

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Множественные аспекты влияния
противоопухолевой химиотерапии
на иммунный ответ*

*Модели сарком мягких тканей in vitro:
фундаментальные и клинические
аспекты*

*Тамоксифен и регуляция стресс-
индуцированного старения в клетках
рака молочной железы*

*Метилирование промотора гена MGMT
как прогностический маркер
глиобластомы*

*Экспериментальное тестирование
химиорезистентности опухолевых
клеток рака яичников*



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

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



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

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

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

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

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

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

3 ^{ТОМ 12}
'25

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

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

Адрес редакции:
115478 Москва, Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел.: +7 (499) 929-96-19
E-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

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

Выпускающий редактор

И.В. Пучкова

Корректор Т.Н. Помилуйко

Дизайн: Е.В. Степанова

Верстка: Е.В. Степанова

Служба подписки и распространения
И.В. Шуграева, 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.
2025. Том 12. № 3. 1–132.

© Оформление, верстка.
ООО «ИД «АБВ-пресс», 2025

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

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

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

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

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

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

Карамышева 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)

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

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

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

Лазаревич Наталья Леонидовна, д.б.н., профессор, заведующая отделом иммунохимии НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Мазуренко Наталья Николаевна, д.б.н., профессор, главный научный консультант лаборатории онкогеномики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

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

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

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

Щербачев 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)

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.

FOUNDED IN 2014

3^{VOL. 12}
'25

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 Carcino-
genesis, Floor 3, 24 Kashirskoye
Shosse, Bld. 15, Moscow 115478.
Tel.: +7 (499) 929-96-19

E-mail: abv@abvpress.ru

www.abvpress.ru

Article submission:

on-line at <http://umo.abvpress.ru/jour>
or by e-mail to adv.mol.onc@ronc.ru

Managing editor I.N. Puchkova
Proofreader T.N. Pomiluyko

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
(ITI No. ФЦ77-57560 dated 08 April 2014).*

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

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

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

Uspekhi molekulyarnoy onkologii.
2025. Vol. 12 No. 3. 1–132.

© Design, layout PH "ABV-Press",
2025
Pressa Rossii catalogue index: 93562.

Printed at the Leader Print Ltd
Bld. 16, 13 Perevednovsky 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Mazurenko, Natalia N., DSc, PhD, Professor, 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)

Juriscic, 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)

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

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

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

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

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

При направлении статьи в редакцию журнала «Успехи молекулярной онкологии» авторам необходимо руководствоваться следующими правилами.

1. Общие правила

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

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

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

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- название статьи,
- инициалы и фамилии всех авторов,
- ученые степени, звания, должности, место работы каждого из авторов, а также их ORCID (при наличии),
- полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа,
- адрес учреждения (учреждений) с указанием индекса.

Последняя страница должна содержать сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:

- фамилия, имя, отчество полностью,
- занимаемая должность,
- ученая степень, ученое звание,
- персональный международный идентификатор ORCID (подробнее: <http://orcid.org/>),
- персональный идентификатор в РИНЦ (подробнее: http://elibrary.ru/projects/science_index/author_tutorial.asp),
- контактный телефон,
- адрес электронной почты.

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

Шрифт – Times New Roman, кегль 14, межстрочный интервал 1,5. Все страницы должны быть пронумерованы. Текст статьи начинается со второй страницы.

4. Объем статей (без учета иллюстраций и списка литературы)

Оригинальная статья – не более 12 страниц (большой объем допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции).

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

Ко всем видам статей на отдельной странице должно быть приложено резюме на русском и английском (по возможности) языках. Резюме должно кратко повторять структуру статьи, независимо от ее тематики.

Объем резюме – не более 2500 знаков, включая пробелы. Резюме не должно содержать ссылки на источники литературы и иллюстративный материал.

На этой же странице помещаются ключевые слова на русском и английском (по возможности) языках в количестве от 3 до 10.

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

- введение,
- цель,
- материалы и методы,
- результаты,
- обсуждение,
- заключение (выводы),
- вклад всех авторов в работу,
- конфликт интересов для всех авторов (в случае его отсутствия необходимо указать: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»),
- одобрение протокола исследования комитетом по биоэтике (с указанием номера и даты протокола),

- информированное согласие пациентов (для статей с авторскими исследованиями и описаниями клинических случаев),
- при наличии финансирования исследования – указать его источник (грант и т.д.),
- благодарности (раздел не является обязательным).

7. Иллюстративный материал

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Данные таблиц не должны повторять данные рисунков и текста и наоборот.

Фотографии представляются в форматах TIFF, JPG с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).

Рисунки, графики, схемы, диаграммы должны быть редактируемыми, выполненными средствами Microsoft Office Excel или Office Word.

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подрисуночными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т.д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т.д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подрисуночной подписи. Подписи к рисункам даются на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле.

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

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

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

9. Список литературы

На следующей после текста странице статьи должен располагаться список цитируемой литературы.

Все источники должны быть пронумерованы, нумерация осуществляется строго по порядку цитирования в тексте статьи, не в алфавитном порядке. Все ссылки на источники литературы в тексте статьи обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках начиная с 1 (например, [5]). Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях – не более 20–25, в обзорах литературы – не более 60.

Ссылки должны даваться на первоисточники, цитирование одного автора по работе другого недопустимо.

Включение в список литературы тезисов возможно исключительно при ссылке на иностранные (англоязычные) источники.

Ссылки на диссертации и авторефераты, неопубликованные работы, а также на данные, полученные из неофициальных интернет-источников, не допускаются.

Для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» в английском в тексте). Авторы цитируемых источников должны быть указаны в том же порядке, что и в первоисточнике.

При ссылке на **статьи из журналов** после авторов указывают название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы, DOI статьи (при наличии). При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания, число страниц.

Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.

Общие положения:

- Рассмотрение статьи на предмет публикации занимает не менее 8 недель.
- Все поступающие статьи рецензируются. Рецензия является анонимной.
- Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.
- Редакция не предоставляет авторские экземпляры журнала. Номер журнала можно получить на общих основаниях (см. информацию на сайте).

Материалы для публикации принимаются по адресу онлайн на сайте <http://umo.abvpress.ru/jour>.

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

- А.А. Федоренко, М.Р. Патышева, А.А. Федоров, М.Н. Стахеева, Н.В. Чердынцева, Т.С. Геращенко
Множественные аспекты влияния противоопухолевой химиотерапии на иммунный ответ.8
- В.Е. Шевченко, Т.И. Кушнир, М.В. Гудкова, Н.Е. Арноцкая
Клональный гемопоэз неопределенного потенциала и злокачественные новообразования26
- У.А. Бокова, М.С. Третьякова, П.К. Козлова, А.А. Коробейникова, М.Е. Меняйло,
 Т.С. Геращенко, Е.В. Денисов
Модели сарком мягких тканей *in vitro*: фундаментальные и клинические аспекты36

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Е.И. Михеевич, О.Е. Андреева, Д.В. Сорокин, А.М. Щербаков, П.Б. Копнин,
 М.В. Гудкова, М.А. Красильников
Тамоксифен и регуляция стресс-индуцированного старения в клетках рака молочной железы.46
- А.В. Ласица, М.И. Антипина, Д.А. Назарова, К.А. Рубина, В.Ю. Сысоева, Е.В. Семина
Ген рецептора урокиназы *PLAUR* как регулятор экспрессии генов эпителиально-мезенхимального перехода и миграции клеток глиом и нейробластом57
- И.В. Ботезату, В.Н. Кондратова, А.М. Строганова, С.Л. Дранко, Д.Р. Насхлеташвили,
 А.В. Лихтенштейн
Метилирование промотора гена *MGMT* как прогностический маркер глиобластомы70
- Д.С. Кутилин, О.И. Кит, А.Ю. Максимов, Л.Х. Чалхадян, А.В. Дашков, С.А. Малинин,
 Г.В. Каминский, Т.П. Шкурят
Особенности регуляции транскрипционной активности генов раково-тестикулярных антигенов при раке желудка78
- К.А. Кузин, Т.И. Фетисов, О.А. Власова, Р.И. Князев, Е.Е. Антошина, Л.С. Труханова,
 Т.Г. Горькова, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов
Экспериментальное тестирование химиорезистентности опухолевых клеток рака яичников100
- Е.С. Лылова, В.Г. Попова, К.А. Зимин, А.Ю. Букина, В.А. Нуртдинова, С.С. Шмаков,
 М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов, В.П. Максимова
Молекулярные эффекты пестицидов карбарила, хлорпирифоса, манкоцеба, тирама и пендиметалина в условно-нормальных клетках *in vitro*: генотоксичность, клоногенность и влияние на экспрессию генов, ассоциированных с канцерогенезом116

REVIEWS

<i>A.A. Fedorenko, M.R. Patysheva, A.A. Fedorov, M.N. Stakheyeva, N.V. Cherdyntseva, T.S. Gerashchenko</i> Multiple aspects of the chemotherapy effect on immune response	8
<i>V.E. Shevchenko, T.I. Kushnir, M.V. Gudkova, N.E. Arnotskaya</i> Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and malignant neoplasms	26
<i>U.A. Bokova, M.S. Tretyakova, P.K. Kozlova, A.A. Korobeynikova, M.E. Menyailo, T.S. Gerashchenko, E.V. Denisov</i> In vitro models of soft tissue sarcomas: basic and clinical aspects	36

EXPERIMENTAL REPORTS

<i>E.I. Mikhaevich, O.E. Andreeva, D.V. Sorokin, A.M. Scherbakov, P.B. Kopnin, M.V. Gudkova, M.A. Krasil'nikov</i> Tamoxifen and regulation of stress-induced senescence in breast cancer cells	46
<i>A.V. Lasitsa, M.I. Antipina, D.A. Nazarova, K.A. Rubina, V.Yu. Sysoeva, E.V. Semina</i> Urokinase receptor gene <i>PLAUR</i> as a regulator of epithelial-mesenchymal transition gene expression and migration of glioma and neuroblastoma cells	57
<i>I.V. Botezatu, V.N. Kondratova, A.M. Stroganova, S.L. Dranko, D.R. Naskhletashvili, A.V. Lichtenstein</i> Methylation of <i>MGMT</i> promoter as a prognostic marker of glioblastoma	70
<i>D.S. Kutilin, O.I. Kit, A.Yu. Maksimov, L.Kh. Chalkhakhyan, A.V. Dashkov, S.A. Malinin, G.V. Kaminsky, T.P. Shkurat</i> Features of cancer-testicular antigen genes transcriptional activity regulation in gastric cancer	78
<i>K.A. Kuzin, T.I. Fetisov, O.A. Vlasova, R.I. Knyazev, E.E. Antoshina, L.S. Trukhanova, T.G. Gor'kova, G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov</i> Experimental testing of chemoresistance of ovarian cancer tumor cells	100
<i>E.S. Lylova, V.G. Popova, K.A. Zimin, A.Yu. Bukina, V.A. Nurtdinova, S.S. Shmakov, M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov, V.P. Maksimova</i> Molecular effects of the pesticides carbaryl, chlorpyrifos, mancozeb, thiram, and pendimethalin in conditionally normal cells <i>in vitro</i>: genotoxicity, clonogenicity and effects on the expression of genes associated with carcinogenesis	116

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-8-25>

Множественные аспекты влияния противоопухолевой химиотерапии на иммунный ответ

А.А. Федоренко^{1,2}, М.Р. Патышева¹, А.А. Федоров¹, М.Н. Стахеева¹, Н.В. Чердынцева^{1,2}, Т.С. Герашенко¹

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

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

Контакты: Анастасия Алексеевна Федоренко aafedorenko@onco.tnmc.ru

Химиотерапия злокачественных новообразований направлена на подавление процессов роста и пролиферации опухолевых клеток и является неотъемлемой частью лечения онкологических больных. Наряду с высокой противоопухолевой активностью, цитотоксическое действие химиопрепаратов распространяется и на иммунные клетки, приводя к панцитопении и, как следствие, к ослаблению иммунного ответа. Тем не менее действие химиотерапии на иммунную систему носит комплексный характер, поскольку одновременно с супрессивным влиянием вызывает стимуляцию противоопухолевой активности лимфоидных и миелоидных популяций.

Представленный обзор посвящен анализу и обобщению современных данных о влиянии химиотерапевтических препаратов, применяемых в стандартных схемах противоопухолевой терапии, на функционирование иммунной системы. Рассмотрены супрессорные механизмы действия химиотерапии, включая развитие цитопении. Особое внимание уделено анализу данных о модуляции противоопухолевого иммунного ответа в зависимости от группы химиотерапевтического препарата. Описаны механизмы усиления иммунного распознавания и стимуляции иммунных клеток в ответ на увеличение экспрессии опухолевых антигенов. Представлены сведения о влиянии химиотерапии на опухолевое микроокружение, включая перепрограммирование иммуносупрессорного профиля и активацию эффекторов иммунитета. Обобщенные данные указывают на разнонаправленное воздействие химиотерапии на состояние иммунной системы и ее влияние на формирование противоопухолевого иммунного ответа.

Ключевые слова: химиотерапия, рак, иммунная система, цитотоксичность, противоопухолевый иммунный ответ

Для цитирования: Федоренко А.А., Патышева М.Р., Федоров А.А. и др. Множественные аспекты влияния противоопухолевой химиотерапии на иммунный ответ. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(3):8–25.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-8-25>

Multiple aspects of the chemotherapy effect on immune response

A.A. Fedorenko^{1,2}, M.R. Patysheva¹, A.A. Fedorov¹, M.N. Stakheyeva¹, N.V. Cherdyntseva^{1,2}, T.S. Gerashchenko¹

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

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

Contacts: Anastasia Alekseevna Fedorenko aafedorenko@onco.tnmc.ru

Suppression of tumor cell growth and proliferation is the main goal of chemotherapy which is an integral part of the treatment for cancer patients. In addition to high antitumor activity, the cytotoxic effects of chemotherapeutic agents also extend to immune cells, resulting in pancytopenia and weakened immune response. Nevertheless, the effect of chemotherapy on the immune system is multifaceted, as it simultaneously exerts a suppressive influence while also stimulating the antitumor activity of lymphoid and myeloid populations.

This review focuses on the analysis and generalization of modern data regarding the effects of chemotherapeutic drugs used in standard antitumor therapy regimens on the functioning of the immune system. The suppressive mechanisms of chemotherapy, including the development of cytopenia, are reviewed. Special attention is paid to the analysis of data on modulation of antitumor immune response depending on the class of chemotherapeutic agent. Mechanisms enhancing

immune recognition and stimulating immune cells in response to increased expression of tumor antigens are described. The data regarding the effects of chemotherapy on the tumor microenvironment, including the reprogramming of immunosuppressive profiles and the activation of immune effectors, is presented. The summarized data underscore the dual nature of chemotherapy's effects on the state of the immune system and its influence on the formation of antitumor immune responses.

Keywords: chemotherapy, cancer, immune system, cytotoxicity, antitumor immune response

For citation: Fedorenko A.A., Patysheva M.R., Fedorov A.A. et al. Multiple aspects of the chemotherapy effect on immune response. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(3):8–25. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-8-25>

ВВЕДЕНИЕ

Химиотерапия (ХТ) является одним из основных методов лечения злокачественных новообразований (ЗНО) [1]. Впервые она применена в 40-е годы XX в. для лечения лимфомы с помощью препаратов на основе азотистых ипритов, полученных из химического оружия [2, 3]. Впоследствии были открыты новые химические соединения, обладающие высокой цитотоксической и цитостатической эффективностью и усовершенствованы подходы к подбору комбинаций препаратов, что привело к широкому распространению данного вида лечения.

Основной мишенью ХТ являются быстроделющиеся опухолевые клетки, биологически предрасположенные к усиленной пролиферации [4]. В то же время действие химиотерапевтических препаратов носит лишь частично избирательный характер и затрагивает пролиферирующие в норме популяции клеток — в первую очередь предшественники лимфоидного и миелоидного ростков кроветворения, обеспечивающие локальный и системный иммунные ответы [5]. Однако, наряду с явным негативным влиянием ХТ на иммунные клетки, существуют механизмы активации противоопухолевого иммунного ответа после данной терапии [6–8]. Понимание сложного взаимодействия ХТ и иммунной системы имеет большое значение для оптимизации стратегий лечения рака и минимизации потенциальных побочных эффектов [9].

Цель работы — раскрыть механизмы, лежащие в основе формирования иммуносупрессии и иммуномодуляции, вызванных разными классами химиотерапевтических препаратов, рассмотреть их влияние на ЗНО.

РОЛЬ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЛЕЧЕНИЯ

Известно, что иммунная система влияет на возникновение и рост ЗНО. Еще в 1957 г. Ф.М. Бернет первым выдвинул концепцию иммунного надзора, которая описывает элиминацию опухолевых клеток эффекторами адаптивного иммунитета [10, 11]. Однако позднее стало понятно, что опухоль способна избе-

гать атак иммунной системы. Так, при ЗНО наблюдается снижение иммуногенности ряда опухолевых антигенов. Кроме того, опухоль способна перепрограммировать иммунные клетки в направлении поддержки опухолевого роста.

В 2013 г. сформулирована концепция иммуноредактирования (immunoediting), описывающая основные этапы процесса взаимодействия иммунной системы с опухолью, развитие иммунной толерантности к антигенам опухолевых клеток, и определены основные механизмы ускользания опухоли из-под иммунного надзора: редукция иммунного распознавания, усиление механизмов резистентности к цитотоксическим эффекторам иммунитета и формирование иммуносупрессивного микроокружения [12]. Таким образом, стало понятно, что опухоль адаптируется к условиям среды макроорганизма и сосуществует с иммунной системой, выступающей естественным регулятором ее клональной эволюции. При этом большую роль играет положительная селекция опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксическому действию эффекторов адаптивного иммунитета. В результате формируется активно прогрессирующее ЗНО со сниженной способностью индуцировать полноценный противоопухолевый иммунный ответ [13].

Каждый этап противоопухолевого лечения, действуя локально и системно, выступает значимым фактором, влияющим на прогрессию ЗНО. ХТ может выступать в качестве эффективного стимула, оказывая влияние и на микроокружение, и на компоненты иммунного ответа вне опухоли [14]. Благодаря цитостатическим агентам можно преобразовать иммунологически «холодную» опухоль в «горячую», с обширной воспалительной инфильтрацией, и тем самым разрушить иммунную толерантность опухоли и индуцировать подавление роста ЗНО [15]. Результаты экспериментальных и клинических исследований показали, что с помощью ХТ угнетающее влияние опухоли на иммунную систему можно изменить [16]. Химиотерапевтические препараты способны повреждать опухолевые клетки, что приводит к высвобождению антигенов, в том числе белков-шаперонов, молекул аденозинтрифосфата (АТФ), фрагментов РНК и клеточного матрикса [17, 18]. Это является стимулом

для формирования длительного иммунного ответа за счет иммуногенной клеточной гибели — ключевого процесса, способствующего презентации антигенов опухоллю наивным $CD8^+$ - и $CD4^+$ -Т-лимфоцитам [17, 19]. ХТ также способна избирательно уничтожать супрессорные клеточные популяции, которые подавляют иммунный ответ, такие как Т-регуляторные и миелоидные супрессорные клетки (МСК), опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) и фибробласты [17]. Помимо прямого действия, химиотерапевтические препараты могут влиять на состояние иммунной системы, вызывая обновление пула иммунных клеток из органов депо [19]. В ответ на лимфопению, наиболее часто встречающуюся при ХТ, происходит гомеостатическая пролиферация эффекторных Т-клеток, которые особенно важны в противоопухолевом ответе [20].

Однако, несмотря на существующие механизмы активации противоопухолевого иммунного ответа, ХТ может его ингибировать [21, 22]. Прямое воздействие цитостатических агентов на Т-лимфоциты, естественные клетки-киллеры (НК) и дендритные клетки (ДК) способно привести к нарушению их функциональной активности или апоптозу [14]. Кроме того, ХТ может изменять дифференцировку иммунных клеток и нарушать коммуникацию между ними, что приводит к несостоятельности противоопухолевого иммунного ответа [23].

Также нужно учитывать, что в настоящее время ХТ практически не применяется в монорежиме, что усложняет исследование ее влияния на иммунный ответ. Комбинация эффектов ХТ, так же как и монотерапия, способствует изменению состояния компонентов иммунной системы [24, 25].

Таким образом, изменения, вносимые ХТ, могут как активировать, так и угнетать противоопухолевый иммунный ответ, что, несомненно, значительно влияет на эффективность лечения.

ОБЗОР ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

В настоящее время существует более 100 лекарственных средств, используемых для терапии ЗНО. Они различаются как по химической структуре, так и по механизмам действия. Как правило, химиотерапевтические препараты препятствуют пролиферации опухолевых клеток двумя путями: 1) нарушением структуры ДНК и процессов ее репарации, что приводит к остановке роста и деления клеток (цитостатическое действие); 2) повреждением оболочки, ядра и других компонентов клетки, что способствует апоптозу или некрозу (цитотоксическое действие) [26].

Характер воздействия ХТ на иммунные клетки определяется выбранным препаратом, дозой и схемой его введения. Большинство противоопухолевых агентов повышают иммуногенность опухоли при ее разру-

шении, однако введение высоких доз препаратов может привести к тотальной иммуносупрессии, повторному росту сосудистой сети опухоли и развитию резистентности [27]. В соответствии с рекомендациями Российского общества клинической онкологии (RUSSCO) режимы лечения химиотерапевтическими препаратами подбираются в зависимости от интенсивности дозы, вводимой в единицу времени [28]. Выделяют следующие режимы ХТ, выбор которых зависит как от стадии злокачественного процесса, так и от состояния пациента:

- низкодозная (низкоинтенсивная) ХТ;
- стандартная ХТ (проводится в соответствии с рекомендациями производителей лекарственных средств);
- высокодозная (высокоинтенсивная) ХТ;
- сверхвысокодозная (сверхвысокой интенсивности) ХТ, включающая модификации существующих высокодозных режимов;
- метромная ХТ, предполагающая введение препаратов в значительно меньших максимально переносимых дозах с малыми временными интервалами;
- дозоинтенсивная ХТ, представляющая собой режим с уплотненным введением химиопрепаратов, т. е. с меньшим временным интервалом (2 нед вместо 3 нед), и требующая профилактического использования гранулоцитарного колониестимулирующего фактора роста (GM-CSF).

Для расчета дозы препаратов используют формулы Мостеллера, Дюбуа и Дюбуа в модификации, учитывающие площадь поверхности тела. Продолжительность лечения изменяется в разных циклах ХТ, представляющих собой время от 1-го введения препарата до планируемого следующего. Чаще всего период между курсами введения лекарственных средств составляет 2–3 нед, средняя продолжительность лечения — 4–6 циклов. Помимо различий в дозировках и режимах введения препаратов, есть различия и в подходах к противоопухолевой терапии. Выделяют неoadъювантную (предоперационную) ХТ, которая назначается до проведения радикальной операции с целью уменьшения объема опухоли, и адъювантную (послеоперационную, профилактическую) ХТ, которая проводится после радикальной операции с целью профилактики развития рецидива [29].

Далее будут рассмотрены особенности действия ХТ в неoadъювантном режиме для исключения других факторов воздействия на иммунную систему, таких как хирургическое вмешательство или лучевая терапия. В табл. 1 представлены основные классы химических соединений, которые используются в различных схемах и комбинациях для лечения наиболее распространенных видов солидных опухолей.

Таблица 1. Схемы неоадьювантного лечения, используемые при разных злокачественных новообразованиях
Table 1. Neoadjuvant treatment regimens used for different cancer types

Локализация Location	Класс химиопрепаратов Class of chemotherapeutic drugs	Препарат/схема Drug/regimen	Источник References
Рак легкого Lung cancer	Алкилирующие агенты + растительные алкалоиды; алкилирующие агенты + антиметаболиты Alkylating agents + plant alkaloids; alkylating agents + antimetabolites	Цисплатин + винорелбин; цисплатин + доцетаксел; цисплатин + гемцитабин; карбоплатин + паклитаксел; цисплатин + карбоплатин + пеметрексед Cisplatin + vinorelbine; cisplatin + docetaxel; cisplatin + gemcitabine; carboplatin + paclitaxel; cisplatin + carboplatin + pemetrexed	[30]
Меланома Melanoma	Алкилирующие агенты Alkylating agents	Цисплатин + этопозид; карбоплатин + этопозид; цисплатин/карбоплатин + иринотекан Cisplatin + etoposide; carboplatin + etoposide; cisplatin/carboplatin + irinotecan	[31]
Рак молочной железы Breast cancer	Алкилирующие агенты Alkylating agents	Дакарбазин; темозоломид; ломустин; паклитаксел + карбоплатин; темозоломид + цисплатин Dacarbazine; temozolomide; lomustine; paclitaxel + carboplatin; temozolomide + cisplatin	[32]
Рак молочной железы Breast cancer	Антрациклины + растительные алкалоиды Anthracyclines + plant alkaloids	Доксорубинин + циклофосфамид; доцетаксел; паклитаксел; паклитаксел + карбоплатин Doxorubicin + cyclophosphamide; docetaxel; paclitaxel; paclitaxel + carboplatin	[33]
Рак шейки матки Cervical cancer	Алкилирующие агенты + антиметаболиты; растительные алкалоиды + алкилирующие агенты; растительные алкалоиды + ингибиторы топоизомераз; антиметаболиты; растительные алкалоиды Alkylating agents + antimetabolites; plant alkaloids + alkylating agents; plant alkaloids + topoisomerase inhibitors; antimetabolites; plant alkaloids	Цисплатин; паклитаксел + цисплатин/карбоплатин, паклитаксел; цисплатин + гемцитабин; паклитаксел + топотекан; карбоплатин; этопозид + цисплатин Cisplatin; paclitaxel + cisplatin/carboplatin, paclitaxel; cisplatin + gemcitabine; paclitaxel + topotecan; carboplatin; etoposide + cisplatin	[34]
Рак яичников, первичный рак брюшины, рак маточных труб Ovarian cancer, primary peritoneal cancer, fallopian tube cancer	Растительные алкалоиды + алкилирующие агенты Plant alkaloids + alkylating agents	Паклитаксел + карбоплатин/цисплатин; доцетаксел + цисплатин; паклитаксел + карбоплатин Paclitaxel + carboplatin cisplatin; docetaxel + cisplatin; paclitaxel + carboplatin	[35]
Опухоли головы и шеи Head and neck tumors	Алкилирующие агенты + антиметаболиты Alkylating agents + antimetabolites	Доцетаксел + цисплатин + 5-фторурацил; цисплатин/карбоплатин/доцетаксел Docetaxel + cisplatin + 5-fluorouracil; cisplatin/carboplatin/docetaxel	[36]
Опухоли центральной нервной системы Central nervous system tumors	Алкилирующие агенты Alkylating agents	Темозоломид; темозоломид + карбоплатин; ломустин; кармустин Temozolomide; temozolomide + carboplatin; lomustine; carmustine	[37]
Рак пищевода Esophageal cancer	Алкилирующие агенты + растительные алкалоиды; алкилирующие агенты + антиметаболиты Alkylating agents + plant alkaloids; alkylating agents + antimetabolites	Доцетаксел + цисплатин + 5-фторурацил; фторпириמידин + оксалиплатин; оксалиплатин + капецитабин; доцетаксел + оксалиплатин + лейковорин + 5-фторурацил; цисплатин + 5-фторурацил; цисплатин + капецитабин; доцетаксел + цисплатин + капецитабин Docetaxel + cisplatin + 5-fluorouracil fluoropyrimidine + oxaliplatin; oxaliplatin + capecitabine; docetaxel + oxaliplatin + leucovorin + 5-fluorouracil; cisplatin + fluorouracil; cisplatin + capecitabine; docetaxel + cisplatin + capecitabine	[38]

