002/jbt.22794
14. Ezzati M., Yousefi B., Velaei K., Safa A. A review on anti-cancer properties of Quercetin in breast cancer. Life Sci 2020;248:117463. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117463
15. Ahmed S., Khan H., Fratantonio D. et al. Apoptosis induced by luteolin in breast cancer: Mechanistic and therapeutic perspectives. Phytomedicine 2019;59:152883. DOI: 10.1016/j.phymed.2019.152883
16. Nazhand A., Lucarini M., Durazzo A. et al. Hawthorn (*Crataegus* spp.): an updated overview on its beneficial properties. Forests 2020;11(5):564. DOI: 10.3390/f11050564
17. Basavarajappa G.M., Rehman A., Shiroorkar P.N. et al. Therapeutic effects of Crataegus monogyna inhibitors against breast cancer. Front Pharmacol 2023;14:1187079. DOI: 10.3389/fphar.2023.1187079
18. Wen L., Guo R., You L. et al. Major triterpenoids in Chinese hawthorn "Crataegus pinnatifida" and their effects on cell proliferation and apoptosis induction in MDA-MB-231 cancer cells. Food Chem Toxicol 2017;100:149–60. DOI: 10.1016/j.fct.2016.12.032
19. Kombiyil S., Sivasithamparam N.D. *In vitro* anti-cancer effect of *Crataegus oxyacantha* berry extract on hormone receptor positive and triple negative breast cancers via regulation of canonical wnt signaling pathway. Appl Biochem Biotechnol 2023;195(4):2687–708. DOI: 10.1007/s12010-021-03724-4
20. Gao Y., Zhang C., Yang M., Zhang H. Chemical constituents of the fruits of *Crataegus dahurica* and the antihyperlipidemic activity in HepG2 cells. J Nutr Health Sci 2020;7(2):1–5.
    Борисенков М.Ф., Бакутова Л.А., Пещ А.В. Антиоксидантная активность водных экстрактов плодов клюквы обыкновенной (*Vaccinium oxycocc us L.*), произрастающей на территории Республики Коми. Химия растительного сырья 2013;4:89–90.
    Borisenkov M.F., Bakutova L.A., Pesch A.V. Antioxidant activity of aqueous extracts of cranberry fruits (*Vaccinium oxycoccus L.*), growing on the territory of the Komi Republic. Himiya rastitelnogo sirya = Chemistry of plant raw materials 2013;4:89–90. (In Russ.).
21. Neto C.C. Cranberry and its phytochemicals: a review of *in vitro* anticancer studies. J Nutr 2007;137(1):186S–93S. DOI: 10.1093/jn/137.1.186S
22. Воронов И.В., Филиппова Г.В., Дарханова В.Г. и др. Антирадикальная и антиоксидантная активность экстрактов трех видов лекарственных растений и ряски малой. Природные ресурсы Арктики и Субарктики 2019;24(4):127–33.
    Voronov I.V., Filippova G.V., Darhanova V.G. et al. Antiradical and antioxidant activity of extracts of three types of medicinal plants and duckweed. Prirodnie resursi Arktiki i Subarktiki = Natural Resources of the Arctic and Subarctic;2019(4):127–33. (In Russ.).
23. Golderova S.A., Egorov N.A., Voronov V.I., Gotovtsev A.R. Effect of Phlojodicarpus sibiricus on the proliferative activity of the HepG2 cell line. J Complement Med Res 2023;14(4):62–5. DOI: 10.5455/jcmr.2023.14.04.13
24. Kim J., Kim D.U., Nam J. et al. Anti-lymphoma activities of phlojodicarpus sibiricus and *Artemisia kruhsiana Besser* extracts. Life Sci 2020;30(4):379–85. DOI: 10.5352/JLS.2020.30.4.379
25. Khandy M.T., Sofronova A.K., Gorpenchenko T.Y., Chirikova N.K. Plant pyranocoumarins: description, biosynthesis, application. Plants 2022;11(22):3135. DOI: 10.3390/plants11223135
26. Olennikov D.N., Chirikova N.K. New coumarins of the family *Apiaceae*. I. Khellactone esters from *Phlojodicarpus sibiricus*. Chem Nat Comp 2023;59:842–7. DOI: 10.1007/s10600-023-04131-3

Благодарность. Авторы выражают искреннюю благодарность за помощь в сборе дикорастущих ягод И.Ф. Попову, М.Д. Тихоновой и сотрудникам питомника Ботанического сада Института биологических проблем криолитозоны СО РАН за предоставление образцов вздутоплодника сибирского.
Acknowledgements. The authors are grateful to I.F. Popov for the help in gathering wild berries, to M.D. Tikhonova and staff of the Botanical Garden of the Institute for Biological Problems of Cryolithozone, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, for providing us with *Phlojodicarpus sibiricus* samples.

Вклад авторов
А.Н. Егоров: проведение экспериментов и руководство работой;
Д.Г. Тихонов: разработка концепции, редактирование;
А.С. Гольдерова: написание текста статьи.
Authors' contributions
A.N. Egorov: conducting experiments and guiding the work;
D.G. Tikhonov: concept development, editing;
A.S. Golderova: article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors
А.Н. Егоров / A.N. Egorov: https://orcid.org/0000-0003-4610-7105
Д.Г. Тихонов / D.G. Tikhonov: https://orcid.org/0000-0003-3385-9471
А.С. Гольдерова / A.S. Golderova: https://orcid.org/0000-0002-6739-9453

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

Финансирование. Исследование и публикация выполнены при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-20032).
Funding. The study and publication were performed with financial aid from the Russian Science Foundation (grant No. 22-25-20032).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики
Исследование одобрено локальным комитетом по биомедицинской этике ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова».
Compliance with patient rights and principles of bioethics
The study was approved by the Committee on Biomedical Ethics of M.K. Ammosov North-Eastern Federal University.

Статья поступила: 31.10.2023. **Принята к публикации:** 09.07.2024. **Опубликована онлайн:** 09.10.2024.
Article submitted: 31.10.2023. **Accepted for publication:** 09.07.2024. **Published online:** 09.10.2024.