Окончание табл. I
End of table I

Локализация Location	Класс химиопрепаратов Class of chemotherapeutic drugs	Препарат/схема Drug/regimen	Источник References
Рак желудка Stomach cancer	Алкилирующие агенты + антиметаболиты Alkylating agents + antimetabolites	Оксалиплатин + кальция фолинат + 5-фторурацил; оксалиплатин + капецитабин; доцетаксел + оксалиплатин + лейковорин + 5-фторурацил; оксалиплатин + иринотекан + 5-фторурацил; цисплатин + 5-фторурацил Oxaliplatin + calcium folinate + 5-fluorouracil; oxaliplatin + capecitabine; docetaxel + oxaliplatin + leucovorin + 5-fluorouracil; oxaliplatin + irinotecan + 5-fluorouracil; cisplatin + 5-fluorouracil	[39]
Рак поджелудочной железы Pancreatic cancer	Алкилирующие агенты + ингибиторы топоизомераз + антиметаболиты Alkylating agents + topoisomerase inhibitors + antimetabolites	Оксалиплатин + иринотекан + кальция фолинат + 5-фторурацил Oxaliplatin + irinotecan + calcium folinate + 5-fluorouracil	[40]
Рак ободочной кишки, ректосигмоидного соединения и прямой кишки Colon cancer, rectosigmoid junction cancer, and rectal cancer	Ингибиторы топоизомераз + алкилирующие агенты; алкилирующие агенты + антиметаболиты Topoisomerase inhibitors + alkylating agents; alkylating agents + antimetabolites	Иринотекан + капецитабин; оксалиплатин + капецитабин; иринотекан + 5-фторурацил; фторпириимидины + оксалиплатин Irinotecan + capecitabine; oxaliplatin + capecitabine; irinotecan + 5-fluorouracil; fluoropyrimidine + oxaliplatin	[41]
Герминогенные опухоли Germ cell tumors	Ингибиторы топоизомеразы + алкилирующие агенты; антрациклины + ингибиторы топоизомеразы + алкилирующие агенты Topoisomerase inhibitors + alkylating agents; anthracyclines + topoisomerase inhibitors + alkylating agents	Этопозид + цисплатин; блеомицин + этопозид + цисплатин; цисплатин + этопозид + ифосфамид; паклитаксел + ифосфамид + цисплатин Etoposide + cisplatin; bleomycin + etoposide + cisplatin; cisplatin + etoposide + ifosfamide; paclitaxel + ifosfamide + cisplatin	[42]
Рак мочевого пузыря Bladder cancer	Антиметаболиты + растительные алкалоиды + антрациклины + алкилирующие агенты; алкилирующие агенты + антиметаболиты; антиметаболиты + растительные алкалоиды + алкилирующие агенты Antimetabolites + plant alkaloids + anthracyclines + alkylating agents; alkylating agents + antimetabolites; antimetabolites + plant alkaloids + alkylating agents	Метотрексат + винбластин + доксорубицин + цисплатин; цисплатин + гемцитабин; метотрексат + винбластин + цисплатин + кальция фолинат Methotrexate + vinblastine + doxorubicin + cisplatin; cisplatin + gemcitabine; methotrexate + vinblastine + cisplatin + calcium folinate	[43]
Саркомы мягких тканей Soft tissue sarcomas	Антрациклины + алкилирующие агенты; антиметаболиты + растительные алкалоиды; растительные алкалоиды + ингибиторы топоизомераз Anthracyclines + alkylating agents; antimetabolites + plant alkaloids; plant alkaloids + topoisomerase inhibitors	Доксорубицин + ифосфамид; метотрексат + винорелбин; метотрексат + винбластин; иринотекан; винкристин + доксорубицин + циклофосфамид; темозоломид + иринотекан; винкристин + иринотекан Doxorubicin + ifosfamide; methotrexate + vinorelbine; methotrexate + vinblastine; irinotecan; vincristine + doxorubicin + cyclophosphamide; temozolomide + irinotecan; vincristine + temozolomide + irinotecan; vincristine + irinotecan	[44]

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ

Современные противоопухолевые препараты подразделяют на несколько групп в зависимости от механизма их действия:

- алкилирующие агенты — оксазафосфорины (циклофосфамид и ифосфамид), азотистые иприты (бусульфан, хлорамбуцил и мелфалан), гидразин (темозоломид), агенты на основе платины (цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин);
- антиметаболиты — антагонисты пиримидина (цитарабин, 5-фторурацил, гемцитабин и капецитабин), антагонисты пурина (флударабин), аналоги пурина (6-меркаптопурин, азатиоприн и кладрибин), антифолаты (метотрексат, пеметрексед и пралатрексад), ингибиторы рибонуклеотидредуктазы (гидроксимочевина) и антагонист глутамина (6-диазо-5-оксо-L-норлейкин (ДОН));
- антрациклины — гликозидные препараты (доксорубин, дауномицин, эпирубицин, идарубин, валрубицин, амрубицин, пирарубин, акларубин, никорубин, сабарубин, актиномицин D, блеомицин);

- ингибиторы топоизомераз I (иринотекан и топо-текан) и II (этопозид и тенипозид);
- растительные алкалоиды — ингибиторы митотического веретена, такие как таксаны (доцетаксел и паклитаксел) и алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин) [45–47].

Все перечисленные препараты способны уничтожать опухолевые клетки и стимулировать формирование противоопухолевого иммунного ответа [48, 49]. Однако механизмы, благодаря которым иммунная система вовлекается в борьбу с опухолью, у разных классов химических соединений различны. Иммуносупрессорное и иммуномодулирующее действие основных групп противоопухолевых препаратов представлено в табл. 2.

Алкилирующие агенты. Алкилирующие агенты являются одной из первых открытых и широко используемых в настоящее время групп химиотерапевтических препаратов. Основной механизм их действия связан с образованием ковалентных связей между алкильными и нуклеофильными группами в молекуле ДНК, которые приводят к формированию поперечных сшивок оснований и разрывам цепей ДНК, останавливают репликацию ДНК и вызывают гибель

Таблица 2. Влияние групп химиотерапевтических препаратов на компоненты иммунной системы

Table 2. The impact of groups of chemotherapeutic drugs on components of the immune system

Класс химиопрепаратов Class of chemotherapeutic drugs	Препарат Drug	Механизм действия Mechanism of action	Иммуносупрессия Immunosuppression	Иммуномодуляция Immunomodulation
Алкилирующие агенты Alkylating agents	Циклофосфамид, мелфалан, цисплатин, карбоплатин Cyclophosphamide, melphalan, cisplatin, carboplatin	Создание межцепочечных и внутрицепочечных поперечных связей; перенос алкильных групп на остатки гуанина в ДНК, что приводит к образованию ошибочных пар в основаниях ДНК и предотвращает разделение нитей во время синтеза ДНК Formation of inter- and intra-chain cross-links; transfer of alkyl groups to guanine residues in DNA, leading to erroneous base pairing and prevention of strand separation during DNA synthesis	Нейтро-, лимфоцитопения Neutropenia, lymphopenia	↑ ЦТЛ; ↓ T-per; ↑ МСК; ↑ ДК; перепрограммирование М2-макрофагов в М1-макрофаги ↑ CTL; ↓ Treg; ↑ MDSC; ↑ DC; reprogramming of M2 macrophages into M1 macrophages
Антиметаболиты Antimetabolites	5-фторурацил, капецитабин, гемцитабин, метотрексат, 6-диазо-5-оксо-L-норлейкин 5-fluorouracil, capecitabine, gemcitabine, methotrexate, 6-diazo-5-oxo-L-norleukin	Нарушение основных путей биосинтеза нуклеиновых кислот; нарушение синтеза ДНК/РНК; образование разрывов цепей ДНК посредством ингибирования дигидрофолатредуктазы, рибонуклеотидредуктазы и ДНК-полимеразы; включение ложных структурных аналогов пиримидина/пурина в ДНК Disruption of nucleic acid biosynthesis pathways; inhibition of DNA/RNA synthesis; chain breaks in DNA via inhibition of dihydrofolate reductase, ribonucleotide reductase, and DNA polymerase; incorporation of false pyrimidine/purine analogs into DNA	Лимфоцитопения Lymphopenia	↑ Т-клетки (ЦТЛ, Th17); ↓ T-per; ↓ МСК; перепрограммирование М2-макрофагов в М1-макрофаги ↑ T-cells (CTL, Th17); ↓ Treg; ↓ MDSC; reprogramming of M2 macrophages into M1 macrophages

Окончание табл. 2

End of table 2

Класс химиопрепаратов Class of chemotherapeutic drugs	Препарат Drug	Механизм действия Mechanism of action	Иммуносупрессия Immunosuppression	Иммуномодуляция Immunomodulation
Антрациклины Anthracyclines	Доксорубин, даунорубин Doxorubicin, daunorubicin	Нарушение репликации ДНК; ингибирование активности топоизомеразы; инициация окислительного стресса Disruption of DNA replication; — inhibition of topoisomerase activity; initiation of oxidative stress	Лейкопения Leukopenia	↑ ЦТЛ; ↓ T-reg, Th2; ↓ МСК; ↑ ДК ↑ CTL; ↓ Treg, Th2; ↓ MDSC; ↑ DC
Ингибиторы топоизомераз I и II Topoisomerase I and II inhibitors	Иринотекан, топотекан Irinotecan, topotecan	Ингибирование активности топоизомеразы, участвующей в репликации ДНК; разрыв цепи ДНК Inhibition of topoisomerase activity involved in DNA replication; DNA chain breakage	Лимфоцитопения Lymphopenia	↑ ДК; ↑ ЦТЛ ↑ DC; ↑ CTL
Растительные алкалоиды Plant alkaloids	Доцетаксел, паклитаксел, винбластин, таксол, эпотилон В, трабектедин Docetaxel, paclitaxel, vinblastine, taxol, epothilone B, trabectedin	Изменение функции и формирования микротрубочек веретена; ингибирование ядерного деления (остановка митоза в метафазе) Alteration of microtubule function and spindle formation; inhibition of nuclear division (arrest of mitosis in metaphase)	Нейтропения, лейкопения Neutropenia, leukopenia	↑ ЦТЛ; ↓ T-reg; ↑ ДК; перепрограммирование М2-макрофагов в М1-макрофаги ↑ CTL; ↓ Treg; ↑ DC; reprogramming of M2 macrophages into M1 macrophages

Примечание. ↑ — повышение уровня клеточной популяции; ↓ — снижение уровня клеточной популяции; ДК — дендритные клетки; М1 — противоопухолевые макрофаги; М2 — проопухолевые макрофаги; МСК — миелоидные супрессорные клетки; T-reg — регуляторные Т-клетки; ЦТЛ — цитотоксические Т-лимфоциты.

Note. ↑ — increase in the level of the cell population; ↓ — decrease in the level of the cell population; DC — dendritic cells; M1 — anti-tumor macrophages; M2 — pro-tumor macrophages; MDSC — myeloid-derived suppressor cells; Treg — regulatory T cells; CTL — cytotoxic T-lymphocytes.

клетки [50, 51]. Алкилирующие препараты применяют для лечения лимфом, миелом, глиобластом, рака яичников, молочной железы и легкого [52]. Примерами алкилирующих агентов являются циклофосфамид, мелфалан, цисплатин, карбоплатин и др. [53, 54].

В отношении иммунной системы алкилирующие агенты вызывают следующие эффекты:

- иммуносупрессивный — уничтожают гемопоэтические стволовые клетки, что может привести к долгосрочным изменениям в иммунной системе и ослаблению иммунного ответа [55, 56]. Помимо клеток-предшественников от действия алкилирующих агентов могут пострадать и зрелые делящиеся иммунные клетки, в частности Т- и В-лимфоциты. Во многих работах показано, что введение алкилирующих агентов в высокодозовом режиме может вызывать длительные нейтропению и лимфоцитопению, требующие продолжительного восстановления [57–59]. Продemonстрировано, что циклофосфа-

мид и мелфалан способствуют апоптозу лимфоцитов [60];

- иммуномодулирующий — способны модулировать как врожденные, так и адаптивные противоопухолевые иммунные реакции. Так, некоторые препараты восстанавливают адаптивный иммунный ответ за счет снижения количества иммуносупрессивных клеток. Циклофосфамид даже в метронном режиме способен избирательно уничтожать иммуносупрессивные регуляторные Т-клетки (T-reg), поскольку они активно пролиферируют в ответ на толерогенные стимулы. Кроме того, Т-рег менее устойчивы к действующему агенту в связи с отсутствием экспрессии ABC-транспортера ABCB1, защищающего клетки от токсинов [61, 62]. Помимо Т-рег, циклофосфамид способен снижать и количество МСК [63].

Алкилирующие агенты могут усилить иммунное распознавание опухоли, благодаря восстановлению баланса между мигрирующими и резидентными попу-

ляциями ДК в пользу ДК 1-го типа, которые активно поглощают антигены в дренирующих лимфатических узлах и представляют их цитотоксическим Т-лимфоцитам (ЦТЛ) в отличие от субпопуляции ДК 2-го типа [64, 65]. Кроме того, высокие дозы циклофосамида способны повысить уровень экспрессии генов *TLR*, *MyD88* и *MAPK*, участвующих в регуляции поляризации Th-клеток в Th1, Th2 и Т-рег, но не в Th17 [65].

Циклофосамид и платиносодержащие препараты в экспериментальных моделях и у пациентов способны вызвать перепрограммирование ОАМ с фенотипа поддерживающих опухоль М2-подобных макрофагов на фенотип противоопухолевых М1-подобных макрофагов [66, 67]. Результаты исследования О. Heath и соавт. показали, что после 3 курсов карбоплатина происходит снижение проопухолевых ОАМ с фенотипом CD163⁺ [68]. Кроме того, алкилирующие агенты могут индуцировать выработку множества медиаторов воспаления GM-CSF, интерлейкинов (IL) 1 β , IL-5, IL-10, интерферона γ (INF- γ) и фактора некроза опухоли α (TNF- α), способствующих активации иммунного ответа [69].

Таким образом, помимо развития цитопении, алкилирующие агенты обладают рядом иммуномодулирующих свойств, способствующих активации как врожденного, так и адаптивного иммунных ответов, характеризующихся изменением спектра секретируемых цитокинов и усилением презентации опухолевых антигенов.

Антиметаболиты. Антиметаболиты представляют собой группу лекарственных препаратов, сходных по химической структуре с эндогенными продуктами метаболизма. Они способны конкурентно ингибировать определенные биохимические процессы на синтетической стадии клеточного цикла, что приводит к остановке клеточного деления. В большинстве случаев антиметаболиты нарушают синтез ДНК, ингибируют синтез необходимых для этого ферментов, разрушают РНК и фрагментируют ДНК, что приводит к активации апоптоза [70]. Антиметаболиты эффективны при раке кишечника, яичников и молочной железы [71]. Представители группы: 5-фторурацил (5-ФУ) и его пролекарственная форма капецитабин, гемцитабин, метотрексат, ДОН и др. [54].

На иммунную систему антиметаболиты оказывают следующие эффекты:

- иммуносупрессивный — метотрексат, 5-ФУ и гемцитабин, подавляют быстроразмножающиеся клетки, включая активированные Т- и В-лимфоциты [72]. Во многих работах описано истощение В-лимфоцитов в ответ на действие антиметаболитов [73]. На мышинных моделях мезотелиомы продемонстрировано уменьшение их количества и подавление антигенспецифических реакций IgG [74]. Для популяции Т-лимфоцитов также описано снижение жизнеспособности и пролиферации в ответ на низкие дозы метотрексата, который индуци-

рует апоптоз и генерацию активных форм кислорода (АФК) [75];

- иммуномодулирующий — антиметаболиты могут усиливать противоопухолевый иммунный ответ за счет избирательного воздействия на Т-рег и МСК. Так, гемцитабин селективно истощает Т-рег и МСК, что приводит к увеличению доли эффекторных Т-клеток относительно Т-рег [76, 77]. Метотрексат также снижает количество иммуносупрессивных клеток в опухолевом микроокружении, что способствует увеличению степени инфильтрации CD4⁺-Т-клетками, в частности количества их эффекторных субпопуляций и клеток памяти [78]. Антиметаболиты глутамина, такие как ДОН, способствуют увеличению количества ЦТЛ в строме опухоли и повышению в них экспрессии генов, вовлеченных в процессы пролиферации, цитотоксичности и долговременной иммунологической памяти [79, 80].

Помимо увеличения количества эффекторных популяций Т-лимфоцитов, антиметаболиты способствуют усилению презентации антигенов путем стимуляции созревания ДК, высокоэкспрессирующих HLA-DR, CD80 и CD86 [81]. Кроме того, 5-ФУ повышает экспрессию Fas в опухолевых клетках, делая их более чувствительными к лизису цитотоксическими Т-лимфоцитами [82].

Антиметаболиты способны модулировать секрецию цитокинов в опухолевом микроокружении: увеличивать секрецию IL-6, IL-8, индуцирующих хемотаксис В-клеток, макрофагов и нейтрофилов, а также снижать экспрессию трансформирующего фактора роста β (TGF- β) в опухолевой строме [83]. Кроме того, воздействие 5-ФУ способствует повышению экспрессии белка — маркера провоспалительных М1-подобных макрофагов HLA-DR и секреции проапоптотических цитокинов TRAIL и TNF- α , но не маркера противовоспалительных М2-подобных макрофагов CD163. Также 5-ФУ усиливает фагоцитарную активность макрофагов [84].

Таким образом, антиметаболиты могут оказывать лимфо- и миелосупрессорное действие в отношении делящихся клеток и усиливать противоопухолевый иммунный ответ за счет снижения уровня Т-рег и МСК, усиления презентации опухолевых антигенов Т-клеткам и привлечения эффекторных клеток в строму опухоли.

Антрациклины. Антрациклины представляют собой группу агентов, повреждающих ДНК, широкого спектра действия. Эти препараты нарушают пролиферацию опухолевых клеток и индуцируют апоптоз за счет ряда механизмов, включающих образование свободных радикалов, связывание с липидами клеточных мембран, нарушение работы топоизомеразы II, участвующей в репликации ДНК, и др. [85, 86]. Антрациклины являются одними из самых эффективных химиотерапевтических средств и применяются при многих ЗНО: лейкозах, лимфомах, раке молочной железы, мочевого

пузыря, яичников, нейробластомах и др. [71]. Представителями антрациклинов являются доксорубин (адриамицин), даунорубин и др. [53].

В отношении иммунной системы наблюдаются следующие эффекты антрациклинов:

- иммуносупрессивный — могут подавлять активность иммунной системы за счет цитотоксичности по отношению к быстроделющимся клеткам, включая клетки костного мозга и эффекторные Т- и В-лимфоциты, особенно при высокодозных режимах введения препаратов [87]. Помимо лимфоидных клеток, от действия антрациклинов могут страдать и миелоидные клетки (моноциты и макрофаги), которые также подвергаются апоптозу через активацию сигнальных путей TLR-2/TLR-9-MyD88 [88];
- иммуномодулирующий — могут усиливать противоопухолевый иммунный ответ за счет индукции иммуногенной гибели опухолевых клеток [89, 90]. Так, доксорубин повреждает опухолевые клетки и приводит к выходу сигналов тревоги (damage-associated molecular patterns, DAMPs) — АТФ, кальретикулина и высокомолекулярной группы белков 1 (HMGB1) [81, 90, 91]. Кроме того, результаты доклинических исследований *in vitro* продемонстрировали, что доксорубин повышает экспрессию карциноэмбрионального антигена и молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) на клетках рака молочной железы, что приводит к увеличению цитотоксичности NK-клеток и антигенпрезентирующей функции ДК [92, 93]. Применение доксорубина способствует повышению экспрессии костимулирующих лигандов CD40 и 4-1BB на CD4⁺-Th1-клетках в лимфатических узлах, усилению их пролиферации и стимуляции антиген-специфического иммунного ответа [94]. Лечение доксорубином усиливает антиген-специфическую пролиферацию ЦТЛ в лимфатических узлах, дренирующих опухоль [95].

Известно, что при лечении антрациклинами наблюдается митохондриальная продукция АФК в опухолевых клетках посредством их прямого вмешательства в дыхательную цепь. Увеличение производимых АФК приводит к повреждению митохондрий и последующему апоптозу клетки [96]. Выход АФК из разрушенных опухолевых клеток активирует рецептор P2X7 на фагоцитах, что вызывает секрецию активного IL-1β посредством индукции инфламасом — белковых внутриклеточных комплексов, распознающих молекулы повреждения DAMPs, в частности инфламасомы NLRP3, опосредующей активацию врожденного и адаптивного иммунитета [89]. Указанный каскад реакций приводит к стимуляции высвобождения IL-17 из γδ-Т-клеток, что способствует увеличению инфильтрации продуцирующих IFN-γ ЦТЛ [16, 97]. Так, у больных раком молочной железы наблюдается увеличение количества ЦТЛ и NK-клеток в строме опухоли в ответ на лечение доксорубином [98].

Антрациклины также могут модифицировать иммунный ответ организма за счет изменения спектра секретируемых цитокинов в строме опухоли. Так, доксорубин способен активировать сигнальный путь P38-MAPK, который регулирует синтез воспалительных цитокинов, таких как IL-1β, IL-6 и TNF-α [99]. В дополнение к этому доксорубин и даунорубин запускают системное воспаление за счет увеличения секреции других факторов, таких как G-CSF, CXCL1, CXCL10 и CCL2, которые стимулируют противоопухолевый иммунный ответ путем активации инфламасомы NLRP3 [100]. Помимо влияния на опухолевое микроокружение, доксорубин способен повреждать микрофлору кишечника путем ингибирования топоизомеразы II и выхода липополисахарида из бактериальных клеток этой микрофлоры, который опосредует воспалительную реакцию. Липополисахарид является основным лигандом TLR4 и после прикрепления к своему рецептору вызывает систематическое воспаление посредством активации сигнального пути TNF-α, а также выработки АФК и различных воспалительных цитокинов [101].

Таким образом, антрациклины оказывают множественные эффекты на иммунную систему, в большинстве своем приводящие к усилению противоопухолевого иммунного ответа. Препараты данной группы способны влиять на опухолевое микроокружение, превращая его в иммуногенное за счет привлечения ЦТЛ, ДК и снижения количества иммуносупрессивных клеток. Кроме того, антрациклины индуцируют выработку ключевых воспалительных цитокинов IL-1β, IL-6, TNF-α, G-CSF и CCL2, привлекающих иммунные клетки.

Ингибиторы топоизомераз I и II. Ингибиторы топоизомераз избирательно нарушают структуру ДНК и деление опухолевых клеток в синтетической фазе клеточного цикла. Фермент топоизомеразы играет большую роль в репликации ДНК, транскрипции и сборке суперспиралей хроматина [102]. Ингибирование топоизомераз I и II может вызывать одно- и двуцепочечные разрывы ДНК. Ингибиторы топоизомераз эффективны при раке желудка и кишечника, яичников, легкого и лейкозах [103]. К ним относятся топо-текан, иринотекан и др. [104].

Ингибиторы топоизомераз I и II оказывают следующее влияние на иммунную систему:

- иммуносупрессивное — способны угнетать пролиферацию эффекторных Т-лимфоцитов, повреждая концевые участки ДНК и индуцируя апоптоз [105]. Кроме того, отмечается снижение реакции врожденного иммунитета, а именно подавление фагоцитарной и секреторной активности макрофагов за счет регуляции активности РНК-полимеразы II в генах, индуцированных молекулами повреждения DAMPs [106];
- иммуномодулирующее — способствуют выходу неоантигенов, привлечению ДК и активации презентации опухолевых антигенов Т-лимфоцитам, что стимулирует специфический противоопухолевый иммунный ответ [107].

Согласно результатам исследований, иринотекан и топотекан могут улучшить распознавание Т-клетками опухоли за счет увеличения продукции неоантигенов и повышения экспрессии МНС класса I (МНС-I) [107, 108]. На модели опухолевых клеток меланомы показано, что ингибиторы топоизомеразы I способствуют повышению экспрессии белка TP53INP1, что приводит к усилению цитотоксической функции Т-лимфоцитов, распознающих белок p53 на поверхности трансформированных клеток [109].

На мышинной модели рака легкого (ТС-1) продемонстрировано, что топотекан способствует созреванию ДК из моноцитов опухолевого микроокружения через рецептор CSF1R. Такие ДК характеризуются белковой экспрессией маркеров $\text{Ly6C}^+\text{MHC-II}^+\text{CD11c}^{\text{hi}}\text{CD64}^{\text{hi}}$ и активно участвуют в презентации антигенов Т-лимфоцитам [110]. Помимо активации эффекторов иммунитета, ингибитор топоизомеразы I иринотекан уменьшает количество Т-рег в лимфатических узлах и опухолевом микроокружении, а также повышает уровень экспрессии МНС-I на опухолевых клетках [111].

Таким образом, ингибиторы топоизомераз способствуют активации антиген-специфического противоопухолевого иммунного ответа за счет процессинга неоантигенов, увеличения количества и активности ДК и привлечения ЦТЛ в опухолевое микроокружение.

Растительные алкалоиды. Растительные алкалоиды, также называемые ингибиторами митоза, прерывают М-фазу клеточного цикла, воздействуя на микротрубочки веретена деления и некоторых белков-ферментов [112, 113]. Кроме того, они способны ингибировать топоизомеразу ДНК. Растительные алкалоиды начали широко применяться в противоопухолевом лечении с 90-х годов XX в. [114]. Сейчас их активно используют для лечения рака молочной железы и легкого, а также миеломы, лимфомы и лейкомии [71]. К препаратам этого класса относят таксаны, такие как паклитаксел и доцетаксел, алкалоиды барвинка, такие как винбластин, и соединения различной природы — таксол, эпотилон В, трабектедин [71].

В отношении иммунной системы наблюдаются следующие эффекты растительных алкалоидов:

- иммуносупрессивный — в большинстве случаев растительные алкалоиды, особенно таксаны, приводят к снижению количества делящихся иммунных клеток. Так, доцетаксел, используемый в монорежиме или в комбинации с другими препаратами, очень часто вызывает тяжелую нейтропению (анемию и лейкопению), реже — тромбоцитопению [115, 116];
- иммуномодулирующий — обладают рядом иммуномодулирующих эффектов, способствующих формированию активного противоопухолевого ответа [117]. Так, паклитаксел запускает мощный провоспалительный ответ, опосредованный активацией фермента цикло-ГМФ-АМФ-синтазы — стимулятора генов интерферона (STING), что приводит к активации сигнальных каскадов, связанных

с действием интерферона [118]. Растительные алкалоиды способствуют улучшению созревания и функциональной активности ДК [119]. Результаты исследования L.W. Pfannenstiel и соавт. показали, что низкие дозы паклитаксела в модели *in vivo* усиливают созревание ДК из предшественников путем активации TLR-4, что в конечном счете способствует эффективному праймингу ЦТЛ [120]. Кроме того, паклитаксел может повышать активность ЦТЛ за счет регуляции экспрессии рецепторов маннозо-6-фосфата на поверхности опухолевых клеток [121]. Также данный препарат способен усиливать экспрессию костимуляционных молекул CD80, CD86 и CD40 на ДК, которые связываются с CD28 на поверхности Т-лимфоцитов и необходимы для их активации [119]. Эпотилон В, таксол и винбластин повышает экспрессию молекул МНС-I, что приводит к увеличению презентации антигенов и иммуногенности опухоли [122]. Помимо вышеуказанных эффектов, паклитаксел может изменять спектр секретируемых цитокинов. Так, он связывается с рецептором TLR4, стимулируя ОАМ секретировать провоспалительные цитокины, привлекающие антигенпрезентирующие клетки в строму опухоли [123]. Активация паклитакселем транскрипционного ядерного фактора κB (NF- κB) в опухолевых клетках инициирует выработку различных цитокинов, таких как IL-1, -6 и -8 [124, 125]. Также известно, что таксаны могут стимулировать выработку TNF- α — регулятора воспалительного иммунного ответа — в опухолевых клетках молочной железы и яичников [126]. У больных раком молочной железы, получающих лечение паклитакселем или доцетакселем, наблюдаются повышение уровней IFN- γ , IL-2, IL-6 и GM-CSF в сыворотке крови и увеличение цитотоксической активности NK-клеток [127].

Таксаны также могут изменять опухолевое микроокружение, оказывая антиангиогенное действие, вызывая апоптоз опухолевых клеток и снижая количество иммуносупрессорных МСК [128]. Трабектедин в дополнение к своему цитотоксическому эффекту на опухолевые клетки посредством связывания ДНК проявляет избирательную цитотоксичность против ОАМ, что приводит к резкому снижению их плотности и секреции цитокинов, способствующих росту опухоли, IL-6, CCL2, CXCL8, VEGF у пациентов с саркомами [129, 130]. На мышинной модели карциномы яичников показано, что трабектедин снижает уровень хемокинового лиганда CCL2, отвечающего за привлечение моноцитов в строму опухоли [130].

Таким образом, растительные алкалоиды, в частности таксаны, помимо цитотоксического действия обладают широким иммуномодулирующим потенциалом. Они способствуют изменению состава опухолевого микроокружения за счет снижения уровня цитокинов, благоприятствующих росту опухолевых клеток, увели-

чения созревания ДК, привлечения ЦТЛ и усиления реализации противоопухолевого иммунного ответа.

Таким образом, можно выделить общие молекулярные механизмы действия разных групп химиотерапевтических препаратов, в числе которых:

- подавление роста и деления пролиферирующих иммунных клеток, приводящее к панцитопении, ослаблению клеточного и гуморального иммунных ответов;
- повреждение опухолевых клеток и высвобождение факторов повреждения DAMPs (кальретикулина, белков теплового шока, АТФ, HMGB1 и др.), стимулирующих презентацию опухолевых антигенов иммунным клеткам на поверхности МНС-I;

- локальная продукция GM-CSF, CCL2, CXCL8, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), IL-10 и пролиферация клеток опухоли и эндотелиоцитов в ответ на повреждение опухолевых клеток;
- активация адаптивного иммунитета за счет увеличения созревания ДК и усиления антигенной презентации;
- перепрограммирование опухолевого микроокружения за счет увеличения уровня факторов воспаления, активации цитотоксических Т-лимфоцитов и снижения количества проопухолевых макрофагов и иммуносупрессивных клеток (Т-рег, МСК);
- обновление пула иммунных клеток в циркуляции за счет выхода гемопоэтических клеток-предшественников из органов депо (рис. 1).

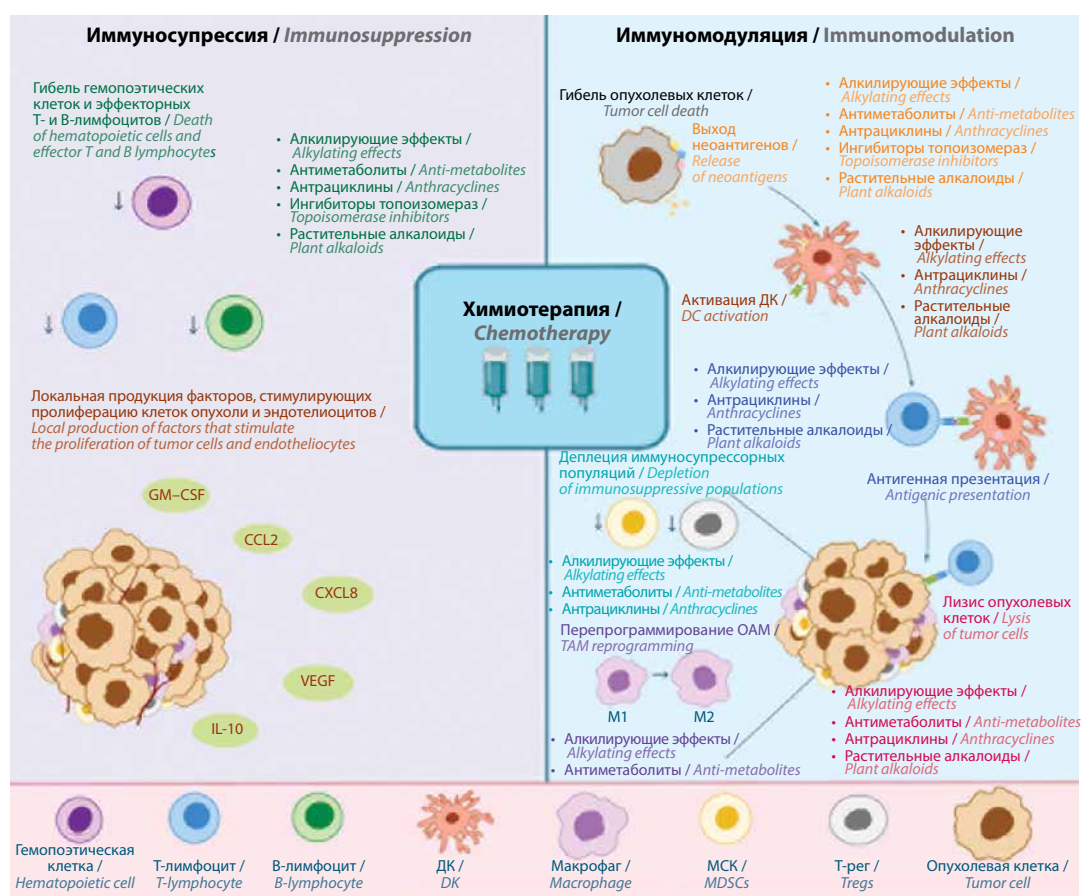


Рис. 1. Основные механизмы действия химиотерапевтических препаратов на иммунную систему. Иммуносупрессорные эффекты: цитопения эффекторов адаптивного иммунитета; гибель гемопоэтических клеток; продукция гранулоцитарного колониестимулирующего фактора роста (GM-CSF), CCL2, CXCL8, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), интерлейкина 10 (IL-10), стимулирующих пролиферацию клеток опухоли и эндотелиоцитов. Иммуномодуляторные эффекты: высвобождение опухолевых антигенов и молекул повреждения клеток, способствующих созреванию и активации дендритных клеток (ДК); усиление презентации антигенов Т-лимфоцитам; увеличение частоты распознавания опухолевых клеток, за которым следует их цитотоксическое уничтожение; истощение иммуносупрессивных клеток, включая миелоидные супрессорные (из M2-подобных в M1-подобные). ОАМ — опухолеассоциированные макрофаги

Fig. 1. The main mechanisms of chemotherapeutic drugs action on the immune system. Immunosuppressive effects: cytopenia of adaptive immunity effectors, apoptosis of hematopoietic cells; production of granulocyte colony stimulating growth factor (GM-CSF), CCL2, CXCL8, vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin 10 (IL-10) stimulating proliferation of tumor cells and endothelial cells. Immunomodulatory effects: release of tumor antigens and damage-associated molecular patterns (DAMPs) promoting maturation and activation of dendritic cells (DCs); enhancement of antigen presentation to T-lymphocytes; increase in the frequency of tumor cell recognition followed by their cytotoxic destruction; depletion of immunosuppressive cells, including myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and regulatory T cells (Tregs); reprogramming of anti-inflammatory macrophage populations into pro-inflammatory ones (from M2-like to M1-like phenotypes). TAM — tumor-associated macrophages

Основным результатом иммуносупрессивного действия ХТ является лейкопения, тогда как стимуляция иммунного ответа может происходить разными путями. Тем не менее подавление компонентов врожденного и адаптивного иммунитета носит генерализованный характер, что определяет удельный вес иммуносупрессии в реализации противоопухолевого иммунного ответа.

ЗАВИСИМОСТЬ ХИМИОИНДУЦИРОВАННОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ОТ СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

В настоящее время широко признано, что для оптимизации эффектов ХТ необходима компетентная иммунная система, которая характеризуется способностью распознавать и нейтрализовывать различные антигены [131]. Формирование полноценного иммунного ответа зависит от точной коммуникации и передачи сигналов между различными популяциями иммунных клеток. Так, в случае адаптивного иммунного ответа требуются привлечение антигенпрезентирующих клеток в очаг воспаления, процессинг антигенов и их презентация в лимфатических узлах для активации антиген-специфических Т-клеток [132]. Известно, что ХТ может нарушить эту коммуникационную сеть, вмешиваясь в сигнальные пути иммунных клеток [133]. Кроме того, она способна модулировать экспрессию и функцию молекул иммунных контрольных точек, которые регулируют активацию и толерантность этих клеток [134]. Нарушение коммуникационных путей может привести к неправильной регуляции иммунных реакций, истощению иммунных клеток и снижению противоопухолевого иммунитета. Следовательно, в случае некомпетентной иммунной системы больного цитотоксическое действие ХТ будет преобладать над компенсаторными механизмами восполнения пула иммунных клеток и противоопухолевой иммунной активацией, что значительно повлияет на исход лечения [135].

В связи с вышесказанным важно учитывать показатели состояния иммунной системы каждого пациента перед назначением ХТ, в числе которых иммунный статус, цитокиновый и интерфероновый профили [136]. Оценка нарушений в соотношении иммунорегуляторных популяций Т-лимфоцитов, а также количества и функциональной активности НК-клеток позволяет установить несостоятельность того или иного звена иммунной системы и определить потенциальные возможности укрепления иммунных функций [137]. Неоднократно показано, что развитие опухолевого процесса сопряжено с количественным дисбалансом основных клеток адаптивного иммунитета, а также нарушением регуляции и снижением функциональной активности врожденного иммунного ответа [138–140]. Следовательно, учет особенностей состояния иммунной системы больных имеет большой потенциал для предиктивной оценки ответа на лечение и более того, может использоваться для создания

комбинированных схем терапии, основанных на применении ХТ с иммуномодулирующими препаратами.

В последнее время стали разрабатываться терапевтические стратегии смягчения иммуносупрессии, опосредованной ХТ, которые основаны на использовании иммуномодулирующих агентов в качестве адъювантов к этой терапии, направленных на поддержание и усиление иммунной функции [141]. Известно, что цитокины являются главными медиаторами межклеточных взаимодействий, которые определяют тип и длительность иммунного ответа [142]. Пр продемонстрировано применение иммуностропных препаратов, содержащих IL-1, -2, -4, интерфероны и GM-CSF, которые способствуют поддержанию иммунного ответа путем активации различных сигнальных путей в эффекторных клетках, таких как JAK1, STAT, TYK2 и MAPK [143]. Так, применение комбинированной схемы ХТ и препарата на основе рекомбинантного фактора некроза опухоли-тимозин- α 1 (TNF- α -T) увеличивает частоту развития патоморфологической регрессии опухолей молочных желез [144]. Рекомбинантный IFN- γ также может рассматриваться как потенциальный адъювант при комбинированной терапии ЗНО [145, 146]. Известны случаи успешного ингаляционного применения цитокиновых лекарственных препаратов для профилактики развития метастазов в легких у больных раком молочной железы [147].

Представленные данные подчеркивают необходимость интеграции иммуномониторинга и динамического контроля иммунного статуса пациентов при планировании ХТ. В будущем нужно продолжить исследование основных механизмов реализации иммунного ответа у онкологических больных, изучить новые комбинированные методы лечения и разработать целевые вмешательства для минимизации подавления иммунитета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Химиотерапия является не только эффективным методом противоопухолевого лечения, но и важным регулятором иммунных реакций. Наряду с усилением иммуносупрессии, она повышает иммуногенность опухоли посредством ряда взаимодополняющих механизмов, направленных на усиление активности эффекторных клеток [148]. В целях максимизации биологического эффекта ХТ необходима качественная оценка ее влияния на функциональное состояние иммунной системы. Большую роль в этом играет предварительная оценка иммунологических нарушений у больных с ЗНО, на основании которой следует подбирать схему ХТ. Для усиления эффективности лечения также возможна комбинация ХТ с иммунотерапией, в основе которой должен лежать анализ иммунологических показателей. Использование правильно подобранной комбинации с учетом индивидуальных иммунных параметров пациентов позволит значительно усилить терапевтический эффект за счет сонаправленного иммуностимулирующего действия препаратов [149, 150].

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

- Anand U., Dey A., Chandel A.K.S. et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes Dis* 2023;10(4):1367–401. DOI: 10.1016/j.gendis.2022.02.007
- Albert A. Chemotherapy: history and principles. In: *Selective toxicity: the physico-chemical basis of therapy*. Ed. by A. Albert. Dordrecht: Springer Netherlands, 1985. Pp. 206–265.
- Morrison W.B. Cancer chemotherapy: an annotated history. *J Vet Intern Med* 2010;24(6):1249–62. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2010.0590.x
- Sharma A., Jasrotia S., Kumar A. Effects of chemotherapy on the immune system: implications for cancer treatment and patient outcomes. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2024;397(5):2551–66. DOI: 10.1007/s00210-023-02781-2
- Vorontsova A., Kan T., Raviv Z. et al. The dichotomous role of bone marrow derived cells in the chemotherapy-treated tumor microenvironment. *J Clin Med* 2020;9(12):3912. DOI: 10.3390/jcm9123912
- Galsky M.D., Guan X., Rishipathak D. et al. Immunomodulatory effects and improved outcomes with cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy plus atezolizumab in urothelial cancer. *Cell Rep Med* 2024;5(2):101393. DOI: 10.1016/j.xcrm.2024.101393
- Mukherjee O., Rakshit S., Shanmugam G. et al. Role of chemotherapeutic drugs in immunomodulation of cancer. *Curr Res Immunol* 2023;4:100068. DOI: 10.1016/j.crimmu.2023.100068
- Galluzzi L., Humeau J., Buqué A. et al. Immunostimulation with chemotherapy in the era of immune checkpoint inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol* 2020;17(12):725–41. DOI: 10.1038/s41571-020-0413-z
- Shin D.S., Ribas A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? *Curr Opin Immunol* 2015;33:23–35. DOI: 10.1016/j.coi.2015.01.006
- Burnet M. Cancer – a biological approach. I. The processes of control. II. The Significance of somatic mutation 1957;1(5022):779–86. DOI: 10.1136/bmj.1.5022.779
- Burnet F.M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970;13(1):1–27. DOI: 10.1159/000386035
- Vesely M.D., Schreiber R.D. Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Ann NY Acad Sci* 2013;1284(1):1–5. DOI: 10.1111/nyas.12105
- Gerashchenko T., Frolova A., Patysheva M. et al. Breast Cancer immune landscape: interplay between systemic and local immunity. *Adv Biol (Weinh)* 2024;8(7):e2400140. DOI: 10.1002/adbi.202400140
- Galluzzi L., Senovilla L., Zitvogel L. et al. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11(3):215–33. DOI: 10.1038/nrd3626
- Wang L., Geng H., Liu Y. et al. Hot and cold tumors: immunological features and the therapeutic strategies. *MedComm (2020)* 2023;4(5):e343. DOI: 10.1002/mco2.343
- Opzoomer J.W., Sosnowska D., Anstee J.E. et al. Cytotoxic Chemotherapy as an immune stimulus: a molecular perspective on turning up the immunological heat on cancer. *Front Immunol* 2019;10:1654. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01654
- Merlano M.C., Denaro N., Galizia D. et al. How chemotherapy affects the tumor immune microenvironment: a narrative review. *Biomedicine* 2022;10(8):1822. DOI: 10.3390/biomedicine10081822
- Zhang J., Pan S., Jian C. et al. Immunostimulatory properties of chemotherapy in breast cancer: from immunogenic modulation mechanisms to clinical practice. *Front Immunol* 2021;12:819405. DOI: 10.3389/fimmu.2021.819405
- Kroemer G., Galassi C., Zitvogel L. et al. Immunogenic cell stress and death. *Nat Immunol* 2022;23(4):487–500. DOI: 10.1038/s41590-022-01132-2
- Kroemer G., Galluzzi L., Kepp O. et al. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* 2013;31:51–72. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-100008
- Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F. et al. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest* 2008;118(6):1991–2001. DOI: 10.1172/jci35180
- Russo M., Panini N., Fabbizio P. et al. Chemotherapy-induced neutropenia elicits metastasis formation in mice by promoting proliferation of disseminated tumor cells. *Oncoimmunology* 2023;12(1):2239035. DOI: 10.1080/2162402x.2023.2239035
- Sistigu A., Yamazaki T., Vacchelli E. et al. Cancer cell–autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat Med* 2014;20(11):1301–9. DOI: 10.1038/nm.3708
- Benson Z., Manjili S.H., Habibi M. et al. Conditioning neoadjuvant therapies for improved immunotherapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 2017;145:12–7. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.08.007
- Patysheva M., Larionova I., Stakheyeva M. et al. Effect of early-stage human breast carcinoma on monocyte programming. *Front Oncol* 2021;11:800235. DOI: 10.3389/fonc.2021.800235
- Романов Б.К., Дмитриева Н.Б., Зацепилова Т.А. Противоопухолевые препараты. *Medical Journal of the Russian Federation, Russian Journal* 2018;24(3):146–50. DOI: 10.18821/0869-2106-2018-24-3-146-150
- Romanov B.K., Dmitrieva N.B., Zatsopilova T.A. Antitumor drugs. *Medical Journal of the Russian Federation, Russian Journal* 2018;24(3):146–50. (In Russ.). DOI: 10.18821/0869-2106-2018-24-3-146-150
- Wu J., Waxman D.J. Immunogenic chemotherapy: dose and schedule dependence and combination with immunotherapy. *Cancer Lett* 2018;419:210–21. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.01.050
- Трякин А.А., Бесова Н.С., Волков Н.М. и др. Общие принципы противоопухолевой лекарственной терапии. *Злокачественные опухоли* 2024;14(3s2–1):33–46. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-01
- Трякин А.А., Бесова Н.С., Волков Н.М. et al. General principles of antitumor drug therapy. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors* 2024;14(3s2–1):33–46. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-01
- Трякин А.А., Бесова Н.С., Волков Н.М. и др. Практические рекомендации по общим принципам проведения противоопухолевой лекарственной терапии. *Злокачественные опухоли* 2020;10(3s2–1):26–39. DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-01
- Трякин А.А., Бесова Н.С., Волков Н.М. et al. Practical recommendations on the general principles of antitumor drug therapy. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors* 2020;10(3s2–1):26–39. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-01
- Лактионов К.К., Артамонова Е.В., Бредер В.В. и др. Мелкоклеточный рак легкого. *Злокачественные опухоли* 2024;14(3s2–1):65–104. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-04
- Laktionov K.K., Artamonova E.V., Breder V.V. et al. Non-small cell lung cancer. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors* 2024;14(3s2–1):65–104. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-04
- Чубенко В.А., Бычков М.Б., Денгина Н.В. и др. Мелкоклеточный рак легкого. *Злокачественные опухоли* 2024;14(3s2–1):105–114. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-05
- Chubenko V.A., Bychkov M.B., Dengina N.V. et al. Small cell lung cancer. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors* 2024;14(3s2–1):105–14. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-05
- Строяковский Д.Л., Абрамов М.Е., Демидов Л.В. и др. Меланома кожи. *Злокачественные опухоли* 2024;14(3s2):300–29. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-12
- Stroyakovskiy D.L., Abramov M.E., Demidov L.V. et al. Melanoma of the skin. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors* 2024;14(3s2):300–29. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-12

33. Тюляндин С.А., Артамонова Е.В., Жигулев А.Н. и др. Рак молочной железы. Злокачественные опухоли 2024;14(3s2–2):32–81. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-01
Tyulandin S.A., Artamonova E.V., Zhigulev A.N. et al. Breast cancer. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors 2024;14(3s2–2):32–81. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-01
34. Хохлова С.В., Кравец О.А., Морхов К.Ю. и др. Рак шейки матки. Злокачественные опухоли 2024;14(3s2–2):136–64. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-05
Khokhlova S.V., Kravets O.A., Morkhov K.Yu. et al. Cervical cancer. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors 2024;14(3s2–2):136–64. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-05
35. Покатаев И.А., Дудина И.А., Коломиец Л.А. и др. Рак яичников, первичный рак брюшины и рак маточных труб. Злокачественные опухоли 2024;14(3s2–2):82–101. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-02
Pokataev I.A., Dudina I.A., Kolomiets L.A. et al. Ovarian cancer, primary peritoneal cancer, and fallopian tube cancer. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors 2024;14(3s2–2):82–101. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-02
36. Болотина Л.В., Владимиров Л.Ю., Деньгина Н.В. и др. Опухоли головы и шеи. Злокачественные опухоли 2024;14(3s2–1):160–82. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-09
Bolotina L.V., Vladimirova L.Yu., Dengina N.V. et al. Tumors of the head and neck. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors 2024;14(3s2–1):160–82. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-09
37. Улитин А.Ю., Желудкова О.Г., Иванов П.И. и др. Первичные опухоли центральной нервной системы. Злокачественные опухоли 2024;14(3s2–1):183–211. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-10
Ulitin A.Yu., Zheludkova O.G., Ivanov P.I. et al. Primary tumors of the central nervous system. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors 2024;14(3s2–1):183–211. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-10
38. Трякин А.А., Бесова Н.С., Волков Н.М. и др. Рак пищевода и пищеводно-желудочного перехода. Злокачественные опухоли 2024;14(3s2–1):221–240. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-12
Tryakin A.A., Besova N.S., Volkov N.M. et al. Cancer of the esophagus and esophageal-gastric junction. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors 2024;14(3s2–1):221–40. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-12
39. Бесова Н.С., Болотина Л.В., Гамаюнов С.В. и др. Рак желудка. Злокачественные опухоли 2024;14(3s2–1):241–62. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-13
Besova N.S., Bolotina L.V., Gamaunov S.V. et al. Stomach cancer. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors 2024;14(3s2–1):241–62. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-13
40. Кудашкин Н.Е., Гладков О.А., Загайнов В.Е. и др. Рак поджелудочной железы. Злокачественные опухоли 2024;14(3s2–1):404–15. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-18
Kudashkin N.E., Gladkov O.A., Zagainov V.E. et al. Pancreatic cancer. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors 2024;14(3s2–1):404–15. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-18
41. Федянин М.Ю., Гладков О.А., Гордеев С.С. и др. Рак ободочной кишки, ректосигмоидного соединения и прямой кишки. Злокачественные опухоли 2024;14(3s2–1):263–322. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-14
Fedyanin M.Yu., Gladkov O.A., Gordeev S.S. et al. Cancer of the colon, rectosigmoid junction and rectum. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors 2024;14(3s2–1):263–322. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-14
42. Матвеев В.Б., Волкова М.И., Гладков О.А. и др. Герминогенные опухоли у мужчин. Злокачественные опухоли 2024;14(3s2–2):267–99. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-11
Matveev V.B., Volkova M.I., Gladkov O.A. et al. Germinogenic tumors in men. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors 2024;14(3s2–2):267–99. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-11
43. Румянцев А.А., Булычкин П.В., Волкова М.И. и др. Рак мочевого пузыря. Злокачественные опухоли 2024;14(3s2–2):221–41. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-09
Rumyantsev A.A., Bulychkin P.V., Volkova M.I. et al. Bladder cancer. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors 2024;14(3s2–2):221–41. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-09
44. Егоренков В.В., Бохян А.Ю., Конев А.А. и др. Саркомы мягких тканей. Злокачественные опухоли 2024;14(3s2–2):393–413. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-15
Egorenkov V.V., Bokhyan A.Yu., Konev A.A. et al. Soft tissue sarcomas. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors 2024;14(3s2–2):393–413. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-15
45. Bukowski K., Kciuk M., Kontek R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. Int J Mol Sci 2020;21(9):3233. DOI: 10.3390/ijms21093233
46. Olofinson K., Abrahamse H., George B.P. Therapeutic role of alkaloids and alkaloid derivatives in cancer management. Molecules 2023;28(14):5578. DOI: 10.3390/molecules28145578
47. Ostios-Garcia L., Pérez D.M., Castelo B. et al. Classification of anticancer drugs: an update with FDA- and EMA-approved drugs. Cancer Metastasis Rev 2024;43(4):1561–71. DOI: 10.1007/s10555-024-10188-5
48. Gebremeskel S., Johnston B. Concepts and mechanisms underlying chemotherapy induced immunogenic cell death: impact on clinical studies and considerations for combined therapies. Oncotarget 2015;6(39):41600–19. DOI: 10.18632/oncotarget.6113
49. Gerashchenko T.S., Patysheva M.R., Fedorenko A.A. et al. Chemotherapy-induced developmental trajectories of monocytes in breast cancer. RUDN Journal of MEDICIN 2024;28(4):427–38. DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-427-438
50. Karati D., Mahadi K.R., Trivedi P. et al. Alkylating agents, the road less traversed, changing anticancer therapy. Anticancer Agents Med Chem 2022;22(8):1478–95. DOI: 10.2174/1871520621666210811105344
51. Khoury A., Deo K.M., Aldrich-Wright J.R. Recent advances in platinum-based chemotherapeutics that exhibit inhibitory and targeted mechanisms of action. J Inorg Biochem 2020;207:111070. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2020.111070
52. Bayat Mokhtari R., Homayouni T.S., Baluch N. et al. Combination therapy in combating cancer. Oncotarget 2017;8(23):38022–43. DOI: 10.18632/oncotarget.16723
53. Никитина О.Г., Валиахметова А.Р., Газдалиева Л.М. Применение химиотерапии при лечении онкологических больных. Международный студенческий научный вестник 2018;4(3):471–4. Nikitina O.G., Valiakhmetova A.R., Gazdaliyeva L.M. The use of chemotherapy in the treatment of cancer patients. Mezhdunarodnyy studencheskiy nauchnyy vestnik = International Student Scientific Bulletin 2018;4(3):471–4. (In Russ.).
54. Орлова О.Л., Николаева Л.Л., Король Л.А. и др. Современные онкопрепараты для внутреннего применения. Фармация и фармакология 2018;6(5):440–61. DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-5-440-461
Orlova O.L., Nikolaeva L.L., Korol L.A. et al. Modern cancer drugs for internal use. Farmatsiya i farmakologiya = Pharmacy and Pharmacology 2018;6(5):440–61. (In Russ.). DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-5-440-461
55. Yoo J., Jung Y., Ahn J.H. et al. Incidence and clinical course of septic shock in neutropenic patients during chemotherapy for gynecological cancers. J Gynecol Oncol 2020;31(5):e62. DOI: 10.3802/jgo.2020.31.e62
56. Ahlmann M., Hempel G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy.

- Cancer Chemother Pharmacol 2016;78(4):661–71. DOI: 10.1007/s00280-016-3152-1
57. Kim C.G., Sohn J., Chon H. et al. Incidence of febrile neutropenia in Korean female breast cancer patients receiving preoperative or postoperative doxorubicin/cyclophosphamide followed by docetaxel chemotherapy. *J Breast Cancer* 2016;19(1):76–82. DOI: 10.4048/jbc.2016.19.1.76
58. Lyman G.H., Michels S.L., Reynolds M.W. et al. Risk of mortality in patients with cancer who experience febrile neutropenia. *Cancer* 2010;116(23):5555–63. DOI: 10.1002/cncr.25332
59. Uitdehaag B.M., Nillesen W.M., Hommes O.R. Long-lasting effects of cyclophosphamide on lymphocytes in peripheral blood and spinal fluid. *Acta Neurol Scand* 1989;79(1):12–7. DOI: 10.1111/j.1600-0404.1989.tb03702.x
60. Emadi A., Jones R.J., Brodsky R.A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6(11):638–47. DOI: 10.1038/nrclinonc.2009.146
61. Ghiringhelli F., Menard C., Puig P.E. et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56(5):641–8. DOI: 10.1007/s00262-006-0225-8
62. Dimeloe S., Frick C., Fischer M. et al. Human regulatory T cells lack the cyclophosphamide-extruding transporter ABCB1 and are more susceptible to cyclophosphamide-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 2014;44(12):3614–20. DOI: 10.1002/eji.201444879
63. Huijts C.M., Loughheed S.M., Bodalal Z. et al. The effect of everolimus and low-dose cyclophosphamide on immune cell subsets in patients with metastatic renal cell carcinoma: results from a phase I clinical trial. *Cancer Immunol Immunother* 2019;68(3):503–15. DOI: 10.1007/s00262-018-2288-8
64. Nakahara T., Uchi H., Lesokhin A.M. et al. Cyclophosphamide enhances immunity by modulating the balance of dendritic cell subsets in lymphoid organs. *Blood* 2010;115(22):4384–92. DOI: 10.1182/blood-2009-11-251231
65. Bao L., Hao C., Wang J. et al. High-dose cyclophosphamide administration orchestrates phenotypic and functional alterations of immature dendritic cells and regulates th cell polarization. *Front Pharmacol* 2020;11:775. DOI: 10.3389/fphar.2020.00775
66. Larionova I., Cherdynseva N., Liu T. et al. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncotarget* 2019;8(7):1596004. DOI: 10.1080/2162402x.2019.1596004
67. Bart V.M.T., Pickering R.J., Taylor P.R. et al. Macrophage reprogramming for therapy. *Immunology* 2021;163(2):128–44. DOI: 10.1111/imm.13300
68. Heath O., Berlatto C., Maniati E. et al. Chemotherapy induces tumor-associated macrophages that aid adaptive immune responses in ovarian cancer. *Cancer Immunol Res* 2021;9(6):665–81. DOI: 10.1158/2326-6066.Cir-20-0968
69. Sevko A., Sade-Feldman M., Kanterman J. et al. Cyclophosphamide promotes chronic inflammation-dependent immunosuppression and prevents antitumor response in melanoma. *J Invest Dermatol* 2013;133(6):1610–1619. DOI: 10.1038/jid.2012.444
70. Longley D.B., Harkin D.P., Johnston P.G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3(5):330–8. DOI: 10.1038/nrc1074
71. Cavalcanti I.D.L., Soares J.C.S. Conventional cancer treatment. In: *Advances in Cancer Treatment: From Systemic Chemotherapy to Targeted Therapy*. Ed. by I.D.L. Cavalcanti, J.C.S. Soares. Cham: Springer International Publishing, 2021. Pp. 29–56.
72. Al-Shammary E.H., Mohammed D.J. Chemotherapy-induced neutropenia after initial and subsequent chemotherapy cycle of non-Hodgkin lymphoma. *Mustansiriyah Med J* 2020;19(1):16–9. DOI: 10.4103/mj.Mj_4_20
73. Bracci L., Schiavoni G., Sistigu A. et al. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ* 2014;21(1):15–25. DOI: 10.1038/cdd.2013.67
74. Nowak A.K., Robinson B.W., Lake R.A. Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: implications for combination chemo-immunotherapy. *Cancer Res* 2002;62(8):2353–8
75. Herman S., Zurgil N., and Deutsch M. Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines. *Inflamm Res* 2005;54(7):273–80. DOI: 10.1007/s00011-005-1355-8
76. Eriksson E., Wenthe J., Irenaeus S. et al. Gemcitabine reduces MDSCs, tregs and TGFβ-1 while restoring the teff/treg ratio in patients with pancreatic cancer. *J Transl Med* 2016;14(1):282. DOI: 10.1186/s12967-016-1037-z
77. Sawasdee N., Thepmalee C., Sujitjorn J. et al. Gemcitabine enhances cytotoxic activity of effector T-lymphocytes against chemo-resistant cholangiocarcinoma cells. *Int Immunopharmacol* 2020;78:106006. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.106006
78. Szczygiel A., Węgierek-Ciura K., Mierzejewska J. et al. The modulation of local and systemic anti-tumor immune response induced by methotrexate nanoconjugate in murine MC38 colon carcinoma and B16 F0 melanoma tumor models. *Am J Cancer Res* 2023;13(10):4623–43.
79. Ma G., Zhang Z., Li P. et al. Reprogramming of glutamine metabolism and its impact on immune response in the tumor microenvironment. *Cell Commun Signal* 2022;20(1):114. DOI: 10.1186/s12964-022-00909-0
80. Cerezo M., Rocchi S. Cancer cell metabolic reprogramming: a keystone for the response to immunotherapy. *Cell Death Disease* 2020;11(11):964. DOI: 10.1038/s41419-020-03175-5
81. Fang H., Ang B., Xu X. et al. TLR4 is essential for dendritic cell activation and anti-tumor T-cell response enhancement by DAMPs released from chemically stressed cancer cells. *Cell Mol Immunol* 2014;11(2):150–9. DOI: 10.1038/cmi.2013.59
82. Apetoh L., Ladoire S., Coukos G. et al. Combining immunotherapy and anticancer agents: the right path to achieve cancer cure? *Ann Oncol* 2015;26(9):1813–23. DOI: 10.1093/annonc/mdv209
83. Püschel F., Favaro F., Redondo-Pedraza J. et al. Starvation and antimetabolic therapy promote cytokine release and recruitment of immune cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020;117(18):9932–41. DOI: 10.1073/pnas.1913707117
84. Malesci A., Bianchi P., Celesti G. et al. Tumor-associated macrophages and response to 5-fluorouracil adjuvant therapy in stage III colorectal cancer. *Oncotarget* 2017;6(12):e1342918. DOI: 10.1080/2162402x.2017.1342918
85. Yokoyama C., Sueyoshi Y., Ema M. et al. Induction of oxidative stress by anticancer drugs in the presence and absence of cells. *Oncol Lett* 2017;14(5):6066–70. DOI: 10.3892/ol.2017.6931
86. Mordente A., Meucci E., Silvestrini A. et al. Anthracyclines and Mitochondria. In: *Advances in mitochondrial medicine*. Ed. by R. Scatena, P. Bottoni, B. Giardina. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. Pp. 385–419.
87. Steele T.A. Chemotherapy-induced immunosuppression and reconstitution of immune function. *Leuk Res* 2002;26(4):411–4. DOI: 10.1016/S0145-2126(01)00138-2
88. Krysko D.V., Kaczmarek A., Krysko O. et al. TLR-2 and TLR-9 are sensors of apoptosis in a mouse model of doxorubicin-induced acute inflammation. *Cell Death Differ* 2011;18(8):1316–25. DOI: 10.1038/cdd.2011.4
89. Ghiringhelli F., Apetoh L., Tesniere A. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1β-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 2009;15(10):1170–8. DOI: 10.1038/nm.2028
90. Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F. et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007;13(1):54–61. DOI: 10.1038/nm1523
91. Giglio P., Mara G., Nicola T. et al. PKR and GCN2 stress kinases promote an ER stress-independent eIF2α phosphorylation responsible for calreticulin exposure in melanoma cells.

- OncoImmunology 2018;7(8):e1466765. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1466765
92. Hodge J.W., Garnett C.T., Farsaci B. et al. Chemotherapy-induced immunogenic modulation of tumor cells enhances killing by cytotoxic T lymphocytes and is distinct from immunogenic cell death. *Int J Cancer* 2013;133(3):624–36. DOI: 10.1002/ijc.28070
 93. Alizadeh D., Larmonier N. Chemotherapeutic targeting of cancer-induced immunosuppressive cells. *Cancer Res* 2014;74(10):2663–8. DOI: 10.1158/0008-5472.Can-14-0301
 94. Park J.Y., Jang M.J., Chung Y.H. et al. Doxorubicin enhances CD4+ T-cell immune responses by inducing expression of CD40 ligand and 4-1BB. *Int Immunopharmacol* 2009;9(13):1530–9. DOI: 10.1016/j.intimp.2009.09.008
 95. Mattarollo S.R., Loi S., Duret H. et al. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res* 2011;71(14):4809–20. DOI: 10.1158/0008-5472.Can-11-0753
 96. Huang J., Wu R., Chen L. et al. Understanding anthracycline cardiotoxicity from mitochondrial aspect. *Front Pharmacol* 2022;13:811406. DOI: 10.3389/fphar.2022.811406
 97. Ocadlikova D., Lecciso M., Isidori A. et al. Chemotherapy-induced tumor cell death at the crossroads between immunogenicity and immunotolerance: focus on acute myeloid leukemia. *Front Oncol* 2019;9:1004. DOI: 10.3389/fonc.2019.01004
 98. Wijayahadi N., Haron M.R., Stanslas J. et al. Changes in cellular immunity during chemotherapy for primary breast cancer with anthracycline regimens. *J Chemother* 2007;19(6):716–23. DOI: 10.1179/joc.2007.19.6.716
 99. Elsea C.R., Roberts D.A., Druker B.J. et al. Inhibition of p38 MAPK suppresses inflammatory cytokine induction by etoposide, 5-fluorouracil, and doxorubicin without affecting tumoricidal activity. *PLoS One* 2008;3(6):e2355. DOI: 10.1371/journal.pone.0002355
 100. Sauter K.A., Wood L.J., Wong J. et al. Doxorubicin and daunorubicin induce processing and release of interleukin-1 β through activation of the NLRP3 inflammasome. *Cancer Biol Ther* 2011;11(12):1008–16. DOI: 10.4161/cbt.11.12.15540
 101. Wang L., Chen Q., Qi H. et al. Doxorubicin-induced systemic inflammation is driven by upregulation of toll-like receptor TLR4 and endotoxin leakage. *Cancer Res* 2016;76(22):6631–42. DOI: 10.1158/0008-5472.Can-15-3034
 102. Singh A., Kaur N., Singh G. et al. Topoisomerase I and II inhibitors: a patent review. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2016;11(4):401–23. DOI: 10.2174/0929866523666160720095940
 103. Yakkala P.A., Penumallu N.R., Shafi S. et al. Prospects of topoisomerase inhibitors as promising anti-cancer agents. *Pharmaceuticals (Basel)* 2023;16(10):1456. DOI: 10.3390/ph16101456
 104. Kim G.M., Kim Y.S., Ae Kang Y. et al. Efficacy and toxicity of belotecan for relapsed or refractory small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2012;7(4):731–6. DOI: 10.1097/JTO.0b013e31824b23cb
 105. Dang X., Ogbu S.C., Zhao J. et al. Inhibition of topoisomerase IIA (Top2 α) induces telomeric DNA damage and T cell dysfunction during chronic viral infection. *Cell Death Dis* 2020;11(3):196. DOI: 10.1038/s41419-020-2395-2
 106. Rialdi A., Campisi L., Zhao N. et al. Topoisomerase I inhibition suppresses inflammatory genes and protects from death by inflammation. *Science* 2016;352(6289):aad7993. DOI: 10.1126/science.aad7993
 107. Haggerty T.J., Dunn I.S., Rose L.B. et al. Topoisomerase inhibitors modulate expression of melanocytic antigens and enhance T cell recognition of tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60(1):133–44. DOI: 10.1007/s00262-010-0926-x
 108. Wan S., Pestka S., Jubin R.G. et al. Chemotherapeutics and radiation stimulate MHC class I expression through elevated interferon-beta signaling in breast cancer cells. *PLoS One* 2012;7(3):e32542. DOI: 10.1371/journal.pone.0032542
 109. McKenzie J.A., Mbofung R.M., Malu S. et al. The effect of topoisomerase I inhibitors on the efficacy of T-cell-based cancer immunotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2018;110(7):777–86. DOI: 10.1093/jnci/djx257
 110. Lee J.-M., Shin K.-S., Koh C.-H. et al. Inhibition of topoisomerase I shapes antitumor immunity through the induction of monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Lett* 2021;520:38–47. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.06.031
 111. Iwai T., Sugimoto M., Wakita D. et al. Topoisomerase I inhibitor, irinotecan, depletes regulatory T cells and up-regulates MHC class I and PD-L1 expression, resulting in a supra-additive antitumor effect when combined with anti-PD-L1 antibodies. *Oncotarget* 2018;9(59):31411–21. DOI: 10.18632/oncotarget.25830
 112. Matsuura H.N., Fett-Neto A.G. Plant alkaloids: main features, toxicity, and mechanisms of action. In: *Plant toxins*. Ed. by P. Gopalakrishnakone, C.R. Carlini, R. Ligabue-Braun. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015. Pp. 1–15.
 113. Khan H., Alam W., Alsharif K.F. et al. Alkaloids and colon cancer: molecular mechanisms and therapeutic implications for cell cycle arrest. *Molecules* 2022;27(3):920. DOI: 10.3390/molecules27030920
 114. Taub J.W., Buck S.A., Xavier A.C. et al. The evolution and history of vinca alkaloids: from the big bang to the treatment of pediatric acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2024;71(11):e31247. DOI: 10.1002/pbc.31247
 115. Markman J., Zanotti K., Webster K. et al. Experience with the management of neutropenia in gynecologic cancer patients receiving carboplatin-based chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2004;92(2):592–5. DOI: 10.1016/j.ygyno.2003.11.005
 116. Markman M. Management of toxicities associated with the administration of taxanes. *Exp Opin Drug Saf* 2003;2(2):141–6. DOI: 10.1517/14740338.2.2.141
 117. Beretta G.L., Cassinelli G., Rossi G. et al. Novel insights into taxane pharmacology: An update on drug resistance mechanisms, immunomodulation and drug delivery strategies. *Drug Resist Updates* 2025;81:101223. DOI: 10.1016/j.drug.2025.101223
 118. Serpico A.F., Pisaro C., Grieco D. cGAS-dependent proinflammatory and immune homeostatic effects of the microtubule-targeting agent paclitaxel. *Front Immunol* 2023;14:1127623. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1127623
 119. Kaneno R., Shurin G.V., Tourkova I.L. et al. Chemomodulation of human dendritic cell function by antineoplastic agents in low noncytotoxic concentrations. *J Translat Med* 2009;7(1):58. DOI: 10.1186/1479-5876-7-58
 120. Pfannenstiel L.W., Lam S.S., Emens L.A. et al. Paclitaxel enhances early dendritic cell maturation and function through TLR4 signaling in mice. *Cell Immunol* 2010;263(1):79–87. DOI: 10.1016/j.cellimm.2010.03.001
 121. Ramakrishnan R., Assudani D., Nagaraj S. et al. Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *J Clin Invest* 2010;120(4):1111–24. DOI: 10.1172/jci40269
 122. Pellicciotta I., Yang C.P., Goldberg G.L. et al. Epothilone B enhances class I HLA and HLA-A2 surface molecule expression in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2011;122(3):625–31. DOI: 10.1016/j.ygyno.2011.05.007
 123. Wanderley C.W., Colón D.F., Luiz J.P.M. et al. Paclitaxel reduces tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages to an M1 profile in a TLR4-dependent manner. *Cancer Res* 2018;78(20):5891–900. DOI: 10.1158/0008-5472.Can-17-3480
 124. Dos Santos Guimarães I., Ladislau-Magescky T., Tessarollo N.G. et al. Chemosensitizing effects of metformin on cisplatin- and paclitaxel-resistant ovarian cancer cell lines. *Pharmacol Rep* 2018;70(3):409–17. DOI: 10.1016/j.pharep.2017.11.007
 125. Pusztai L., Mendoza T.R., Reuben J.M. et al. Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel chemotherapy. *Cytokine* 2004;25(3):94–102. DOI: 10.1016/j.cyto.2003.10.004

126. Laha D., Grant R., Mishra P. et al. 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
127. Tsavaris N., Kosmas C., Vadiaka M. et al. Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. *Br J Cancer* 2002;87(1):21–7. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600347
128. Sun Y., Ma X., Hu H. Application of nano-drug delivery system based on cascade technology in cancer treatment. *Int J Mol Sci* 2021;22(11):5698. DOI: 10.3390/ijms22115698
129. D'Incalci M., Badri N., Galmarini C.M. et al. Trabectedin, a drug acting on both cancer cells and the tumour microenvironment. *Br J Cancer* 2014;111(4):646–50. DOI: 10.1038/bjc.2014.149
130. Germano G., Frapolli R., Belgiovine C. et al. Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell* 2013;23(2):249–62. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.01.008
131. Blackburn G.L. Metabolic considerations in management of surgical patients. *Surg Clin North Am* 2011;91(3):467–80. DOI: 10.1016/j.suc.2011.03.001
132. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И. Иммунная система и рак. *Практическая онкология* 2016;17(2):62–73. DOI: 10.31917/1702062
133. Kadagidze Z.G., Chertkova A.I. The immune system and cancer. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology* 2016;17(2):62–73. (In Russ.). DOI: 10.31917/1702062
134. Hiam-Galvez K.J., Allen B.M., Spitzer M.H. Systemic immunity in cancer. *Nat Rev Cancer* 2021;21(6):345–59. DOI: 10.1038/s41568-021-00347-z
135. Zou W., Wolchok J.D., Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med* 2016;8(328):328rv324. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad7118
136. Tilsed C.M., Fisher S.A., Nowak A.K. et al. Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. *Front Oncol* 2022;12:960317. DOI: 10.3389/fonc.2022.960317
137. Новик А.В., Проценко С.А., Балдуева И.А. Использование оценки состояния адаптивной иммунной системы у больных со злокачественными солидными опухолями в качестве предиктивных или прогностических факторов: систематический обзор. *Эффективная фармакотерапия* 2020;16(33):58–75. DOI: 10.33978/2307-3586-2020-16-33-58-75
138. Novik A.V., Protsenko S.A., Balduева I.A. The use of assessment of the state of the adaptive immune system in patients with malignant solid tumors as predictive or prognostic factors: a systematic review. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy* 2020;16(33):58–75. (In Russ.). DOI: 10.33978/2307-3586-2020-16-33-58-75
139. Артамонова Е.В. Место иммуномодуляторов в терапии рака молочной железы. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2007;1(2):23–6.
140. Artamonova E.V. The place of immunomodulators in breast cancer therapy. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy sistemy = Tumors of the Female Reproductive System* 2007;1(2):23–6. (In Russ.).
141. Сагакянц А.Б., Белякова Л.И., Шевченко А.Н. и др. Особенности локального иммунитета у пациентов с неинвазивным мышечным раком мочевого пузыря различной степени злокачественности. *Южно-Российский онкологический журнал* 2022;3(4):58–66. DOI: 10.37748/2686-9039-2022-3-4-6
142. Sagakyants A.B., Belyakova L.I., Shevchenko A.N. et al. Features of local immunity in patients with noninvasive muscular bladder cancer of varying degrees of malignancy. *Yuzhno-Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal = South Russian Journal of Oncology* 2022;3(4):58–66. (In Russ.). DOI: 10.37748/2686-9039-2022-3-4-6
143. Стахеева М.Н., Эйдензон Д., Слонимская Е.М. и др. Взаимосвязь состояния иммунной системы как интегрированного целого с клиническим течением рака молочной железы. *Сибирский онкологический журнал* 2011;2(44):11–9.
144. Staheeva M.N., Eidenzon D., Slonimskaya E.M. et al. The relationship of the state of the immune system as an integrated whole with the clinical course of breast cancer. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2011;2(44):11–9. (In Russ.).
145. Stakheyeva M., Eidenzon D., Slonimskaya E. et al. Integral characteristic of the immune system state predicts breast cancer outcome. *Exp Oncol* 2019;41(1):32–8.
146. Adhikary S., Pathak S., Palani V. et al. Current technologies and future perspectives in immunotherapy towards a clinical oncology approach. *Biomedicines* 2024;12(1):217. DOI: 10.3390/biomedicines12010217
147. Рыбкина В.Л., Адамова Г.В., Ослина Д.С. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований. *Сибирский научный медицинский журнал* 2023;43(2):15–28. DOI: 10.18699/SSMJ20230202
148. Rybkina V.L., Adamova G.V., Oslina D.S. The role of cytokines in the pathogenesis of malignant neoplasms. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2023;43(2):15–28. DOI: 10.18699/SSMJ20230202
149. Fu Y., Tang R., Zhao X. Engineering cytokines for cancer immunotherapy: a systematic review. *Front Immunol* 2023;14:1218082. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1218082
150. Владимиров Л.Ю., Непомнящая Е.М., Подзорова Н.А. и др. Рекомбинантный фактор некроза опухоли-тимозин- α 1: влияние на эффективность неoadъювантной химиотерапии и неоангиогенез при раке молочной железы. *Вопросы онкологии* 2017;63(1):76–81. DOI: 10.37469/0507-3758-2017-63-1-76-81
151. Vladimirova L.Yu., Nepomnyashchaya E.M., Podzorova N.A. et al. Recombinant tumor necrosis factor-thymosin- α 1: effect on the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy and neoangiogenesis in breast cancer. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2017;63(1):76–81. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2017-63-1-76-81
152. Илюшин А.Л., Богдашин И.В., Алексанян А.З. и др. Интерферон- γ и опухолевый рост. *Сибирский онкологический журнал* 2023;22(4):118–27. DOI: 10.21294/1814-4861-2023-22-4-118-127
153. Ilyushin A.L., Bogdashin I.V., Aleksanyan A.Z. et al. Interferon- γ and tumor growth. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2023;22(4):118–27. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2023-22-4-118-127
154. Исаева В.Г., Гривцова Л.Ю., Жовтун Л.П. и др. Противоопухолевый эффект рекомбинантного интерферона гамма в экспериментальной модели билатеральной солидной карциномы Эрлиха. *Успехи молекулярной онкологии* 2022;9(2):111–9. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-111-119
155. Isaeva V.G., Grivtsova L.Y., Zhovtun L.P. et al. Antitumor effect of recombinant interferon-gamma in an experimental model of Ehrlich's bilateral solid carcinoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):111–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-111-119
156. Стахеева М.Н., Богдашин И.В., Тарабановская Н.А. и др. Клинический случай ингаляционного применения цитокинов у больной раком молочной железы с образованиями в легком неясного генеза. *Иммунология* 2024;45(3):321–8.
157. Staheeva M.N., Bogdashin I.V., Tarabanovskaya N.A. et al. A clinical case of inhaled cytokines in a breast cancer patient with lung tumors of unknown origin. *Immunologiya = Immunology* 2024;45(3):321–8. (In Russ.).
158. Galluzzi L., Vitale I., Warren S. et al. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. *J Immunother Cancer* 2020;8(1):e000337. DOI: 10.1136/jitc-2019-000337
159. Galluzzi L., Buqué A., Kepp O. et al. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. *Cancer Cell* 2015;28(6):690–714. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.10.012
160. Bailly C., Thuru X., Quesnel B. Combined cytotoxic chemotherapy and immunotherapy of cancer: modern times. *NAR Cancer* 2020;2(1):zcaa002. DOI: 10.1093/narcan/zcaa002

Вклад авторов

А.А. Федоренко: разработка концепции исследования, анализ научной литературы, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала;

М.Р. Патышева: написание текста статьи, редактирование;

А.А. Федоров: обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи;

М.Н. Стахеева: написание текста статьи, оценка научной достоверности и логичности изложения материала;

Н.В. Чердынцева: экспертиза данных и методологии исследования, редактирование;

Т.С. Геращенко: написание текста статьи, подготовка таблиц, редактирование.

Authors' contributions

A.A. Fedorenko: development of the research concept, analysis of scientific literature, article writing, preparation of illustrative material;

M.R. Patysheva: article writing, editing;

A.A. Fedorov: literature review on the topic of the article, article writing;

M.N. Stakheeva: article writing, assessing the scientific reliability and consistency of the presentation of the material;

N.V. Cherdyntseva: examination of data and research methodology, editing;

T.S. Gerashchenko: article writing, preparing tables, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.А. Федоренко / A.A. Fedorenko: <https://orcid.org/0000-0003-3297-1680>

М.Р. Патышева / M.R. Patysheva: <https://orcid.org/0000-0003-2865-7576>

А.А. Федоров / A.A. Fedorov: <https://orcid.org/0000-0003-3297-1680>

М.Н. Стахеева / M.N. Stakheeva: <https://orcid.org/0000-0003-0601-2240>

Н.В. Чердынцева / N.V. Cherdyntseva: <https://orcid.org/0000-0003-1526-9013>

Т.С. Геращенко / T.S. Gerashchenko: <https://orcid.org/0000-0002-7283-0092>

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 No 22-75-10128).

Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 22-75-10128).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-26-35>

Клональный гемопоэз неопределенного потенциала и злокачественные новообразования

В.Е. Шевченко, Т.И. Кушнир, М.В. Гудкова, Н.Е. Арноцкая*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24***Контакты:** Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Клональный гемопоэз неопределенного потенциала (КГНП) связан со старением организма и является фактором риска развития многих заболеваний, включая злокачественные новообразования (ЗНО). Он возникает в результате соматических мутаций в гемопоэтических стволовых и/или прогениторных клетках, способствует развитию гематологических ЗНО и обуславливает неблагоприятный прогноз при солидных злокачественных опухолях. Результаты недавних широкомасштабных полногеномных исследований подтвердили участие КГНП в патогенезе онкологических заболеваний. Мутации, связанные с данной патологией, выявлены в стволовых и/или прогениторных клетках у пациентов как с гематологическими, так и с солитарными ЗНО, что указывает на потенциальную роль КГНП в возникновении злокачественных опухолей.

Цитотоксическая химиолучевая терапия тесно связана с развитием КГНП и способствует появлению агрессивных и резистентных к лечению гематологических ЗНО. У больных с солитарными ЗНО в опухоли также обнаружены мутации в гене *TET2* с высокой частотой вариационных аллелей. Это явление получило название «инфильтрирующий опухоль клональный гемопоэз». Дальнейшие исследования больших популяций больных с солитарными ЗНО позволят оценить роль инфильтрирующей опухоли клонального гемопоэза в онкогенезе. Способность ассоциированных с возрастом соматических клональных экспансий в одной ткани, такой как гемопоэтический компартмент, регулировать онкогенез в другой ткани представляет собой новую перспективу для более глубокого понимания биологии рака и требует изучения.

В обзоре проанализирована связь между КГНП, старением организма и онкологическими заболеваниями, уделяется особое внимание солитарным ЗНО. Намечены пути лучшего понимания роли КГНП в онкогенезе и возможностей использования его клинического потенциала для лечения рака.

Ключевые слова: клональный гемопоэз неопределенного потенциала, гемопоэтическая стволовая клетка, прогениторная клетка, частота вариантного аллеля, старение, соматическая мутация, злокачественное новообразование

Для цитирования: Шевченко В.Е., Кушнир Т.И., Гудкова М.В., Арноцкая Н.Е. Клональный гемопоэз неопределенного потенциала и злокачественные новообразования. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(3):26–35.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-26-35>

Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and malignant neoplasms

V.E. Shevchenko, T.I. Kushnir, M.V. Gudkova, N.E. Arnotskaya*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia***Contacts:** Valery Evgenievich Shevchenko vshev2015@yandex.ru

Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) is associated with aging and is a risk factor of many diseases including malignant neoplasms (MNPs). It originates through somatic mutations in hematopoietic stem and/or progenitor cells, promotes development of hematological MNPs and underlies unfavorable prognosis in solid malignant tumors. Results of recent largescale genome-wide studies confirmed that CHIP plays a role in oncological diseases. Mutations associated with this pathology were found in stem and/or progenitor cells in patients with both hematological and solitary MNPs which indicates that CHIP potentially mediates development of malignant tumors.

Cytotoxic chemoradiation therapy is closely associated with CHIP development and causes emergence of aggressive and treatment-resistant hematological MNPs. In patients with solitary MNPs, *TET2* gene mutations with high variant allele frequencies were also found in the tumors. This phenomenon was named tumor-infiltrating clonal hemopoiesis. Further populational studies of patients with solitary MNPs will allow to evaluate the role of tumor-infiltrating clonal hemopoiesis in oncogenesis. The ability of age-associated somatic clonal expansions in one tissue, namely hematopoietic

compartment, to affect oncogenesis in another tissue is a new concept requiring further investigation and potentially capable of providing deeper understanding of cancer biology.

The review explores the association between CHIP, aging, and oncological diseases with a particular emphasis on solitary MNP. The ways for better understanding of the role of CHIP in oncogenesis and possibilities of using its clinical potential for cancer treatment are discussed.

Keywords: clonal hematopoiesis of indeterminate potential, hematopoietic stem cell, progenitor cell, variant allele frequency, aging, somatic mutation, malignant neoplasm

For citation: Shevchenko V.E., Kushnir T.I., Gudkova M.V., Arnotskaya N.E. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and malignant neoplasms. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(3):26–35. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-26-35>

ВВЕДЕНИЕ

С возрастом способность стволовых и/или прогениторных клеток (ГСПК) к самообновлению, дифференцировке и генерации всего репертуара клеток крови нарушается. Из-за дисфункции кроветворения у пожилых людей частота гематологических злокачественных новообразований (ЗНО) увеличивается. В ходе многочисленных исследований идентифицированы процессы, связанные со старением ГСПК, включая транскриптомные, эпигенетические и протеомные изменения, модифицированную передачу сигналов провоспалительными цитокинами, миелоидное смещение, нарушение аутофагии, митохондриальную дисфункцию и нарушение регенеративной способности [1]. Эти фенотипы старения ГСПК перекрываются с процессами, способствующими развитию ЗНО.

Стареющие ГСПК в конечном счете накапливают генетические мутации, приводящие к клональному гемопоэзу (КГ), который стал активно изучаться после широкомасштабного использования секвенирования нового поколения (next-generation sequencing, NGS). КГ — это процесс, при котором одна ГСПК приобретает соматические мутации, позволяющие ей расширять свой клон и доминировать в популяциях клеток крови за счет увеличения скорости самообновления или апоптотической устойчивости последующего потомства [2, 3]. Драйверами КГ могут быть любые соматические варианты, начиная от однонуклеотидных полиморфизмов и вставок/делеций до крупномасштабных хромосомных изменений (чаще всего потери Y-хромосомы) [4]. При отсутствии известного варианта гена-драйвера КГ, вероятно, связан с мозаичными хромосомными изменениями, распространенность которых также увеличивается с возрастом [4].

Возрастной КГ — естественное следствие соматических мутаций в ГСПК человека. После появления ГСПК они приобретают около 17 соматических мутаций в год [5–7]. Подмножество приобретенных соматических мутаций помогает таким ГСПК приспособляться, может дать им селективное преимущество и привести к клональной экспансии. Под клональностью обычно понимают популяцию родственных клеток, идентифицируемых по наличию генетических изменений, таких как соматические мутации, вариации

числа копий или цитогенетические aberrации [8]. Признанными факторами риска развития КГ у здоровых людей считаются возраст, генетическая предрасположенность, генотоксический стресс, курение, воздействие факторов окружающей среды и образ жизни [9, 10].

Часто эти мутации смещают гемопоэз в сторону миелоидных или лимфоидных клеток-предшественников и имеют различные последствия для каждой линии. При клональном гемопоэзе с миелоидным смещением соматические мутации связаны с повышенным риском развития миелоидных ЗНО, сердечно-сосудистых заболеваний и смертности от многих причин [11, 12]. При клональном гемопоэзе с лимфоидным смещением соматические мутации ассоциируются с лимфоидными ЗНО и поздними формами аутоиммунитета и иммунодефицита.

В 2015 г. введено понятие клонального гемопоэза неопределенного потенциала (КГНП), для которого характерны отсутствие морфологических признаков гематологического новообразования или другого известного клонального состояния, наличие соматической мутации, связанной с гематологическим ЗНО, с частотой вариантного аллеля (variant allele frequency, VAF) $\geq 2\%$, т. е. доли прочтений данного аллеля в пределах генетического локуса $\geq 2\%$ [8]. Как правило, клоны с VAF $\geq 2\%$ считаются потенциально значимыми, при этом медиана VAF составляет примерно 16% [13, 14]. Однако биологически и клинически значимый порог VAF не определен и является предметом исследований. В настоящее время показано, что КГНП может наблюдаться как при миелоидных (М-КГНП), так и при лимфоидных (Л-КГНП) ЗНО [15, 16]. Интеграция КГНП и мозаичных хромосомных изменений вместе с параметрами анализа периферической крови (количество тромбоцитов, эритроцитов, нейтрофилов и моноцитов — для миелоидных ЗНО, повышенное количество лимфоцитов — для лимфоидных ЗНО) позволила определить людей с самым высоким риском развития миелоидных и лимфоидных ЗНО [17].

Результаты недавних широкомасштабных полногеномных исследований подтвердили роль КГНП в патогенезе онкологических заболеваний. Мутации, связанные с этим состоянием, определены у пациентов

как с гематологическими, так и с солитарными ЗНО, в том числе с раком легкого, молочной, предстательной желез и толстой кишки. Это указывает на то, что КГНП может способствовать образованию злокачественных опухолей. В тканях солитарных ЗНО у пациентов с КГНП обнаружены иммунные клетки, сгенерированные КГНП. Они инфильтрировали опухоль и обладали потенциалом изменять локальное микроокружение опухоли и влиять на ее эволюцию.

Чаще всего при КГ у человека обнаруживают мутации в эпигенетических регуляторных генах *DNMT3A*, *TET2* и *ASXL1* [2, 3]. Хотя КГ не является заболеванием, он связан с высоким риском развития гематологических ЗНО [9]. Его обнаруживают у ≥ 10 % пожилых лиц, у которых риск трансформации в гематологические ЗНО значительно выше по сравнению с общей популяцией (относительный риск (ОР) 11,1; относительный риск смерти — 1,4) [9, 10]. Причина, по которой человеческие ГСПК с этими мутациями подвергаются положительному отбору во время старения, приводящему к клональной экспансии и гематологическим ЗНО, и механизмы этого процесса еще предстоит определить. В настоящее время появились некоторые предположения о молекулярных механизмах клональности, к которым относятся стресс и воспаление в качестве селективного давления, способствующего трансформации в гематологические ЗНО [18]. Риски и преимущества возрастассоциированного КГ активно изучаются. Имеются данные, свидетельствующие о том, что специфические мутации КГ способны повышать функциональность адаптивных иммунных клеток [19]. Анализ механизмов, с помощью которых КГ могут оказывать защитное действие для одних заболеваний, но при этом способствовать развитию других, особенно в рамках гемопоэза, будет иметь решающее значение при разработке соответствующих терапевтических стратегий, направленных на улучшение качества жизни пожилых людей.

КЛОНАЛЬНЫЙ ГЕМОПОЭЗ И СТАРЕНИЕ

Старение связано с увеличением количества и вариантов соматических мутаций практически во всех тканях. Совершенствование технологий NGS, а также их использование как в клинических исследованиях, так и в рутинной практике послужило стимулом к изучению природы КГ. В пределах гемопоэтического компартмента в настоящее время КГ изучен наиболее полно. Недавно предложена концепция эпигенетически наследуемого и эволюционно приобретенного постгеномного повреждения гемопоэтической стволовой клетки костного мозга как центрального механизма, запускающего и поддерживающего системную биологию старения органов и тканей человека и являющегося причиной большинства фатальных болезней цивилизации [20].

Считается, что возрастные изменения микроокружения костного мозга способствуют возникновению

мутаций КГ [21, 22]. Исследования поведения мутантных клонов КГ показывают, что старение взаимодействует со специфическими мутациями потенциально через внутриклеточные факторы или внеклеточные изменения в стареющей гемопоэтической нише [23]. Эти изменения могут благоприятствовать мутациям в факторах сплайсинга [24, 25]. Есть предположение, что КГ не только является признаком старения, но и связан с высоким риском развития гематологических ЗНО, а также негематологических заболеваний, включая сердечно-сосудистые заболевания и солитарные ЗНО [26, 27].

Люди приобретают соматические варианты КГ на протяжении всей жизни — в среднем по крайней мере 1 патогенный вариант за десятилетие [28]. Клональная экспансия развивается по мере старения, увеличения размеров и снижения разнообразия гемопоэтических клонов [29, 30]. Для экспансии мутантных клонов ГСПК требуются годы, но этот процесс ускоряется при воздействии внеклеточных стрессоров, генотоксических агентов, воспаления [31, 32] и генетической предрасположенности (мутации зародышевой линии, семейный анамнез) [33, 34]. Поскольку пожилые люди в течение жизни испытывают больше случайных митотических ошибок и в большей степени подвержены воздействию факторов риска окружающей среды, пожилой возраст является самым значимым фактором риска развития КГ [35]. К 70 годам у человека в пуле ГСПК может накопиться до 70 мутаций на 1 ген [36], что приводит к увеличению генетической гетерогенности и является формой соматического мозаицизма [37, 38].

Результаты исследований показывают, что более 75 % случаев КГНП связаны с вариантами мутаций *DNMT3A*, *TET2* и *ASXL1*, 15 % — с 5 наиболее часто встречающимися генами *PPM1D*, *JAK2*, *SF3B1*, *SRSF2* и *TP53* [38]. Чаще всего с КГНП ассоциируются эпигенетические регуляторы (например, *DNMT3A*, *TET2* и *ASXL1*), гены, связанные с ответом на повреждение и репарацию ДНК (*PPM1D*, *TP53*, *CHEK2* и *ATM*), гены, кодирующие сигналы клеточного роста (*JAK2*) и компоненты сплайсосом (*SF3B1* и *SRSF2*) [39]. На протяжении всей жизни в разных возрастных диапазонах наблюдается увеличение различных соматических вариантов [40].

Клональный гемопоэз неопределенного потенциала участвует в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и других воспалительных заболеваний, первичных солитарных и гематологических ЗНО, а также миелоидных новообразований, возникающих в результате терапии (Т-МН), и, следовательно, связан с повышенной смертностью от многих причин [41]. Признание КГНП как фактора риска развития злокачественных опухолей *de novo* и возникающих при их лечении (согласно документально подтвержденному анамнезу химиотерапии/лучевой терапии) открывает потенциальные возможности для начала терапии до развития агрессивных и часто трудно поддающихся лечению ЗНО [42].

МИЕЛОИДНЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ

Рост заболеваемости миелоидными новообразованиями ассоциируется с увеличением количества видов и частоты соматических вариантов КГНП; при этом клоны с VAF >10 % имеют наибольший риск прогрессирования до гематологических ЗНО [28, 37]. Определенные соматические варианты генов М-КГНП связаны с миелоидными ЗНО (например, *TP53*, *U2AF1*, *SRSF2*, *SF3B1*, *IDH1/2*, *TET2* и *DNMT3A*) [43]. Варианты генов *TP53* и *U2AF1* ассоциированы с самым высоким риском миелоидной трансформации в условиях внешнего селективного давления, в то время как варианты генов *DNMT3A* и *TET2* более распространены, но характеризуются относительно меньшим риском такой трансформации при обнаружении мутаций только в этих генах [44].

Примечательно, что *FLT3* и *NPM1* – распространенные драйверные варианты, связанные с развитием острого миелоидного лейкоза, – практически отсутствуют при М-КГНП. Существует мнение, что приобретение этих вариантов, вероятно, происходит на более поздних этапах патогенеза острого миелоидного лейкоза и тесно связано с лейкемогенезом [40, 43]. Интересно, что в патогенезе миелоидных лейкозов варианты *NPM1* и *DNMT3A* часто участвуют аддитивно [40]. Таким образом, весьма вероятно, что *DNMT3A* – наиболее распространенный вариант, ассоциированный с М-КГНП, который запускает клональную экспансию и прогрессирование до лейкемии, если сопровождается вариантами соматического драйвера *NPM1* [40].

Кроме указанных факторов, на прогноз пациентов с КГНП также влияет зиготность. Результаты недавних исследований показали, что комбинация мутаций, в частности *DNMT3A* R882 и *JAK2* V617F, с нейтральной по числу копий потерей гетерозиготности значительно повышает риск развития гематологических ЗНО [45]. Изменения в КГНП могут обеспечивать повышенную выживаемость ГСПК, сохраняя возмож-

ность самообновления и блокирования дифференцировки (мутации в генах *DNMT3A*, *TET2* и *ASXL1*) и/или потенцирования пути ответа на повреждение ДНК без активации апоптоза генами *TP53*, *PPM1D*) [46].

ЛИМФОИДНЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ

Клональный гемопоэз неопределенного потенциала, связанный с лимфоидными лейкозами и лимфомами [47], также увеличивается с возрастом [17]. В отличие от М-КГНП, он может возникать как в стволовых клетках, так и в частично или полностью дифференцированных потомках на стадиях созревания [48]. Л-КГНП менее распространен, чем М-КГНП [17]. Показано, что при М-КГНП в 87 % случаев мутированы 3 топовых гена (*DNMT3A*, *TET2* и *ASXL1*), тогда как варианты Л-КГНП распределены более равномерно по большему количеству генов, аналогично распределению вариантов в остальных генах М-КГНП (рис. 1) [17]. Повышенная предрасположенность к одной гемопоэтической линии не является исключительной, и варианты мутаций в генах, обычно ассоциированных с КГНП (например, в генах *DNMT3A* и *TET2*), по-видимому, связаны как с миелоидными, так и с лимфоидными ЗНО [48].

СОЛИДНЫЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ

Результаты нескольких когортных исследований показали, что распространенность КГНП у пациентов с солитарными ЗНО составляет от 25 до 30 % [49]. В ходе недавних лонгитюдных исследований обнаружено, что КГНП (особенно при VAF >10 %) увеличивает риск развития солитарных ЗНО, включая рак легкого, почек, молочной и предстательной желез, а также сарком [47, 49]. Показано, что риск возникновения КГНП не был одинаковым для разных типов рака: у пациентов с раком щитовидной железы и яичников наблюдался высокий риск КГНП, в то время как у пациентов с меланомой,

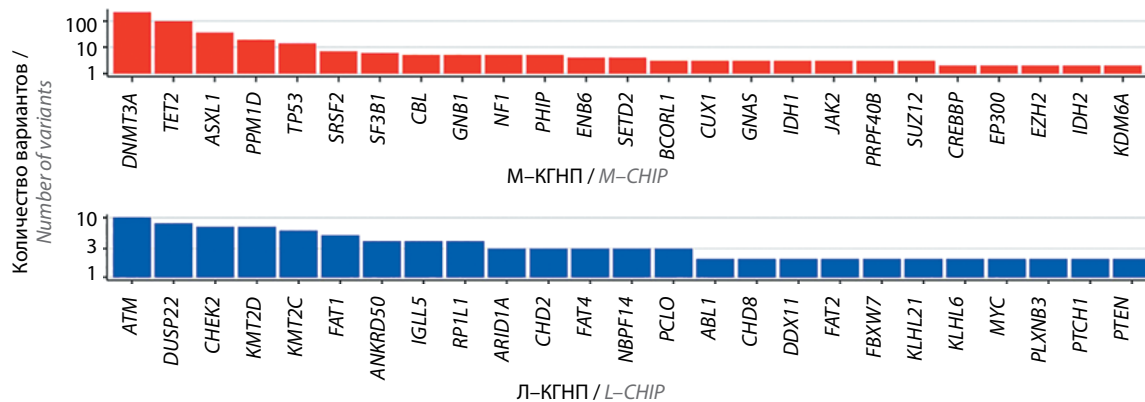


Рис. 1. Варианты мутации в генах при клональном гемопоэзе неопределенного потенциала, связанном с лимфоидными (Л-КГНП) и миелоидными злокачественными новообразованиями (М-КГНП), идентифицированные в образцах крови из биобанка Mass General Brigham [17]

Fig. 1. Variants of gene mutations in clonal hematopoiesis of indeterminate potential associated with lymphoid (L-CHIP) and myeloid (M-CHIP) malignant neoplasms identified in blood samples from the Mass General Brigham Biobank [17]

раком предстательной железы, почек и колоректальным раком — более низкий [50]. Дополнительный анализ образцов крови больных с ЗНО выявил высокий риск развития КГНП при тимоме и низкий — при раке мочевого пузыря и молочной железы [51].

Специфические мутации также связаны с определенными типами рака: например, мутации в *DNMT3A* — с высоким риском развития рака желудка и мочевого пузыря, мутации генов сплайсинга (*SF3B1* и *SRSF2*) — с высоким риском возникновения рака яичников (табл. 1) [52].

Таблица 1. Частота мутаций в различных генах при клональном гемопоэзе неопределенного потенциала при разных солидных опухолях, %

Table 1. Frequencies of mutations in different genes in clonal hematopoiesis of indeterminate potential for different solid tumors, %

Тип опухоли Tumor type	Гены с мутацией Top mutations	Образцы крови Blood samples	цсДНК из плазмы cfDNA from plasma
Рак мочевого пузыря Bladder cancer	<i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>PPM1D</i> [50]	38 [50]	25,8 [56]
Рак молочной железы Breast cancer	<i>DNMT3A</i> (OP 1,25) [41]; <i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>PPM1D</i> [50] <i>DNMT3A</i> (HR 1.25) [41]; <i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>PPM1D</i> [50]	26 [50], 21 [10]	11,7 [50]
Колоректальный рак Colorectal cancer	<i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>PPM1D</i> [50]; <i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>ROS</i> [57]	25 [50], 27,6 [65]	13,5 [56]
Рак эндометрия Endometrial cancer	<i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>PPM1D</i> [50]	39 [50]	21,1 [57]
Рак пищевода и желудка Esophagogastric cancer	<i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>PPM1D</i> [57]	30 [50], 34,6 [57]	—
Рак головы и шеи Head and neck cancer	<i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>ASXL1</i> [58]	31 [50]	13,3 [56]; 43,5 [58]
Рак почек Kidney cancer	<i>TET2</i> (OP 1,47), <i>DNMT3A</i> (OP 1,43), <i>ASXL1</i> (OP 1,20) [47] <i>TET2</i> (HR 1.47), <i>DNMT3A</i> (HR 1.43), <i>ASXL1</i> (HR 1.20) [47]	22 [50]	9,0 [58]
Рак легкого Lung cancer	<i>DNMT3A</i> (OP 1,64), <i>TET2</i> (OP 1,6), <i>ASXL1</i> (OP 1,55) [41]; <i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>PPM1D</i> , <i>ASXL1</i> [50]; <i>DNMT3A</i> , <i>ASXL1</i> , <i>TET2</i> [59], <i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>ATM</i> и <i>TP53</i> [60] <i>DNMT3A</i> (HR 1.64), <i>TET2</i> (HR 1.6), <i>ASXL1</i> (HR 1.55) [41]; <i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>PPM1D</i> , <i>ASXL1</i> [50]; <i>DNMT3A</i> , <i>ASXL1</i> , <i>TET2</i> [59], <i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>ATM</i> and <i>TP53</i> [60]	27 [41]; немелкоклеточный рак легкого — 37, мелкоклеточный рак легкого — 40 [50]; 52,6 [60] 27 [41]; non-small cell lung cancer — 37, small cell lung cancer — 40 [50]; 52.6 [60]	Немелкоклеточный рак легкого — 13,2; мелкоклеточный рак легкого — 16,2 [56] Non-small cell lung cancer — 13.2; small cell lung cancer — 16.2 [56]
Меланома Melanoma	<i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>PPM1D</i> , <i>ASXL1</i> [50]	31 [50]	26,8 [50]
Рак яичников Ovarian cancer	<i>DNMT3A</i> , <i>PPM1D</i> , <i>TP53</i> , <i>CHEK2</i> [50]; <i>ASXL1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>GNAS</i> , <i>JAK2</i> , <i>PPM1D</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SH2B3</i> , <i>SRSF2</i> , <i>TET2</i> , <i>TP53</i> [61]	38 [50]; 17,6 [61]	17,1 [56]
Рак поджелудочной железы Pancreatic cancer	<i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>PPM1D</i> [50]	32 [50]	12,8 [56]
Рак предстательной железы Prostate cancer	<i>DNMT3A</i> (OP 1,27) [41] <i>DNMT3A</i> (HR 1.27) [41]	35 [50]	20,7 [56]
Рак щитовидной железы Thyroid cancer	<i>DNMT3A</i> , <i>SHOC2</i> , <i>SH2B3</i> [62]; <i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> [63]	30 [50]; 37 [62]	7,5 [56]

Примечание. В квадратных скобках представлены ссылки на источники. OP — отношение рисков; цсДНК — циркулирующая свободная ДНК.

Note. References to sources are shown in square brackets. HR — hazard ratio; cfDNA — circulating free DNA.

Результаты исследований показали, что предоперационные мутации КГНП, особенно при высоком VAF, не только увеличивали риск развития рака легких, но и обуславливали худший исход [53]. Участие КГНП в предрасположенности к раку легкого, по-видимому, не зависит от статуса курения и в первую очередь обусловлено вариантами мутаций в генах *DNMT3A* и *ASXL1* [54]. Как и в случае ЗНО кроветворной и лимфоидной систем, вероятность прогрессирования от КГНП для солитарных ЗНО увеличивается при большем количестве вариантов и высокой VAF [33, 55].

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ ТЕРАПИЯ И КЛОНАЛЬНЫЙ ГЕМОПОЭЗ НЕОПРЕДЕЛЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА

В отличие от таргетной иммунотерапии, цитотоксическая химиотерапия, внешнее лучевое облучение и радионуклидная терапия тесно связаны с развитием КГНП [50]. Большинство вариантов КГНП, наблюдаемых после химиотерапии, могут быть обнаружены еще до начала лечения [28]. Это говорит о том, что цитотоксическая терапия чаще всего способствует развитию КГНП через положительный отбор, стимулирующий клональную экспансию ранее существовавших

соматических вариантов, и реже отвечает за приобретение исходного соматического варианта [28]. Воздействие цитотоксической терапии напрямую ассоциировано с КГНП и положительным отбором клонов, содержащих соматические варианты в генах ответа на повреждение ДНК, таких как *TP53*, *PPM1D* и *CHEK2* [28].

Миелоидные новообразования, возникающие в результате действия предшествующей терапии, составляют 10–20 % миелоидных новообразований, включая миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз и миелопролиферативные новообразования [64]. Ранее считалось, что Т-МН появляются исключительно в результате мутагенных эффектов цитотоксической терапии. Однако в настоящее время признано, что варианты, вызывающие данную патологию, часто предшествуют началу противоопухолевой терапии [50]. Примерно у 20–60 % пациентов с Т-МН обнаруживают соматические варианты мутации в различных генах, тесно связанные с КГНП, в том числе в генах *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *PPM1D* и *TP53* [42]. Показано, что воздействие химиотерапии способствует распространению существующих соматических вариантов мутации, а не вызывает повреждение ДНК по всему геному [65].

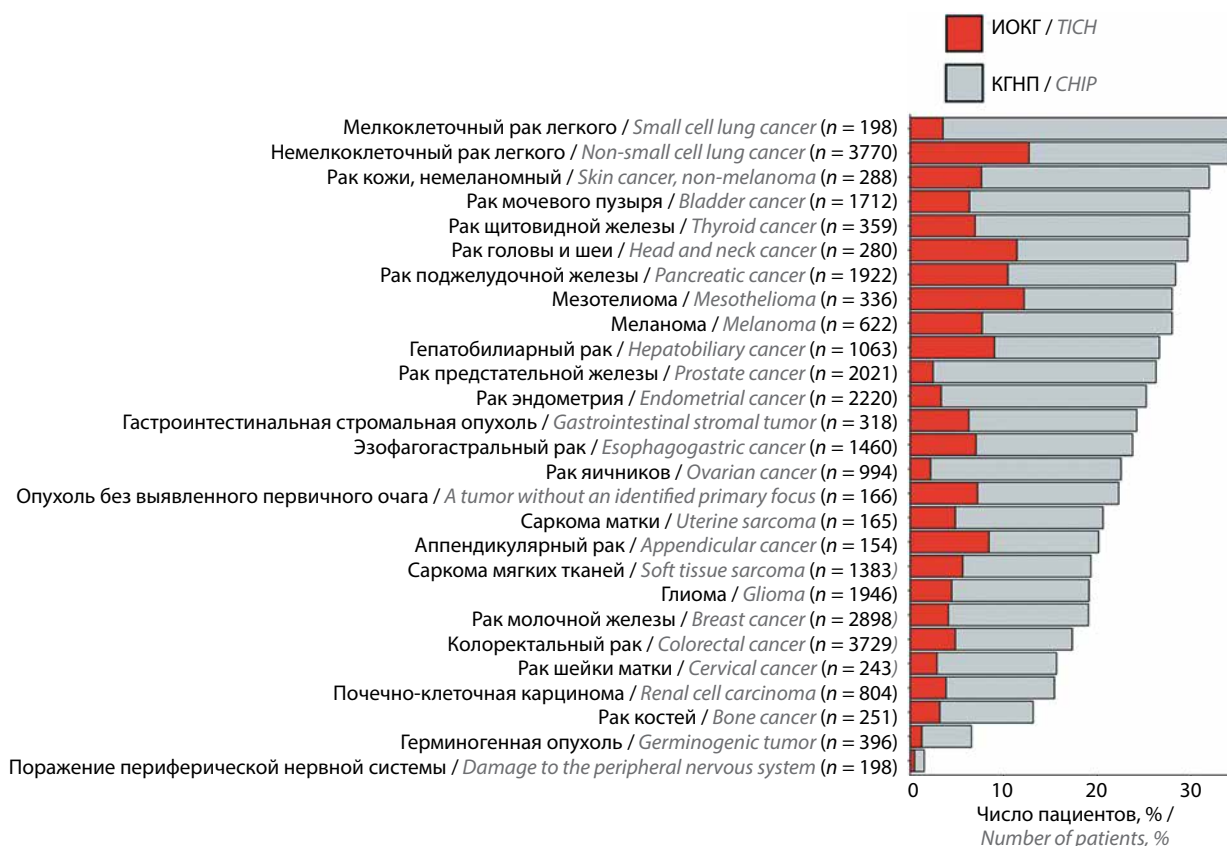


Рис. 2. Число пациентов с клональным гемопоэзом неопределенного потенциала (КГНП) инфильтрирующим опухоль клональным гемопоэзом (ИОКГ) с различными типами рака. Отобраны образцы первичной опухоли у 31 556 больных. Проанализированы только типы рака, встречающиеся в >150 случаях [70]

Fig. 2. Numbers of patients with clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP), tumor-infiltrating clonal hematopoiesis (TICH) and different types of cancer. Primary tumor samples from 31,556 patients were obtained. Only tumor types occurring in >150 cases were analyzed [70]

Как говорилось ранее, ГСПК, обладающие драйверными вариантами соматических мутаций, демонстрируют повышенную адаптацию к условиям клеточного стресса благодаря более высоким темпам пролиферации и лучше предохраняют клетки от гибели. Таким образом, под действием цитотоксической терапии происходит преимущественный отбор агрессивных клонов клеток с соматическими мутациями в генах *TP53*, *PPM1D* и *CHEK2*, что способствует клональной экспансии и развитию Т-МН [66]. Лейкемическая трансформация существующих клонов КГНП в результате Т-МН, вероятно, зависит от приобретения дополнительных соматических вариантов, связанных с миелоидными ЗНО, включая хромосомную анеуплоидию и мутации в генах *FLT3*, *KRAS* и *NRAS* [50]. Это еще раз указывает на механизм, при котором у лиц с КГ, получивших цитотоксическую терапию, происходит положительный отбор клонов, содержащих *TP53* и другие варианты генов ответа на повреждение ДНК (DDR), которые впоследствии достигают клонального доминирования и приобретают дополнительные соматические мутации. Это приводит к развитию агрессивных и резистентных к лечению Т-МН с более высокой распространенностью вариантов мутаций в гене *TP53* и к сложным кариотипам [67].

ОПУХОЛЬИНФИЛЬТРИРУЮЩИЙ КЛОНАЛЬНЫЙ ГЕМОПОЭЗ

Эволюция рака, считающаяся ранее ступенчатым накоплением онкогенных мутаций, теперь рассматривается как многофакторный процесс, на который влияют микроокружение опухоли, местные и системные иммунные реакции, воздействие окружающей среды и старение [68]. Результаты недавно проведенных исследований показали влияние стареющей кроветворной системы на развитие рака легкого [69]. В данном случае возрастной инфильтрирующий опухоль клональный гемопоэз (ИОКГ) выступает в качестве важного фактора, связанного с прогрессированием рака. ИОКГ является панраковым феноменом, наблюдается у 24 % пациентов с КГНП (что составляет более 6 % всех случаев солидных опухолей) и коррелирует с неблагоприятным исходом (рис. 2) [70].

Согласно данным, представленным на рис. 2, вероятность наличия ИОКГ варьирует в зависимости от типа рака и возрастает при немелкоклеточном раке легкого [71], раке головы и шеи, поджелудочной железы и мезотелиоме. Примерно у 40 % пациентов с немелкоклеточным раком легкого и КГНП наблюдался ИОКГ, что увеличивало риск смерти или рецидива [70]. При КГНП мутации в гене *TET2* являются независимым предиктором ИОКГ. В модели немелкоклеточного рака легкого *TET2*-мутантный КГНП вызывал повышенную инфильтрацию миелоидных клеток в опухоли, имитируя наблюдения при заболеваниях человека [70]. Моноциты с *TET2*-мутацией в опухолях мышей преимущественно мигрировали в зону опухо-

ли и накапливались в виде макрофагов. По опубликованным данным, мутации в гене *TET2* могут функционально ремоделировать миелоидные реакции. *TET2*-мутантные миелоидные клетки продемонстрировали повышенную проопухолевую активность в опухолевых органоидных культурах по сравнению с миелоидными клетками дикого типа [70].

Связь между ИОКГ и неблагоприятными исходами солитарных ЗНО, влияние *TET2*-мутантных иммунных клеток на микроокружение и рост раковых клеток подтверждают роль ИОКГ в эволюции опухоли и его потенциальную пользу в диагностике рака [71]. В дальнейшем необходимо провести исследования на более крупных и этнически разнообразных когортах пациентов с раком, а также изучить влияние ИОКГ на прогрессию опухоли [71].

Клоны КГНП способны проникать в микросреду солитарных ЗНО, что доказано прямым секвенированием лейкоцитов, инфильтрирующих опухоль. В 47 % (7/15) образцов опухолей, полученных от пациентов с первичным нелеченым раком молочной железы, присутствуют CD45-клетки, происходящие из линий КГНП [72]. Показано, что по крайней мере 8 % диагностированных мутаций при секвенировании образцов солитарных ЗНО, вероятно, вызваны присутствием клеток КГ [71, 73]. Мутации, которые не были обнаружены в микропрепаратах солитарных ЗНО, имели VAF 5–20 % и были сильно обогащены в лейкоцитах, инфильтрирующих опухоль, по сравнению с мононуклеарными клетками периферической крови. Вероятно, это связано с тем, что клоны КГНП имеют преимущество в инфильтрации солитарных ЗНО по сравнению с другими лейкоцитами. Более точную интерпретацию опухолевых мутаций могут дать эксперименты с параллельным секвенированием материала из образца опухоли и периферической крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время установлена связь КГНП со старением, повышенным риском развития ЗНО и увеличением общей летальности. Оценка специфических мутаций при КГНП у пациентов среднего и пожилого возраста позволит выявить лиц с высоким риском развития конкретных заболеваний. Анализ КГНП у долгожителей может дать новую информацию об основных защитных механизмах и их нарушении при старении. Дальнейшие исследования позволят улучшить понимание роли КГНП в развитии различных онкологических заболеваний, определить возможность нивелирования патогенного потенциала мутировавших клонов и увеличения продолжительности жизни человека. Необходимо разработать новые методологические подходы к применению высокопроизводительного секвенирования для анализа КГНП, сделать экономически оправданными способы обнаружения небольших клонов, увеличить доказательную базу их прогностической важности для оказания

своевременной медицинской помощи пациентам с риском развития ЗНО.

Совершенствование молекулярно-генетических методов привело к открытию новых состояний, развитию которых способствует КГНП, представляющих собой предболезнь. КГНП больше не рассматривается только как процесс, участвующий в патогенезе всех новообразований кроветворной и лимфоидной тканей. Его роль в развитии солитарных ЗНО становится все более очевидной, поскольку мутации в ГСПК влияют на рост опухоли, ее ангиогенез и уклонение от иммунного ответа. Способность ассоциированных

с возрастом соматических клональных экспансий в одной ткани, такой как гемопоэтический компартмент, регулировать онкогенез в другой ткани позволит лучше понять биологию рака. Дальнейшие исследования молекулярных механизмов, связывающих КГНП с прогрессированием солитарных ЗНО, будут иметь решающее значение для разработки новых методов и улучшения стратегий лечения рака. Интеграция геномного тестирования, в том числе анализа свободно-циркулирующих опухолевых ДНК, в клиническую практику может проложить путь к персонализированной профилактической медицине.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Verovskaya E.V., Dellorusso P.V., Passequé E. Losing sense of self and surroundings: hematopoietic stem cell aging and leukemic transformation. *Trends Mol Med* 2019;25(6):494–515. DOI: 10.1016/j.molmed.2019.04.006
2. Genovese G., Köhler A.K., Handsaker R.E. et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* 2014;371(26):2477–87. DOI: 10.1056/NEJMoa1409405
3. Jaiswal S., Fontanillas P., Flannick J. et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* 2014;371(26):2488–98. DOI: 10.1056/NEJMoa1408617
4. Evans M.A., Walsh K. Clonal hematopoiesis, somatic mosaicism, and age-associated disease. *Physiol Rev* 2023;103:649–716. DOI: 10.1152/physrev.00004.2022
5. Lee-Six H., Øbro N.F., Shepherd M.S. et al. Population dynamics of normal human blood inferred from somatic mutations. *Nature* 2018;561(7724):473–8. DOI: 10.1038/s41586-018-0497-0
6. Mitchell E., Chapman M.S., Williams N. et al. Clonal dynamics of haematopoiesis across the human lifespan. *Nature* 2022;606(7913):343–50. DOI: 10.1038/s41586-022-04786-y
7. Welch J.S., Ley T.J., Link D.C. et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 2012;150(2):264–78. DOI: 10.1016/j.cell.2012.06.023
8. Steensma D.P., Bejar R., Jaiswal S. et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* 2015;126(1):9–16. DOI: 10.1182/blood-2015-03-631747
9. Steensma D.P. Clinical implications of clonal hematopoiesis. *Mayo Clin Proc* 2018;93(8):1122–30. DOI: 10.1016/j.mayocp.2018.04.002
10. Coombs C.C., Zehir A., Devlin S.M. et al. Therapy-related clonal hematopoiesis in patients with non hematologic cancers is common and associated with adverse clinical outcomes. *Cell Stem Cell* 2017;21(3):374–82.e4. DOI: 10.1016/j.stem.2017.07.010
11. Кашлакова А.И., Бидерман Б.В., Паровичникова Е.Н. Клональное кроветворение и острые миелоидные лейкозы. *Онкогематология* 2023;18(3):92–101. DOI: 10.17650/1818-8346-2023-18-3-92-101
Kashlakova A.I., Biderman B.V., Parovichnikova E.N. Clonal hematopoiesis and acute myeloid leukemias. *Onkogematologiya = Oncogematology* 2023;18(3):92–101. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2023-18-3-92-101
12. Tan H.S.V., Jiang H., Wang S.S.Y. Biomarkers in clonal haematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) linking cardiovascular diseases, myeloid neoplasms and inflammation. *Ann Hematol* 2025;104(3):1355–66. DOI: 10.1007/s00277-025-06244-x
13. Heuser M., Thol F., Ganser A. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Dtsch Arztebl Int* 2016;113(18):317–22. DOI: 10.3238/arztebl.2016.0317
14. Bick A.G., Nandakumar S.K., Fulco C.P. et al. Inherited causes of clonal haematopoiesis in 97,691 whole genomes. *Nature* 2020;586(7831):763–8. DOI: 10.1038/s41586-020-2819
15. Loh P.R., Genovese G., Handsaker R.E. et al. Insights into clonal haematopoiesis from 8,342 mosaic chromosomal alterations. *Nature* 2018;559(7714):350–5. DOI: 10.1038/s41586-018-0321-x
16. Loh P.R., Genovese G., McCarroll S.A. Monogenic and polygenic inheritance become instruments for clonal selection. *Nature* 2020;584(7819):136–141. DOI: 10.1038/s41586-020-2430-6
17. Niroula A., Sekar A., Murakami M.A. et al. Distinction of lymphoid and myeloid clonal hematopoiesis. *Nat Med* 2021;27(11):1921–7. DOI: 10.1038/s41591-021-01521-4
18. Fulop T., Witkowski J.M., Olivieri F. et al. The integration of inflammaging in age related diseases. *Semin Immunol* 2018;40:17–35. DOI: 10.1016/j.smim.2018.09.003
19. Брюховецкий А.С., Брюховецкий И.С. Постгеномная теория старения человека и научное обоснование применения маломанипулированных биомедицинских клеточных препаратов аутологичного костного мозга для антиявления, увеличения продолжительности жизни и долголетия человека. *Научный обозреватель* 2020;8(116):33–57. Bryukhovetsky A.S., Bryukhovetsky I.S. The postgenomic theory of human aging and the scientific justification for the use of low-manipulated biomedical cellular preparations of autologous bone marrow for anti-aging, increasing human life expectancy and longevity. *Nauchnyj obozrevatel' = Scientific Observer* 2020;8(116):33–57. (In Russ.).
20. Ktena Y.P., Koldobskiy M.A., Barbato M.I. et al. Donor T cell DNMT3a regulates alloreactivity in mouse models of hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest* 2022;132(13):e158047. DOI: 10.1172/JCI158047
21. Jakobsen N.A., Turkalj S., Zeng A.G.X. et al. Selective advantage of mutant stem cells in human clonal hematopoiesis is associated with attenuated response to inflammation and aging. *Cell Stem Cell* 2024;31(8):1127–44.e1117. DOI: 10.1016/j.stem.2024.05.010
22. Winter S., Gotze K.S., Hecker J.S. et al. Clonal hematopoiesis and its impact on the aging osteo-hematopoietic niche. *Leukemia* 2024;38(5): 936–46. DOI: 10.1038/s41375-024-02226-6

23. SanMiguel J.M., Young K., Trowbridge J.J. Hand in hand: intrinsic and extrinsic drivers of aging and clonal hematopoiesis. *Exp Hematol* 2020;91:1–9. DOI: 10.1016/j.exphem.2020.09.197
24. Fabre M.A., de Almeida J.G., Fiorillo E. et al. The longitudinal dynamics and natural history of clonal haematopoiesis. *Nature* 2022;606(7913):335–42. DOI: 10.1038/s41586-022-04785-z
25. Van Zeventer I.A., de Graaf A.O., Salzbrunn J.B. et al. Evolutionary landscape of clonal hematopoiesis in 3,359 individuals from the general population. *Cancer Cell* 2023;41(6):1017–31.e4. DOI: 10.1016/j.ccell.2023.04.006
26. Jaiswal S., Ebert B.L. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science* 2019;366(6465):eaan4673. DOI: 10.1126/science.aan4673
27. Jakubek Y.A., Reiner A.P., Honigberg M.C. Risk Factors for clonal hematopoiesis of indeterminate potential and mosaic chromosomal alterations. *Transl Res* 2023;255:171–80. DOI: 10.1016/j.trsl.2022.11.009
28. Kusne Y., Xie Z., Patnaik M.M. Clonal hematopoiesis: Molecular and clinical implications. *Leuk Res* 2022;113:106787. DOI: 10.1016/j.leukres.2022.106787
29. Петинати Н.А., Дризе Н.И. Клональное кроветворение и его роль в развитии гематологических заболеваний. *Гематология и трансфузиология* 2021;66(4):580–92. DOI: 10.35754/0234-5730-2021-66-4-580-592
Petinati N.A., Drize N.I. Clonal hematopoiesis and its role in the development of hematological diseases. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology* 2021;66(4): 580–92. (In Russ.). DOI: 10.35754/0234-5730-2021-66-4-580-592
30. Jaiswal S., Natarajan P., Silver A. et al. Clonal hematopoiesis and risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *New Engl J Med* 2017;377(2):111–21. DOI: 10.1056/nejmoa1701719
31. Gondek L.P. CHIP: is clonal hematopoiesis a surrogate for aging and other disease? *Hematol Amer Soc Hematol Educ Program* 2021;2021(1):384–9. DOI: 10.1182/hematology.2021000270
32. Goldman E.A., Spellman P.T., Agarwal A. Defining clonal hematopoiesis of indeterminate potential: evolutionary dynamics and detection under aging and inflammation. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 2023;9(2):a006251. DOI: 10.1101/mcs.a006251
33. Greaves M., Maley C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012;481(7381):306–13. DOI: 10.1038/nature10762
34. Takeshima H., Ushijima T. Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk. *NPJ Precis Oncol* 2019;3:7. DOI: 10.1038/s41698-019-0079-0
35. Florez M.A., Tran B.T., Wathan T.K. et al. Clonal hematopoiesis: Mutation-specific adaptation to environmental change. *Cell Stem Cell* 2022;29(6):882–904. DOI: 10.1016/j.stem.2022.05.006
36. Busque L., Mio R., Mattioli J. et al. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood* 1996;88(1):59–65.
37. Quiros P.M., Vassiliou G.S. Genetic predisposition to clonal hematopoiesis. *Hemasphere* 2023;7(9):e947. DOI: 10.1097/HS9.0000000000000947
38. Vijg J., Dong X. Pathogenic mechanisms of somatic mutation and genome mosaicism in aging. *Cell* 2020;182(1):12–23. DOI: 10.1016/j.cell.2020.06.024
39. Joo L., Bradley C.C., Lin S.H. et al. Causes of clonal hematopoiesis: a review. *Curr Oncol Rep* 2023;25(3):211–20. DOI: 10.1007/s11912-023-01362-z
40. McKerrell T., Park N., Moreno T. et al. Leukemia associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. *Cell Rep* 2015;10(8):1239–45. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.02.005
41. Kessler M.D., Damask A., O’Keeffe S. et al. Common and rare variant associations with clonal haematopoiesis phenotypes. *Nature* 2022;612(7939):301–9. DOI: 10.1038/s41586-022-05448-9
42. Travaglini S., Marinoni M., Visconte V. et al. Therapy-related myeloid neoplasm: Biology and mechanistic aspects of malignant progression. *Biomedicines* 2024;12(5):1054. DOI: 10.3390/biomedicines12051054
43. Desai P., Mencia-Trinchant N., Savenkov O. et al. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nat Med* 2018;24(7):1015–23. DOI: 10.1038/s41591-018-0081
44. Abelson S., Collord G., Weissbrod O. et al. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature* 2018;559(7714):400–4. DOI: 10.1038/s41586-018-0317-6
45. Kishtagari A., Khan M.A.W., Li Y. et al. Driver mutation zygosity is a critical factor in predicting clonal hematopoiesis transformation risk. *Blood Cancer J* 2024;14(1):6. DOI: 10.1038/s41408-023-00974-9
46. Bowman R.L., Busque L., Levine R.L. Clonal hematopoiesis and evolution to hematopoietic malignancies. *Cell Stem Cell* 2018;22(2):157–70. DOI: 10.1016/j.stem.2018.01.011
47. Kar S.P., Quiros P.M., Gu M. et al. Genome-wide analyses of 200,453 individuals yield new insights into the causes and consequences of clonal hematopoiesis. *Nat Genet* 2022;54(8):1155–66. DOI: 10.1038/s41588-022-01121-z
48. Von Beck K., von Beck T., Ferrell Jr.P.B. et al. Lymphoid clonal hematopoiesis: Implications for malignancy, immunity, and treatment. *Blood Cancer J* 2023;13(1):5. DOI: 10.1038/s41408-022-00773-8
49. Buttigieg M.M., Rauh M.J. Clonal hematopoiesis: Updates and implications at the solid tumor-immune interface. *JCO Precis Oncol* 2023;7:e2300132. DOI: 10.1200/PO.23.00132
50. Bolton K.L., Ptashkin R.N., Gao T. et al. Cancer therapy shapes the fitness landscape of clonal hematopoiesis. *Nat Genet* 2020;52(11):1219–26. DOI: 10.1038/s41588-020-00710-0
51. Pich O., Reyes-Salazar I., Gonzalez-Perez A. et al. Discovering the drivers of clonal hematopoiesis. *Nat Commun* 2022;13(1):4267. DOI: 10.1038/s41467-022-31878-0
52. Nguyen Y.T.M., Fujisawa M., Ishikawa S. et al. Clonal hematopoiesis and solid cancers. *Cancer Sci* 2025;116(8):2055–63. DOI: 10.1111/cas.70097
53. Yun J.K., Kim S., An H. et al. Pre-operative clonal hematopoiesis is related to adverse outcome in lung cancer after adjuvant therapy. *Genome Med* 2023;15(10):111. DOI: 10.1186/s13073-023-01266-4
54. Levin M.G., Nakao T., Zekavat S.M. et al. Genetics of smoking and risk of clonal hematopoiesis. *Sci Rep* 2022;12(1):7248. DOI: 10.1038/s41598-022-09604-z
55. Hosoya N., Miyagawa K. Implications of the germline variants of DNA damage response genes detected by cancer precision medicine for radiological risk communication and cancer therapy decisions. *J Radiat Res* 2021;62(1):i44–52. DOI: 10.1093/jrr/rrab009
56. Tian R., Wiley B., Liu J. et al. Clonal hematopoiesis and risk of incident lung cancer. *J Clin Oncol* 2023;41(7):1423–33. DOI: 10.1200/JCO.22.00857
57. Zhang Y., Yao Y., Xu Y. et al. Pan-cancer circulating tumor DNA detection in over 10,000 Chinese patients. *Nat Commun* 2021;12(1):11. DOI: 10.1038/s41467-020-20162-8
58. Diplas B.H., Ptashkin R., Chou J.F. et al. Clinical importance of clonal hematopoiesis in metastatic gastrointestinal tract cancers. *JAMA Netw Open* 2023;6(2):e2254221. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2022.54221
59. Xu E., Su K., Zhou Y. et al. Comprehensive landscape and interference of clonal haematopoiesis mutations for liquid biopsy: a Chinese pan-cancer cohort. *J Cell Mol Med* 2021;25(21):10279–90. DOI: 10.1111/jcmm.16966
60. Hong W., Li A., Liu Y. et al. Clonal hematopoiesis mutations in patients with lung cancer are associated with lung cancer risk factors. *Cancer Res* 2022;82(2):199–209. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-1903
61. Weber-Lassalle K., Ernst C., Reuss A. et al. Clonal hematopoiesis-associated gene mutations in a clinical cohort of 448 patients with ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2021;114(4):565–70. DOI: 10.1093/jnci/djab231

62. Boucai L., Ptashkin R.N., Levine R.L. et al. Effects of radioactive iodine on clonal hematopoiesis in patients with thyroid cancer: a prospective study. *Clin Endocrinol* 2023;99(1):122–9. DOI: 10.1111/cen.14925
63. Tiedje V., Vela P.S., Yang J.L. et al. Targetable treatment resistance in thyroid cancer with clonal hematopoiesis. *bioRxiv* 2024;2024.10.10.617685. DOI: 10.1101/2024.10.10.617685
64. Baranwal A., Hahn C.N., Shah M.V. et al. Role of germline predisposition to therapy-related myeloid neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep* 2022;17(6):254–65. DOI: 10.1007/s11899-022-00676-2
65. Wong T.N., Ramsingh G., Young A.L. et al. The role of *TP53* mutations in the origin and evolution of therapy-related AML. *Nature* 2014;518(7540):552–5. DOI: 10.1038/nature13968
66. Voso M.T., Falconi G., Fabiani E. What's new in the pathogenesis and treatment of therapy-related myeloid neoplasms. *Blood* 2021;138(9):749–57. DOI: 10.1182/blood.2021010764
67. Franco S., Godley L.A. Genetic and environmental risks for clonal hematopoiesis and cancer. *J Exp Med* 2025;6;222(1):e20230931. DOI: 10.1084/jem.20230931
68. Swanton C., Bernard E., Abbosh C. et al. Embracing cancer complexity: Hallmarks of systemic disease. *Cell* 2024;187(7):1589–616. DOI: 10.1016/j.cell.2024.02.009
69. Park M.D., Le Berichel J., Hamon P. et al. Hematopoietic aging promotes cancer by fueling IL-1 α -driven emergency myelopoiesis. *Science* 2024;386(6720):eadn0327. DOI: 10.1126/science.adn0327
70. Pich O., Bernard E., Zagorulya M. et al. Tumor-infiltrating clonal hematopoiesis. *N Engl J Med* 2025;392(16):1594–608. DOI: 10.1056/NEJMoa2413361
71. Ptashkin R.N., Mandelker D.L., Coombs C.C. et al. Prevalence of clonal hematopoiesis mutations in tumor-only clinical genomic profiling of solid tumors. *JAMA Oncol* 2018;4(11):1589–93. DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.2297
72. Kleppe M., Comen E., Wen H.Y. et al. Somatic mutations in leukocytes infiltrating primary breast cancers. *NPJ Breast Cancer* 2015;1:15005. DOI: 10.1038/npjbcancer.2015.5
73. Coombs C.C., Gillis N.K., Tan X. et al. Identification of clonal hematopoiesis mutations in solid tumor patients undergoing unpaired next-generation sequencing assays. *Clin Cancer Res* 2018;24(23):5918–24. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-18-1201

Вклад авторов

В.Е. Шевченко: проведение системного анализа полученных данных, написание текста статьи;

Т.И. Кушнир: анализ данных литературы;

М.В. Гудкова: систематизация данных, редактирование;

Н.Е. Арноцкая: обзор литературы по теме статьи.

Authors' contributions

V.E. Shevchenko: system analysis, article writing;

T.I. Kushnir: analysis of literature data;

M.V. Gudkova: data systematization, editing;

N.E. Arnotskaya: literature review on the topic of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.Е. Шевченко / V.E. Shevchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>

Т.И. Кушнир / T.I. Kushnir: <https://orcid.org/0000-0001-9626-6847>

М.В. Гудкова / M.V. Gudkova: <https://orcid.org/0000-0003-2694-5232>

Н.Е. Арноцкая / N.E. Arnotskaya: <https://orcid.org/0000-0002-0154-8604>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетного проекта по теме «Разработка тест-системы для оценки и последующей коррекции статуса ферроптоза в гемопоэтических стволовых клетках стареющего организма человека» (проект № 2025-5).

Funding. The work was carried out within the framework of the budget project on the topic “Development of a test system for the assessment and subsequent correction of the ferroptosis status in hematopoietic stem cells of the aging human body” (project No. 2025-5).

Статья поступила: 04.08.2025. **Принята к публикации:** 11.09.2025. **Опубликована онлайн:** 06.10.2025.

Article submitted: 04.08.2025. **Accepted for publication:** 11.09.2025. **Published online:** 06.10.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-36-45>

Модели сарком мягких тканей *in vitro*: фундаментальные и клинические аспекты

У.А. Бокова, М.С. Третьякова, П.К. Козлова, А.А. Коробейникова, М.Е. Меньяло, Т.С. Геращенко, Е.В. Денисов

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

Контакты: Устинья Анатольевна Бокова pushkay@yandex.ru

Диагностика и подбор эффективной терапии сарком мягких тканей (СМТ) затруднены в связи с низкой распространенностью и значительной гистологической вариабельностью данных опухолей. Развитие молекулярно-генетических методов тестирования направлено на улучшение дифференциальной диагностики различных типов СМТ и поиск генетических нарушений, которые могут являться потенциальными мишенями для терапии. Разработка эффективных методов лечения требует адекватных доклинических моделей, способных воспроизводить биологические особенности опухолей.

В статье представлены молекулярно-генетические методы тестирования для диагностики и терапии СМТ, достижения в получении моделей *in vitro* СМТ, проблемы их использования в доклинических исследованиях, а также перспективы использования первичных клеточных линий для персонализированного лечения.

Ключевые слова: модели *in vitro*, мультигенная панель, саркомы мягких тканей, первичная культура, таргетная терапия

Для цитирования: Бокова У.А., Третьякова М.С., Козлова П.К. и др. Модели сарком мягких тканей *in vitro*: фундаментальные и клинические аспекты. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(3):36–45.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-36-45>

In vitro models of soft tissue sarcomas: basic and clinical aspects

U.A. Bokova, M.S. Tretyakova, P.K. Kozlova, A.A. Korobeynikova, M.E. Menyailo, T.S. Gerashchenko, E.V. Denisov

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

Contacts: Ustinya Anatolyevna Bokova pushkay@yandex.ru

Diagnosis and selection of effective therapy of soft tissue sarcomas (STS) are complicated by low incidence and significant histological variability of these tumors. Development of molecular and genetic testing methods is aimed at improving differential diagnosis of different types of STS and identification of genetic abnormalities which can potentially serve as targets for therapy. Development of effective treatment methods requires adequate preclinical models capable of recreating biological features of the tumors.

The article presents molecular and genetic testing methods for STS diagnosis and therapy, advances in *in vitro* STS models, problems with their use in preclinical studies, as well as possibilities of using primary cell cultures for personalized treatment.

Keywords: *in vitro* model, multigenic panel, soft tissue sarcomas, primary culture, targeted therapy

For citation: Bokova U.A., Tretyakova M.S., Kozlova P.K. et al. *In vitro* models of soft tissue sarcomas: basic and clinical aspects. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(3):36–45. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-36-45>

ВВЕДЕНИЕ

Саркомы мягких тканей (СМТ) — гетерогенная группа злокачественных новообразований мезенхимального происхождения, составляющая 1 % всех солидных опухолей. Она включает более 100 гистологических и молекулярных подтипов, наиболее распространенными из которых являются липосаркомы, лейомиосаркомы и синовиальные саркомы [1]. СМТ отличаются агрессивным течением, высокой склонностью к рецидивированию и резистентностью к терапии, поэтому лечение данной патологии представляет большие сложности.

Основные трудности, связанные с дифференциальной диагностикой и выбором стратегии лечения СМТ, обусловлены редкой встречаемостью опухолей данного типа и их значительным гистологическим разнообразием. Большой прорыв в понимании биологии формирования СМТ удалось достигнуть благодаря применению высокоинформативных молекулярно-генетических методов тестирования. Наиболее перспективным диагностическим инструментом для поиска генетических нарушений считается высокопроизводительное секвенирование, которое является надежной вспомогательной технологией для врачей-патологов и позволяет повысить точность диагностики в сложных и редких случаях сарком.

Поиск генетических aberrаций, лежащих в основе формирования заболевания, является ключом для оптимизации молекулярной классификации и диагностики сарком, однако выбор эффективной стратегии лечения данных опухолей все еще остается серьезной проблемой. Успешное внедрение в клиническую практику новых таргетных и иммунотерапевтических подходов, а также схем химио- и лучевой терапии (ЛТ) осложняется дефицитом адекватных доклинических моделей, способных полноценно отражать молекулярные и гистологические особенности различных подтипов СМТ. В связи с этим получение клеточных линий СМТ имеет большое значение для изучения патогенеза заболевания, определения чувствительности и резистентности к терапевтическим воздействиям, разработки персонализированной терапии и поиска новых стратегий лечения данной патологии [2].

Несмотря на то что клеточные линии остаются «золотым стандартом» для доклинических исследований *in vitro*, выбор моделей для СМТ ограничен: лишь 2 % доступных клеточных линий относятся к данному виду опухолей [3]. При этом существующие культуры не отражают полного разнообразия данной группы опухолей, поскольку представлены наиболее распространенными подтипами и практически не включают редкие формы СМТ.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА САРКОМ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

В основе патогенеза СМТ лежат генетические нарушения. Среди драйверных нарушений, специфичных для сарком, наиболее распространенными являются

хромосомные перестройки, приводящие к возникновению химерных генов, или слияниям генов [4, 5]. В настоящее время диагностика данных опухолей проводится с использованием молекулярно-генетических методов, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), иммунофлуоресценция, флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) и секвенирование нового поколения (next generation sequencing, NGS). С помощью этих методов можно диагностировать различные подтипы СМТ, такие как синовиальная саркома, рабдомиосаркома, липосаркома, светлоклеточная саркома мягких тканей и т. д. [6–10].

В связи с высокой степенью морфологической и генетической гетерогенности установление клинического диагноза «саркомы» на основании результатов гистологического исследования является сложной и многогранной задачей. Одним из наиболее эффективных подходов к повышению точности диагностики СМТ и корректного назначения терапии является таргетное NGS с использованием мультигенных панелей [11]. Этот метод молекулярно-генетического тестирования помогает провести дифференциальную диагностику СМТ, а также выявить клинически значимые мутации, что в ряде случаев приводит к корректировке лечения и улучшению клинического ответа [12, 13]. Согласно экспериментальным данным, использование для выявления генетических нарушений таргетного NGS в сочетании с другими методами в 26,4 % случаев приводит к пересмотру или уточнению диагноза, чаще всего в случае сарком Юинга и липосарком, и в 10,9 % случаев — к изменению стратегии лечения [6].

В клинической практике ведущих онкологических центров широкое распространение получили мультигенные панели, нацеленные на поиск слияния генов, точечных мутаций, инсерций и делеций и изменения числа копий генов для диагностики липосарком, синовиальных сарком, рабдомиосарком и других подтипов СМТ. Наибольшую известность получили панели YuanSu 450 (Origimed, Китай), FoundationOne Heme (Foundation Medicine, США) и UW-OncoPlex (Вашингтонский университет, США), позволяющие не только установить точный диагноз, но и подобрать персонализированную терапию для пациентов с различными подтипами СМТ (табл. 1).

Кроме того, поскольку наиболее часто диагностируемыми нарушениями при саркомах являются слияния генов, существуют панели, основанные только на детекции специфических химерных транскриптов [4, 6].

Использование мультигенных панелей для таргетного NGS предоставляет оптимальный объем информации для точной клинической интерпретации заболевания [14]. Однако разработка персонализированных подходов к терапии сарком требует проведения функциональных исследований на релевантных клеточных моделях, наилучшим образом повторяющих биологические особенности опухолей. Именно поэтому создание стабильных клеточных линий СМТ является ключевым

Таблица 1. Характеристика панелей для секвенирования нового поколения, используемых для диагностики сарком мягких тканей**Table 1. Characteristics of next-generation sequencing panels used for diagnosis of soft tissue sarcomas**

Панель Panel	Подтип сарком мягких тканей Soft tissue sarcoma subtype	Количество генов Number of genes	Тип мутаций Mutation type	Чувствительность, % Sensitivity, %	Источник Source
YuanSu 450	Липосаркома, лейомиосаркома, миксифибросаркома, синовиальная саркома, рабдомиосаркома, ангиосаркома, недифференцированная плеоморфная саркома, инфантильная фибросаркома, светлоклеточная саркома Liposarcoma, leiomyosarcoma, myxofibrosarcoma, synovial sarcoma, rhabdomyosarcoma, undifferentiated pleiomorphic sarcoma, infantile fibrosarcoma, clear cell sarcoma	450	Однонуклеотидные варианты, инделы, амплификации генов, слияния генов Single nucleotide variants, indels, gene amplification, gene fusion	95,5–99,7	[12, 15]
FoundationOne Heme	Синовиальная саркома, липосаркома, светлоклеточная саркома, рабдомиосаркома, ангиосаркома, липосаркома, лейомиосаркома, миксифибросаркома Synovial sarcoma, liposarcoma, clear cell sarcoma, rhabdomyosarcoma, angiosarcoma, leiomyosarcoma, mixofibrosarcoma	593		95–99	[10, 16, 17]
UW-OncoPlex	Лейомиосаркома, липосаркома, светлоклеточная саркома, ангиосаркома, склерозирующая эпителиоидная фибросаркома Leiomyosarcoma, liposarcoma, clear cell sarcoma, angiosarcoma, sclerosing epithelioid fibrosarcoma	430		99,2	[18, 19]

этапом фундаментальных исследований и трансляционной онкологии.

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ САРКОМ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

За последние 100 лет получено более 800 клеточных линий сарком костей и СМТ [20]. Тем не менее большая часть линий недостаточно охарактеризована и мало доступна для научного сообщества. Так, некоторые гистологические подтипы, такие как низкоккачественная миофибробластическая саркома, инфантильная фибросаркома, склерозирующая эпителиоидная фибросаркома и другие, не представлены в биобанке в связи со сложностью получения стабильных клеточных культур, что вызывает трудности при проведении фундаментальных и доклинических исследований [20].

Традиционно токсичность и чувствительность к препаратам оцениваются на адгезионных клеточных линиях [21]. В 1970-х годах разработан метод культивирования опухолевых клеток в виде сфероидов (3D-модели), который обеспечивает большее межклеточное взаимодействие, чем монослойная культура [22]. Сфероиды СМТ являются более химио- и радиорезистентными, чем клетки, растущие в виде монослоя, и отличаются по степени клеточной дифференцировки и пролиферации [23]. Так, наблюдаются различия

в пролиферации клеток сфероидов и адгезивной линии липосаркомы при терапевтическом действии эрибулина: пролиферация снижена в 2D-моделях в 4 из 7 клеточных линий [21]. Оптимальным инструментом для определения эффективности химиотерапевтических препаратов, ЛТ и иммунотерапии являются именно 3D-культуры, поскольку клетки, формирующие сфероиды, лучше моделируют ситуацию *in vivo*, чем 2D-модели [24]. Для СМТ разработаны 3D-модели [23, 25, 26], однако большинство клеточных линий продолжают культивировать стандартным методом [27–29].

Клеточные линии СМТ получают посредством посева клеток из плеврального выпота, клеточной суспензии опухолевого материала и из эксплантата или ксенотрансплантата (рис. 1) [29–32]. Каждый подход характеризуется разным процентом выхода жизнеспособных клеток, что влияет на стабильность первичной линии. Например, при получении клеточной суспензии с использованием либеразы содержание жизнеспособных клеток опухоли составляет 30,2 %, а с использованием смеси из коллагеназы и гиалуронидазы — 84,9 % [33].

Чаще всего стабильные культуры получают из плеоморфной саркомы [34–37]. Так, линия JBT19, выделенная из первичной опухоли недифференцированной плеоморфной саркомы, культивировалась

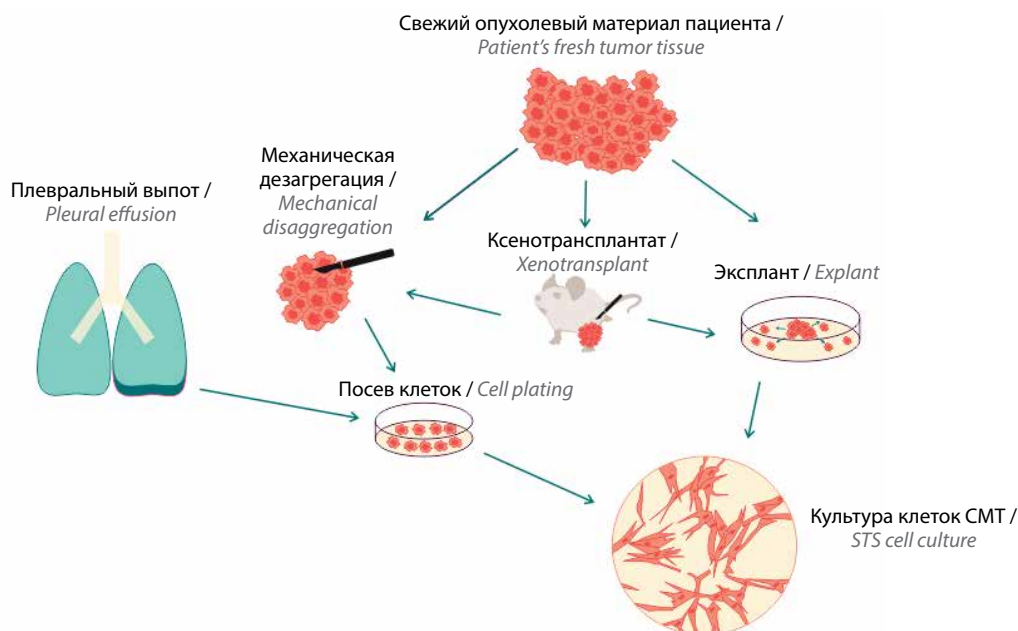


Рис. 1. Методы получения клеточных линий сарком мягких тканей (CMT)

Fig. 1. Techniques for obtaining soft tissue sarcoma (STS) cell lines

в адгезивных условиях более 30 мес. Для клеток JBT19 характерны фибробластоподобная морфология и высокая степень пролиферации [28]. Тем не менее стабильные клеточные культуры описаны и для других подтипов сарком. Получены культуры липосарком, характеризующиеся мелкими полигональными клетками, и линии синовиальной саркомы, включающие как удлинённые, так и полигональные клетки. Для миксофибросаркомы характерны фибробластоподобные клетки, а культуры альвеолярной саркомы состоят из мелких звездчатых клеток [27]. Все описанные линии стабильны в течение нескольких месяцев и различаются чувствительностью к гемцитабину и цисплатину, что говорит о разном ответе на стандартные схе-

мы лечения CMT и предоставляет возможность для разработки персонализированной терапии.

В международном некоммерческом банке клеточных культур American Type Culture Collection (ATCC) представлены иммортализованные клеточные линии CMT, полученные из опухоли синовиальной саркомы (SW982), фибросаркомы (SW684, HT-1080), рабдомиосаркомы (RD, SJCRH30), липосаркомы (SW872), лейомиосаркомы (SK-LMS-1), недифференцированной плеоморфной саркомы (фиброзной гистиоцитомы) (GCT), эпителиоидной саркомы (VA-ES-BJ) и светлоклеточной саркомы (SU-CCS-1) (рис. 2). Характеристика клеточных линий CMT приведена в табл. 2.

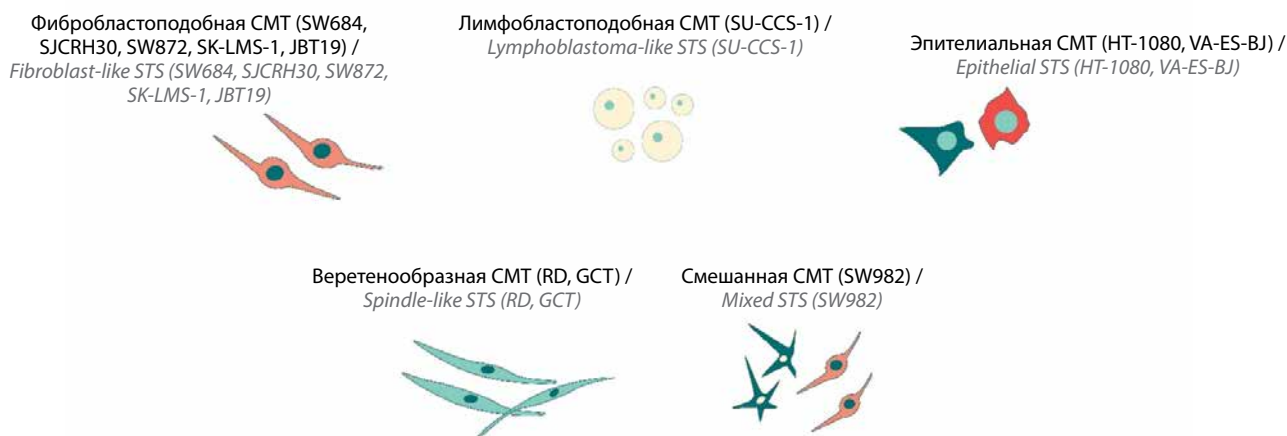


Рис. 2. Морфология клеточных линий сарком мягких тканей (CMT)

Fig. 2. Morphology of soft tissue sarcoma (STS) cell lines

Таблица 2. Основные клеточные линии сарком мягких тканей (СМТ) (по данным American Type Culture Collection, ATCC)
Table 2. Main soft tissue sarcoma (STS) cell lines (per data from the American Type Culture Collection, ATCC)

Клеточная линия Cell line	Подтип сарком Sarcoma subtype	Тип клеточной культуры Cell line type	Морфология Morphology	Генотипическая характеристика Genotype characteristics	Источник Source
SW982	Синовиальная саркома Synovial sarcoma	Адгезивный Adherent	Смешанная Mixed	Делеция <i>MPDZ</i> , мутация <i>BRAF</i> p.Val600Glu (c.1799T>A) <i>MPDZ</i> deletion, <i>BRAF</i> mutation p.Val600Glu (c.1799T>A)	[38, 39]
SW684	Фибросаркома Fibrosarcoma	Адгезивный Adherent	Фибробластоподобная Fibroblast-like	Мутации <i>ERBB4</i> p.Glu452Lys (c.1354G>A), <i>TP53</i> p.Arg213Ter (c.637C>T) <i>ERBB4</i> mutation p.Glu452Lys (c.1354G>A), <i>TP53</i> mutation p.Arg213Ter (c.637C>T)	[38, 39]
HT-1080	Фибросаркома Fibrosarcoma	Адгезивный Adherent	Эпителиальная Epithelial	Делеция <i>CDKN2A</i> , мутации <i>IDH1</i> p.Arg132Cys (c.394C>T), <i>NRAS</i> p.Gln61Lys (c.181C>A) <i>CDKN2A</i> deletion, <i>IDH1</i> mutation p.Arg132Cys (c.394C>T), <i>NRAS</i> mutation p.Gln61Lys (c.181C>A)	[38, 39]
RD	Рабдомиосаркома Rhabdomyosarcoma	Адгезивный Adherent	Веретенообразная, присутствуют многоядерные крупные клетки Spindle-like with multinucleate cells	Мутации <i>NRAS</i> p.Gln61His (c.183A>T), <i>TP53</i> p.Arg248Trp (c.742C>T) <i>NRAS</i> mutation p.Gln61His (c.183A>T), <i>TP53</i> mutation p.Arg248Trp (c.742C>T)	[38, 39]
SJCRH30	Рабдомиосаркома Rhabdomyosarcoma	Адгезивный Adherent	Фибробластоподобная Fibroblast-like	Слияние генов <i>PAX3–FOXO1</i> , <i>PAX3–FKHR</i> , мутации <i>RARA</i> p.Pro9Leu (c.26C>T), <i>TP53</i> p.Tyr205Cys (c.614A>G), <i>TP53</i> p.Arg273Cys (c.817C>T), <i>TP53</i> p.Arg280Ser (c.840A>T) <i>PAX3–FOXO1</i> , <i>PAX3–FKHR</i> gene fusion, <i>RARA</i> mutation p.Pro9Leu (c.26C>T), <i>TP53</i> mutation p.Tyr205Cys (c.614A>G), <i>TP53</i> mutation p.Arg273Cys (c.817C>T), <i>TP53</i> mutation p.Arg280Ser (c.840A>T)	[38, 39]
SW872	Липосаркома Liposarcoma	Адгезивный Adherent	Фибробластоподобная Fibroblast-like	Делеция <i>PTEN</i> , мутации <i>BRAF</i> p.Val600Glu (c.1799T>A), <i>CDKN2A</i> p.Arg80Ter (c.237_238CC>TT), (c.237_238delinsTT), (p.Pro94Leu, c.280_281CC>TT), <i>TP53</i> p.Ile251Asn (c.752T>A) <i>PTEN</i> deletion, <i>BRAF</i> mutation p.Val600Glu (c.1799T>A), <i>CDKN2A</i> mutations p.Arg80Ter (c.237_238CC>TT), (c.237_238delinsTT), (p.Pro94Leu, c.280_281CC>TT), <i>TP53</i> mutation p.Ile251Asn (c.752T>A)	[38, 39]
SK-LMS-1	Лейомиосаркома Leiomyosarcoma	Адгезивный Adherent	Фибробластоподобная Fibroblast-like	Мутации <i>TP53</i> p.Met237Lys (c.710T>A), <i>TP53</i> p.Gly245Ser (c.733G>A) <i>TP53</i> mutation p.Met237Lys (c.710T>A), <i>TP53</i> mutation p.Gly245Ser (c.733G>A)	[38, 39]

Окончание табл. 2

End of table 2

Клеточная линия Cell line	Подтип сарком Sarcoma subtype	Тип клеточной культуры Cell line type	Морфология Morphology	Генотипическая характеристика Genotype characteristics	Источник Source
GCT	Недифференцированная плеоморфная саркома (фиброзная гистиоцитома) Undifferentiated pleomorphic sarcoma (fibrous histiocytoma)	Адгезивный Adherent	Веретенообразная Spindle-like	Мутации <i>BRAF</i> p.Val600Glu (c.1799T>A), <i>CDKN2A</i> p.Leu32Arg (c.95_96TG>GT), <i>TP53</i> p.Arg248Trp (c.742C>T), <i>TP53</i> p.Gln317Ter (c.948_949delinsTT), (c.948_949CC>TT) <i>BRAF</i> mutation p.Val600Glu (c.1799T>A), <i>CDKN2A</i> mutation p.Leu32Arg (c.95_96TG>GT), <i>TP53</i> mutation p.Arg248Trp (c.742C>T), <i>TP53</i> mutation p.Gln317Ter (c.948_949delinsTT), (c.948_949CC>TT)	[38, 39]
VA-ES-BJ	Эпителиоидная саркома Epithelioid sarcoma	Адгезивный Adherent	Эпителиальная Epithelial	Мутация <i>NF2</i> p.Ser87Ter (c.260C>A) <i>NF2</i> mutation p.Ser87Ter (c.260C>A)	[38, 39]
SU-CCS-1	Светлоклеточная саркома Clear cell sarcoma	Суспензионный Suspension	Лимфобластная Lymphoblastic	Слияние генов <i>EWSR1-ATF1</i> , <i>EWS-ATF</i> <i>EWSR1-ATF1</i> , <i>EWS-ATF</i> gene fusion	[38, 39]

Таким образом, первичные опухолевые линии сохраняют основные гистологические и генетические характеристики опухолей и остаются стабильными на протяжении нескольких пассажей, что дает возможность их использования при разработке новых маркеров, мишеней и стратегий лечения. Однако, несмотря на значительный прогресс в создании клеточных линий СМТ, существующий арсенал моделей остается недостаточным для комплексного изучения всех гистологических подтипов данной группы опухолей. Устранение этого пробела представляется крайне важным с учетом фундаментальной роли клеточных культур в исследованиях онкогенеза и разработке новых терапевтических стратегий.

ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ В ТЕРАПИИ САРКОМ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

На данный момент терапия СМТ ранних стадий ограничивается хирургическим вмешательством в сочетании с ЛТ в предоперационном и послеоперационном периодах [40], тогда как при заболевании поздних стадий добавляется ХТ с использованием таких препаратов, как антрациклины (в основном доксорубин), оксазафосфорин (ифосфамид), таксаны (паклитаксел, доцетаксел), антагонисты пиримидинов (гемцитабин), алкалоиды барвинка (виндезин, винбластин, винорелбин, винкристин) и др. [41, 42]. На поздних стадиях при прогрессировании заболевания на фоне цитотоксической ХТ применяется таргетная терапия с использованием ингибиторов тирозинкиназ, таких как пазопаниб, иматиниб, регорафениб, сорафениб, сунитиниб, ленватиниб и кризотиниб [43].

Выбор химиотерапевтических препаратов 1-й и последующих линий, а также схемы ЛТ при СМТ являются сложными задачами, поскольку стандартизация лечения не представляется возможной из-за различий в эффективности одного и того же метода для разных подтипов СМТ. По данным клинических исследований, подтипы СМТ по-разному реагируют на одни и те же химиотерапевтические препараты, что, вероятно, обуславливает низкие показатели хорошего ответа на терапию: лишь у 20 и 10 % пациентов с метастатическими СМТ отмечается ответ на 1-ю и 2-ю линии химиотерапии (ХТ) соответственно [42, 44, 45]. Отсутствие алгоритмов для персонализированного подбора ХТ СМТ обуславливает ее неэффективность. В связи с этим для прогнозирования химиочувствительности проведены исследования *in vitro* на первичных клеточных культурах, полученных от пациентов с плеоморфной саркомой, липосаркомой, синовиальной саркомой, лейомиосаркомой и другими СМТ, и выявлена их положительная корреляция с клиническим ответом на ХТ [46].

Лучевая терапия пациентов с СМТ способствует уменьшению размера опухоли перед операцией и часто применяется для снижения риска развития местного рецидива. Эффективность ЛТ также различается при разных подтипах СМТ и требует пристального изучения [47, 48]. Так, результаты исследований, проведенных на 14 клеточных линиях синовиальной саркомы, лейомиосаркомы, фибросаркомы и липосаркомы, показывали, что радиочувствительность зависит от подтипа саркомы. Доля выживших клеток после облучения в разовой очаговой дозе (РОД) 2 Гр

варьирует от 27 % (SW-982) до 76 % (SK-LMS-1), при этом радиочувствительный фенотип клеток определяется только для клеточных линий синовиальных сарком, в то время как наиболее радиорезистентными оказываются линии лейомиосарком [49]. Аналогичные результаты получены в ходе исследования *in vitro*, проведенного на клеточных 3D-моделях, полученных из операционного материала пациентов с СМТ высокой степени злокачественности. Выявлено, что первичная культура плеоморфной саркомы является более восприимчивой к облучению высокими дозами (РОД — до 16 Гр), чем культура недифференцированной плеоморфной саркомы [25].

За последние два десятилетия значительные успехи в лечении СМТ достигнуты благодаря развитию таргетной терапии. Большую роль в этом сыграли исследования лекарственной чувствительности и резистентности на клеточных линиях, полученных от пациентов с СМТ [43]. В частности, обнаружено, что 14 первичных культур СМТ с различными генетическими абберациями проявляют чувствительность к дазатинибу — ингибитору тирозинкиназ *Vsrc-Abl* и *Src*-семейства [50]. Кроме того, результаты исследования *in vitro* показали, что хидамид (ингибитор HDAC I класса) подавляет пролиферацию клеточных линий фибросаркомы (HT-1080), лейомиосаркомы (SK-LMS-1) и липосаркомы (T778) [51].

Несмотря на то что СМТ считаются иммунологически неактивными опухолями, иммунотерапия является многообещающей терапевтической стратегией. Некоторые подтипы СМТ, такие как альвеолярная СМТ и ангиосаркома, демонстрируют ответ на такое лечение [44, 52]. Так, эффективность ответа на иммунотерапию у больных СМТ без учета подтипа составляет около 20 %, в то время как при ангиосаркоме и альвеолярной саркоме — 50 % [53]. Известно, что опухолеассоциированные макрофаги способны накапливаться в микроокружении солидных опухолей и способствовать ее росту и иммуносупрессии [26]. Высокие уровни опухолеассоциированных макрофагов являются плохим прогностическим фактором для многих опухолей, включая СМТ, поэтому препараты, нацеленные на эти клетки, могут использоваться в терапии сарком [54].

Таким образом, необходимость введения в клиническую практику новых терапевтических методов диктуется низкой эффективностью лечения СМТ. Клеточные культуры, особенно 3D-модели, представляют собой перспективный инструмент для определения чувствительности к ХТ, ЛТ и иммунотерапии СМТ. Исследование клеточных культур, полученных от пациентов с саркомами, может не только повысить эффективность терапии благодаря исключению малоэффективных схем лечения, но и способствовать разработке новых терапевтических стратегий, направленных на преодоление лекарственной резистентности.

ПРОБЛЕМЫ ПРИМЕНЕНИЯ МОДЕЛЕЙ *IN VITRO* В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ САРКОМ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Модели *in vitro* являются одним из наиболее распространенных инструментов в экспериментальной онкологии. Тем не менее они имеют ряд ограничений, которые в первую очередь связаны с изменением клеточного фенотипа в ходе культивирования. Так, в процессе длительного ведения клеточных линий образуется устойчивый клон, который активно пролиферирует, искажая истинные свойства материнской линии, что приводит к недостоверным результатам при оценке чувствительности и резистентности к терапии [55, 56]. Кроме того, модели *in vitro* не могут полностью смоделировать терапевтический ответ. Большинство доступных клеточных линий, используемых в настоящее время, претерпели спонтанные генетические изменения в процессе культивирования, что ставит под сомнение значимость этих клеток в точном моделировании заболевания. Например, показаны существенные различия экспрессионного профиля между коммерческой линией лейомиосаркомы и первичной опухолью [57, 58].

К сожалению, разнообразие клеточных линий охватывает лишь наиболее распространенные гистологические подтипы СМТ. С учетом генетического дрейфа, связанного с многочисленными пассажами, существует острая необходимость в постоянном создании новых линий данных опухолей [59]. В то же время клоны, устойчивые к ХТ, существуют в опухоли изначально, а не формируются под воздействием химиопрепаратов, поэтому многообещающим подходом является применение персональных клеточных культур для тестирования терапии [60].

В качестве альтернативы *in vitro* существуют методы моделирования заболевания СМТ *in vivo*, включающие использование животных моделей для подбора терапии таких подтипов СМТ, как липосаркома, недифференцированная плеоморфная саркома и синовиальная саркома [61]. Однако эти модели имеют существенные недостатки, включая технологическую сложность создания, высокую стоимость проведения экспериментов и ограниченные возможности для детальной визуализации биологических процессов и получения точных количественных данных, которые более доступны в контролируемых условиях *in vitro* [62].

Несмотря на ограничения, использование клеточных культур и получение первичных линий СМТ остаются ключевыми методами исследования, поскольку дают базовое представление об ответе на классическую терапию и позволяют проводить поиск и подбор новых мишеней. Модели *in vitro* необходимы не только для подбора персонализированной терапии, но и для проведения фундаментальных исследований с целью определения причин и путей преодоления лекарственной и радиорезистентности [59]. Комбинированный подход, интегрирующий модели *in vitro* и *in vivo*, представляет

собой наиболее перспективную стратегию для разработки новых препаратов против СМТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Саркомы мягких тканей характеризуются высокой гетерогенностью гистологических подтипов и агрессивным клиническим течением. В основе биологического разнообразия и прогрессирования СМТ лежат генетические нарушения, определение которых играет ключевую роль как при постановке клинического диагноза, так и при оптимизации стратегии лечения. В диагностическом плане оптимальным является использование таргетного NGS с помощью мультигенных панелей, обеспечивающих диагностическую точность, необходимый объем информации и финансовую целесообразность для подбора персонализированной терапии. Последнее требует валидации на релевантных клеточных моделях *in vitro*.

Клеточные линии широко используют в качестве модели *in vitro* для проведения первоначальных функциональных исследований, благодаря их доступности, пролиферативной активности и высокой вос-

производимости экспериментальных результатов. Однако, несмотря на значительный прогресс в создании клеточных линий СМТ, существующий арсенал моделей остается недостаточным для комплексного изучения всех гистологических подтипов данной группы заболеваний. Кроме того, первичные клеточные культуры не всегда можно использовать для моделирования онкологических процессов из-за ограниченного жизненного цикла *in vitro*, недостаточной генетической стабильности и отсутствия взаимодействия с микроокружением и иммунной системой.

Необходимо разработать новые модели, учитывающие максимальное разнообразие клеточных типов и комплексность строения опухоли. В этом контексте перспективными направлениями являются разработка 3D-моделей, способных максимально точно имитировать архитектуру и физиологию опухолевой ткани, и проведение исследований *in vivo*. Персонализированные решения и новые методологические подходы культивирования клеток позволят разработать принципиально новые схемы лечения СМТ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Marusyk A., Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 2010;1805(1):105–17. DOI: 10.1016/j.bbcan.2009.11.002
2. Sbaraglia M., Dei Tos A.P. The pathology of soft tissue sarcomas. *Radiol Med* 2019;124(4):266–81. DOI: 10.1007/s11547-018-0882-7
3. Gaebler M., Silvestri A., Haybaeck J. et al. Three-dimensional patient-derived *in vitro* sarcoma models: promising tools for improving clinical tumor management. *Front Oncol* 2017;11(7):203. DOI: 10.3389/fonc.2017.00203
4. Mcconnell L., Houghton O., Stewart P. et al. A novel next generation sequencing approach to improve sarcoma diagnosis. *Mod Pathol* 2020;33(7):1350–9. DOI: 10.1038/s41379-020-0488-1
5. Vibert J., Watson S. The molecular biology of soft tissue sarcomas: current knowledge and future perspectives. *Cancers (Basel)* 2022;14(10):2548. DOI: 10.3390/cancers14102548
6. Kokkali S., Boukovinas I., De Bree E. et al. The impact of expert pathology review and molecular diagnostics on the management of sarcoma patients: a prospective study of the hellenic group of sarcomas and rare cancers. *Cancers (Basel)* 2024;16(13):2314. DOI: 10.3390/cancers16132314
7. Italiano A., Di Mauro I., Rapp J. et al. Clinical effect of molecular methods in sarcoma diagnosis (GENSARC): a prospective, multicentre, observational study. *Lancet Oncol* 2016;17(4):532–8. DOI: 10.1016/s1470-2045(15)00583-5
8. Benini S., Gamberi G., Cocchi S. et al. The efficacy of molecular analysis in the diagnosis of bone and soft tissue sarcoma: a 15-year mono-institutional study. *Int J Mol Sci* 2022;24(1):632. DOI: 10.3390/ijms24010632
9. Watkins J.A., Trotman J., Tadross J.A. et al. Introduction and impact of routine whole genome sequencing in the diagnosis and management of sarcoma. *Br J Cancer* 2024;131(5):860–9. DOI: 10.1038/s41416-024-02721-8
10. Gounder M.M., Agaram N.P., Trabucco S.E. et al. Clinical genomic profiling in the management of patients with soft tissue and bone sarcoma. *Nat Commun* 2022;13(1):3406. DOI: 10.1038/s41467-022-30496-0
11. Bean L.J.H., Funke B., Carlston C.M. et al. Diagnostic gene sequencing panels: from design to report—a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 2020;22(3):453–61. DOI: 10.1038/s41436-019-0666-z
12. Xu L., Xie X., Shi X. et al. Potential application of genomic profiling for the diagnosis and treatment of patients with sarcoma. *Oncol Lett* 2021;21(5):353. DOI: 10.3892/ol.2021.12614
13. Gusho C.A., Weiss M.C., Lee L. et al. The clinical utility of next-generation sequencing for bone and soft tissue sarcoma. *Acta Oncol (Stockholm, Sweden)* 2022;61(1):38–44. DOI: 10.1080/0284186x.2021.1992009
14. Nagahashi M., Shimada Y., Ichikawa H. et al. Next generation sequencing-based gene panel tests for the management of solid tumors. *Cancer Sci* 2019;110(1):6–15. DOI: 10.1111/cas.13837
15. Cao J., Chen L., Li H. et al. An accurate and comprehensive clinical sequencing assay for cancer targeted and immunotherapies. *Oncologist* 2019;24(12):e1294–302. DOI: 10.1634/theoncologist.2019-0236
16. Scheipl S., Brcic I., Moser T. et al. Molecular profiling of soft-tissue sarcomas with FoundationOne® Heme identifies potential targets for sarcoma therapy: a single-centre experience. *Ther Adv Med Oncol* 2021;13:17588359211029125. DOI: 10.1177/17588359211029125
17. FoundationOne® Heme. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527977/>
18. Jour G., Scarborough J.D., Jones R.L. et al. Molecular profiling of soft tissue sarcomas using next-generation sequencing: a pilot study toward precision therapeutics. *Hum Pathol* 2014;45(8):1563–71. DOI: 10.1016/j.humpath.2014.04.012
19. Pritchard C.C., Salipante S.J., Koehler K. et al. Validation and implementation of targeted capture and sequencing for the detection of actionable mutation, copy number variation, and gene rearrangement in clinical cancer specimens. *J Mol Diagn* 2014;16(1):56–67. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2013.08.004
20. Hattori E., Oyama R., Kondo T. Systematic review of the current status of human sarcoma cell lines. *Cells* 2019;8(2):157. DOI: 10.3390/cells8020157

21. Escudero J., Heredia-Soto V., Wang Y. et al. Eribulin activity in soft tissue sarcoma monolayer and three-dimensional cell line models: could the combination with other drugs improve its antitumoral effect? *Cancer Cell Int* 2021;21(1):646. DOI: 10.1186/s12935-021-02337-5
22. Fourré N., Millot J.M., Garnotel R. et al. *In situ* analysis of doxorubicin uptake and cytotoxicity in a 3D culture model of human HT-1080 fibrosarcoma cells. *Anticancer Res* 2006;26(6b):4623–6.
23. Kapalczyńska M., Kolenda T., Przybyła W. et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci* 2018;14(4):910–9. DOI: 10.5114/aoms.2016.63743
24. Blanco-Fernandez B., Gaspar V.M., Engel E. et al. Proteinaceous hydrogels for bioengineering advanced 3D tumor models. *Adv Sci (Weinheim)* 2021;8(4):2003129. DOI: 10.1002/adv.202003129
25. Roohani S., Loskutov J., Heufelder J. et al. Photon and proton irradiation in patient-derived, three-dimensional soft tissue sarcoma models. *BMC cancer* 2023;23(1):577. DOI: 10.1186/s12885-023-11013-y
26. Li Y.R., Yu Y., Kramer A. et al. An *ex vivo* 3D Tumor microenvironment-mimicry culture to study TAM modulation of cancer immunotherapy. *Cells* 2022;11(9):1583. DOI: 10.3390/cells11091583
27. Danilova A., Misyurin V., Novik A. et al. Cancer/testis antigens expression during cultivation of melanoma and soft tissue sarcoma cells. *Clin Sarcoma Res* 2020;10(1):3. DOI: 10.1186/s13569-020-0125-2
28. Taborska P., Lukac P., Stakheev D. et al. Novel PD-L1- and collagen-expressing patient-derived cell line of undifferentiated pleomorphic sarcoma (JBT19) as a model for cancer immunotherapy. *Sci Rep* 2023;13(1):19079. DOI: 10.1038/s41598-023-46305-7
29. Salawu A., Fernando M., Hughes D. et al. Establishment and molecular characterisation of seven novel soft-tissue sarcoma cell lines. *Br J Cancer* 2016;115(9):1058–68. DOI: 10.1038/bjc.2016.259
30. Ariizumi T., Ogose A., Kawashima H. et al. Establishment and characterization of a novel dedifferentiated liposarcoma cell line, NDDL5-1. *Pathol Int* 2011;61(8):461–8. DOI: 10.1111/j.1440-1827.2011.02683.x
31. Muff R., Botter S.M., Husmann K. et al. Explant culture of sarcoma patients' tissue. *Lab Invest* 2016;96(7):752–62. DOI: 10.1038/labinvest.2016.49
32. Cornillie J., Wozniak A., Li H. et al. Establishment and characterization of histologically and molecularly stable soft-tissue sarcoma xenograft models for biological studies and preclinical drug testing. *Mol Cancer Ther* 2019;18(6):1168–78. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-18-1045
33. Фролова А.А., Герашенко Т.С., Патышева М.Р. и др. Подготовка клеточной суспензии из опухолевого материала для проведения секвенирования единичных клеток. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2023;175(4):523–8. DOI: 10.47056/0365-9615-2023-175-4-523-528
Frolova A.A., Gerashchenko T.S., Patysheva M.R. et al. Preparation of a cell suspension from tumor material for single cell sequencing. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2023;175(4):523–8. (In Russ.). DOI: 10.47056/0365-9615-2023-175-4-523-528
34. Takai Y., Oyama R., Kito F. et al. Establishment and characterization of cell line of undifferentiated pleomorphic sarcoma. *Tissue Cult Res Commun* 2017;36(5):41–8. DOI: 10.11418/jtca.36.41
35. You H.J., Lee E.-Y., Rayhan A. et al. Abstract B009: Establishing new cell lines from undifferentiated pleomorphic sarcoma for sarcoma research. *Clin Cancer Res* 2022;28(18 Supplement):B009. DOI: 10.1158/1557-3265.sarcomas22-b009
36. Lee E.Y., Kim Y.H., Rayhan M.A. et al. New established cell lines from undifferentiated pleomorphic sarcoma for in vivo study. *BMB Rep* 2023;56(4):258–64. DOI: 10.5483/BMBRep.2022-0209
37. De Vita A., Recine F., Mercatali L. et al. Primary Culture of undifferentiated pleomorphic sarcoma: molecular characterization and response to anticancer agents. *Int J Mol Sci* 2017;18(12):2662. DOI: 10.3390/ijms18122662
38. Soft-Tissue Sarcoma Cell Panel. ATCC. Available at: <https://www.atcc.org/products/tcp-1019>
39. Cellosaurus search result: 1895 hits for "Cancer Dependency Map project" (DepMap) (includes Cancer Cell Line Encyclopedia - CCLE). Available at: [https://www.cellosaurus.org/search?query=%22Cancer%20Dependency%20Map%20project%20\(DepMap\)%20\(includes%20Cancer%20Cell%20Line%20Encyclopedia%20-%20CCLE\)%22](https://www.cellosaurus.org/search?query=%22Cancer%20Dependency%20Map%20project%20(DepMap)%20(includes%20Cancer%20Cell%20Line%20Encyclopedia%20-%20CCLE)%22)
40. Cammelli S., Cortesi A., Buwenge M. et al. The role of radiotherapy in adult soft tissues sarcoma of the extremities. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 2021;31(8):1583–96. DOI: 10.1007/s00590-021-02990-6
41. Miwa S., Wu P.-K., Tsuchiya H. Soft tissue sarcomas: treatment and management. *Cancers (Basel)* 2024;16(5):1042. DOI: 10.3390/cancers16051042
42. Tian Z., and Yao W. Chemotherapeutic drugs for soft tissue sarcomas: a review. *Front Pharmacol* 2023;14:1199292. DOI: 10.3389/fphar.2023.1199292
43. Fuchs J.W., Schulte B.C., Fuchs J.R. et al. Targeted therapies for the treatment of soft tissue sarcoma. *Front Oncol* 2023;13:1122508. DOI: 10.3389/fonc.2023.1122508
44. Banks L.B., D'angelo S.P. The role of immunotherapy in the management of soft tissue sarcomas: current landscape and future outlook. *J Nat Compr Canc Net* 2022;20(7):834–44. DOI: 10.6004/jnccn.2022.7027
45. Elkrief A., Alcindor T. Molecular targets and novel therapeutic avenues in soft-tissue sarcoma. *Curr Oncol* 2020;27(Suppl 1):34. DOI: 10.3747/co.27.5631
46. Fetisov T.I., Khazanova S.A., Shtompel P.A. et al. Perspectives of cell sensitivity/resistance assay in soft tissue sarcomas chemotherapy. *Int J Mol Sci* 2023;24(15):12292. DOI: 10.3390/ijms241512292
47. Su C., Kim S.K., Wang C.X. et al. Radiotherapy combined with intralesional immunostimulatory agents for soft tissue sarcomas. *Sem Radiat Oncol* 2024;34(2):243–57. DOI: 10.1016/j.semradonc.2024.01.001
48. Roeder F. Radiation therapy in adult soft tissue sarcoma – current knowledge and future directions: a review and expert opinion. *Cancers* 2020;12(11):3242. DOI: 10.3390/cancers12113242
49. Haas R., Floot B., Scholten A. et al. Cellular radiosensitivity of soft tissue sarcoma. *Radiat Res* 2021;196(1):23–30. DOI: 10.1667/RADE-20-00226.1
50. Brodin B.A., Wennerberg K., Lidbrink E. et al. Drug sensitivity testing on patient-derived sarcoma cells predicts patient response to treatment and identifies c-Sarc inhibitors as active drugs for translocation sarcomas. *Br J Cancer* 2019;120(4):435–43. DOI: 10.1038/s41416-018-0359-4
51. Que Y., Zhang X.L., Liu Z.X. et al. Frequent amplification of HDAC genes and efficacy of HDAC inhibitor chidamide and PD-1 blockade combination in soft tissue sarcoma. *J Immunother Cancer* 2021;9(2):33637599. DOI: 10.1136/jitc-2020-001696
52. Kerrison W.G.J., Lee A.T.J., Thway K. et al. Current Status and future directions of immunotherapies in soft tissue sarcomas. *Biomedicine* 2022;10(3):573. DOI: 10.3390/biomedicine10030573
53. Iwai Y., Baldwin X.L., Feeney T. et al. Trends in the use of immunotherapy to treat soft tissue sarcoma. *Am J Surg* 2024;236:115794. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2024.115794
54. Zajac A.E., Czarnecka A.M., Rutkowski P. The Role of macrophages in sarcoma tumor microenvironment

- and treatment. *Cancers (Basel)* 2023;15(21):5294. DOI: 10.3390/cancers15215294
55. Khansai M., Phitak T., Klangjorhor J. et al. Effects of sesamin on primary human synovial fibroblasts and SW982 cell line induced by tumor necrosis factor- α as a synovitis-like model. *BMC Complement Alter Med* 2017;17(1):532. DOI: 10.1186/s12906-017-2035-2
 56. Roomi M.W., Ivanov V., Kalinovsky T. et al. Inhibition of cell invasion and MMP production by a nutrient mixture in malignant liposarcoma cell line SW-872. *Med Oncol* 2007;24(4):394–401. DOI: 10.1007/s12032-007-0022-z
 57. Adams C.L., Dimitrova I., Post M.D. et al. Identification of a novel diagnostic gene expression signature to discriminate uterine leiomyoma from leiomyosarcoma. *Exp Mol Pathol* 2019;110:104284. DOI: 10.1016/j.yexmp.2019.104284
 58. Machado-Lopez A., Alonso R., Lago V. et al. Integrative genomic and transcriptomic profiling reveals a differential molecular signature in uterine leiomyoma *versus* leiomyosarcoma. *Int J Mol Sci* 2022;23(4):2190. DOI: 10.3390/ijms23042190
 59. Lu X., Liu M., Yang J. et al. Panobinostat enhances NK cell cytotoxicity in soft tissue sarcoma. *Clin Exp Immunol* 2022;209(2):127–39. DOI: 10.1093/cei/uxac068
 60. Avdonkina N., Danilova A., Misyurin V. et al. Biological features of tissue and bone sarcomas investigated using an *in vitro* model of clonal selection. *Pathol Res Pract* 2021;217:153214. DOI: 10.1016/j.prp.2020.153214
 61. Tretyakova M.S., Bokova U.A., Korobeynikova A.A. et al. Experimental models of tumor growth in soft tissue sarcomas. *Вестник Российского университета дружбы народов* 2023;27(4):459–69. DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-459-469
 62. Tretyakova M.S., Bokova U.A., Korobeynikova A.A. et al. Experimental models of tumor growth in soft tissue sarcomas. *Вестник Российского университета дружбы народов = RUDN Journal of Medicine*. 2023;27(4):459–69. (In Russ.). DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-459-46
 62. Katt M.E., Placone A.L., Wong A.D. et al. *In vitro* tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Front Bioeng Biotechnol* 2016;4:12. DOI: 10.3389/fbioe.2016.00012

Вклад авторов

У.А. Бокова, М.С. Третьякова: анализ данных литературы, написание текста статьи;
 П.К. Козлова: анализ данных литературы, написание статьи, редактирование;
 А.А. Коробейникова: анализ данных литературы, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала;
 М.Е. Меняйло: консультирование по вопросам сарком, редактирование;
 Т.С. Герашенко: курирование проекта, написание текста статьи, редактирование;
 Е.В. Денисов: курирование проекта, редактирование.

Authors' contributions

U.A. Bokova, M.S. Tretyakova: analysis of literature data, article writing;
 P.K. Kozlova: literature data analysis, article writing, editing;
 A.A. Korobeynikova: analysis of literature data, article writing, preparation of illustrative material;
 M.E. Menyailo: sarcoma consulting, editing;
 T.S. Gerashchenko: supervising the project, article writing, editing;
 E.V. Denisov: project supervision, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

У.А. Бокова / U.A. Bokova: <https://orcid.org/0000-0003-2179-5685>
 М.С. Третьякова / M.S. Tretyakova: <https://orcid.org/0000-0002-5040-931X>
 П.К. Козлова / P.K. Kozlova: <https://orcid.org/0009-0003-4139-2338>
 А.А. Коробейникова / A.A. Korobeynikova: <https://orcid.org/0000-0002-2633-9884>
 М.Е. Меняйло / M.E. Menyailo: <https://orcid.org/0000-0003-4630-4934>
 Т.С. Герашенко / T.S. Gerashchenko: <https://orcid.org/0000-0002-7283-0092>
 Е.В. Денисов / E.V. Denisov: <https://orcid.org/0000-0003-2923-9755>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № 075-00490-25-04 (регистрационный номер темы 125042105351-3).

Funding. The work was performed within the framework of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 075-00490-25-04 (registration number of the topic 125042105351-3).

Статья поступила: 05.06.2025. **Принята к публикации:** 07.08.2025. **Опубликована онлайн:** 06.10.2025.

Article submitted: 05.06.2025. **Accepted for publication:** 07.08.2025. **Published online:** 06.10.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-46-56>

Тамоксифен и регуляция стресс-индуцированного старения в клетках рака молочной железы

Е.И. Михеевич, О.Е. Андреева, Д.В. Сорокин, А.М. Щербаков, П.Б. Копнин, М.В. Гудкова, М.А. Красильников

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

Контакты: Михаил Александрович Красильников krasilnikovm1@ya.ru

Введение. Известно, что опухолевые клетки не подвержены репликативному старению – как правило, за счет гиперактивации теломеразы, восстанавливающей длину теломер при каждом цикле деления. В то же время инициировать старение в опухолевых клетках оказалось возможным при действии сублетальных доз цитостатиков или облучении – это так называемое стресс-индуцированное, или нерепликативное старение, исследование механизма и способов регуляции которого является одной из актуальных задач современной онкологии.

Цель исследования – изучение механизмов доxorубин-индуцированного старения клеток рака молочной железы различного происхождения и возможных подходов к регуляции нерепликативного старения.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках рака молочной железы MCF-7 и MDA-MB-231. Степень старения клеток оценивали по уровню активации β-галактозидазы, изменению морфологии клеток и активации p53/p21-сигналинга. Для исследования экспрессии/активности клеточных белков использовали колориметрические методы, репортерный анализ и иммуноблоттинг. Нокдаун ДНК метилтрансферазы 3A (DNMT3A) проводили по стандартной методике с применением лентивирусного вектора, кодирующего antisense RNA DNMT3A.

Результаты. Продемонстрирован потенцирующий эффект тамоксифена при развитии доxorубин-индуцированного старения, в том числе в эстрогеннезависимых клетках рака молочной железы. Обнаружено усиление нерепликативного старения в резистентных клетках, характеризующихся конститутивным подавлением экспрессии DNMT3A. Впервые установлено, что подавление DNMT3A в присутствии децитабина или при нокдауне DNMT3A обеспечивает усиление и сохранение нерепликативного старения в клетках MCF-7.

Заключение. Установлена возможность усиления и поддержания нерепликативного старения в клетках рака молочной железы в присутствии антиэстрогена тамоксифена, продемонстрировано значение DNMT3A в регуляции доxorубин-индуцированного старения.

Ключевые слова: рак молочной железы, гормональная резистентность, тамоксифен, старение, DNMT3A

Для цитирования: Михеевич Е.И., Андреева О.Е., Сорокин Д.В. и др. Тамоксифен и регуляция стресс-индуцированного старения в клетках рака молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(3):46–56.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-46-56>

Tamoxifen and regulation of stress-induced senescence in breast cancer cells

E.I. Mikhaevich, O.E. Andreeva, D.V. Sorokin, A.M. Scherbakov, P.B. Kopnin, M.V. Gudkova, M.A. Krasil'nikov

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

Contacts: Mikhail Alexandrovich Krasil'nikov krasilnikovm1@ya.ru

Introduction. Tumor cells are known not to undergo replicative aging – usually due to hyperactivation of telomerase, which restores telomere length during each cell division cycle. However, it is possible to induce aging in tumor cells through sublethal doses of cytostatics or irradiation – this is the so-called stress-induced or non-replicative senescence. Studying the mechanisms and regulatory pathways of this process is one of the important areas of modern oncology.

Aim. To investigate the mechanisms of doxorubicin-induced senescence in different breast cancer cell subtypes and to explore possible approaches to regulating non-replicative aging.

Materials and methods. The experiments were performed on *in vitro* cultured breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. Cellular senescence was assessed by β-galactosidase activity, morphological changes, and activation of the p53/p21 signaling

pathway. Colorimetric assays, reporter analysis, and immunoblotting were used to evaluate the expression and activity of cellular proteins. DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) knockdown was achieved using a standard lentiviral vector encoding antisense RNA against DNMT3A.

Results. A potentiating effect of tamoxifen on doxorubicin-induced senescence – including in estrogen-independent breast cancer cells – was demonstrated. Enhanced non-replicative senescence was observed in resistant cells characterized by constitutive suppression of DNMT3A expression. For the first time, it was shown that DNMT3A suppression – either via decitabine treatment or DNMT3A knockdown – leads to an increase and maintenance of non-replicative senescence in MCF-7 cells.

Conclusion. The findings indicate that non-replicative senescence in breast cancer cells can be enhanced and sustained in the presence of the antiestrogen tamoxifen, and underscore the key role of DNMT3A in regulating doxorubicin-induced senescence.

Keywords: breast cancer, hormonal resistance, tamoxifen, aging, DNMT3A

For citation: Mikhaevich E.I., Andreeva O.E., Sorokin D.V. et al. Tamoxifen and regulation of stress-induced senescence in breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = Advances in Molecular Oncology 2025;12(3):46–56. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-46-56>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время старение и опухолевая трансформация рассматриваются как 2 основных пути клеточной дедифференцировки, ассоциированной с возрастом [1, 2]. Клетки стареющего организма оказываются перед выбором: либо дальнейшее сокращение теломер [3–5], прекращение деления и переход в состояние программированного старения (senescence), либо иммортализация и злокачественная трансформация клеток [6, 7]. В целом речь идет о 2 независимых путях дедифференцировки, однако в последнее время появились данные о возможности частичного перехода опухолевых клеток в состояние senescence, в том числе на фоне противоопухолевой терапии [8, 9]. Подробно описаны феномены клеточного старения, индуцированного химиопрепаратами (chemotherapy-induced senescence) и облучением (radiation-induced senescence), суть которых заключается в торможении пролиферации и переходе опухолевых клеток в состояние частичного старения в условиях действия минимальных, сублетальных доз химиопрепаратов или облучения [10]. Механизм подобных изменений малоизучен, и дальнейшие исследования в этом направлении могут послужить основой для разработки новых подходов к противоопухолевой терапии.

Доксорубин – цитостатический препарат из группы антрациклиновых антибиотиков [11]. Он является интеркалирующим агентом, а также воздействует на клеточные мембраны и индуцирует накопление в клетке активных форм кислорода [12]. Доксорубин получен из *Streptomyces peucetius* var. *caesius* в 1970-е годы и широко используется для лечения таких опухолей, как рак молочной железы (РМЖ), легкого, желудка, яичников, неходжкинской и ходжкинской лимфом, сарком и ряда опухолей у детей [13, 14].

Известны 2 основных механизма действия доксорубина в опухолевой клетке:

- интеркаляция ДНК и нарушение процессов репарации ДНК, которые контролируются топоизомеразами;

- генерация свободных радикалов и повреждение ими клеточных мембран, ДНК и белков.

Доксорубин может индуцировать апоптоз клеток через 24 ч в дозозависимой манере [15, 16]. В отличие от апоптоза, старение – относительно стабильное состояние с активным метаболизмом [17]. Оно является более отсроченным по времени эффектом доксорубина. Как клетка делает выбор между гибелью или старением, пока до конца не изучено.

Действие сублетальных доз доксорубина на нормальные и опухолевые клетки сопровождается торможением клеточного деления и переходом клеток в состояние так называемого преждевременного, нерепликативного старения. Эффект сравнительно непродолжительный, и спустя определенное время после отмены химиопрепарата клетки могут возвращаться к активному росту.

Цель исследования – изучение механизма доксорубин-индуцированного старения в культивируемых *in vitro* клетках различных подтипов РМЖ и возможных путей усиления и поддержания индуцированного старения в опухолевых клетках.

В экспериментах на клеточных линиях РМЖ различного происхождения мы показали эффект преждевременного старения клеток, включая такие классические характеристики, как активация p53/p21-сигналинга, повышение активности β-галактозидазы, изменение морфологии при культивировании клеток с сублетальными дозами доксорубина. Продемонстрирована возможность индукции и поддержания senescence-фенотипа клеток РМЖ с помощью гормональных цитостатиков. Впервые обнаружено, что подавление экспрессии ДНК метилтрансфераз потенцирует эффект преждевременного старения и предотвращает реиндукцию опухолевого роста в клетках РМЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках РМЖ MCF-7 и MDA-MB-231.

Клеточные культуры и реактивы. Клетки РМЖ человека линий MCF-7 и MDA-MB-231 культивировали

в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10 % эмбриональной сыворотки телят (FBS, HyClone, США) и гентамицин (50 ед./мл) («ПанЭко», Россия) при 37 °C и 5 % CO₂. Культивирование клеток выполняли в инкубаторе NU-5840E (NuAire, США). При анализе скорости роста количество клеток определяли с помощью МТТ-теста [18] с модификациями, описанными в работе [19]. Тест основан на восстановлении живыми клетками реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2)-2,5-дифенилтетразол бромид) (AppliChem, Германия) в нерастворимые в культуральных средах кристаллы формазана.

Определение активности β-галактозидазы. Для определения активности β-галактозидазы клетки промывали 1 мл стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS), фиксировали в 1 мл 2 % раствора формальдегида в течение 3–5 мин и отмывали в растворе PBS. Фиксированные клетки инкубировали 12–16 ч при 37 °C без CO₂ в растворе: 40 мМ фосфатно-цитратного буфера; рН 6,0; 5 мМ K₃Fe(CN)₆; 5 мМ K₄Fe(CN)₆; 2 мМ MgCl₂; 150 мМ NaCl; 1 мг/мл X-Gal (5-бromo-4-хлоро-3-индоил-бета-D-галактопиранозид), затем отмывали в PBS и определяли количество окрашенных клеток под микроскопом.

Репортерный анализ. Для определения транскрипционной активности рецептора эстрогенов α (ERα) проводили трансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген — репортер люциферазы, любезно предоставленной George Reid, под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом [20]. Для контроля за эффективностью и потенциальной токсичностью процедуры трансфекции применяли котрансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген β-галактозидазы, как описано ранее в работе [19]. Активность люциферазы измеряли по протоколу производителя набора реагентов (Promega, США) на люминометре Tescan Infinite M200 Pro (Tescan, Швейцария). Активность люциферазы выражали в условных единицах как отношение уровня хемилюминесцентного сигнала к уровню оптической плотности, обнаруженной в тесте с β-галактозидазой [19].

Иммуноблоттинг. Для получения тотального клеточного экстракта к образцам клеток добавляли буфер следующего состава: 50 мМ Трис-HCl рН 7,4; 1 % Igepal CA-630; 150 мМ NaCl; 1 мМ тетраацетата этилендиамина; 1 мМ дитиотреитола; 1 мкг/мл апротинина, лейпептина и пепстатина; 1 мМ фторида натрия и ортованадата натрия (Merck, США). Образцы клеточных экстрактов центрифугировали (10 000g, 10 мин, 4 °C, центрифуга Eppendorf 5417R) и проводили электрофорез и иммуноблоттинг, как описано ранее в работе [21]. В цитозольных экстрактах исследовали содержание Snail, p21, p53 и его формы, фосфорилированной по остатку Ser15, ERα, GREB1, циклина D1, CDK4, CDK6, PARP и его расщепленной формы (Cell Signaling Technology, США). Для контроля за эффективностью иммуноблоттинга использовали антитела

к α-тубулину (Cell Signaling Technology, США). Детекцию хемилюминесценции проводили по протоколу, описанному в работе D. Mruk и C. Cheng [22].

Нокдаун ДНК-метилтрансферазы 3A (DNMT3A). Для получения лентивирусных частиц упаковочные клетки HEK283FT (Thermo Fisher Scientific, США) котрансфицировали плазмидой pLKO.1-TRC (Addgene, США), кодирующей целевые шпилечные РНК (shRNA), и вспомогательными упаковочными плазмидами pΔR8.2 (Addgene, США) и pVSV-G (Addgene, США). Для получения shRNA DNMT3A использованы следующие праймеры: Forward 5' — CCGGGCCAAGGTCATTGCAGGA-ACTCGAGTTCCTGCAATGACCTTGGCTTTTG-3'; Reverse 5' — AATTCAAAAAGCCAAGGTCATTGCAGGA-ACTCGAGTTCCTGCAATGACCTTGGC-3'.

Трансфекцию проводили с использованием реагента GenJect-39TM (Molecta, Россия). Для получения вирусных частиц кондиционированную среду собирали через 24 и 48 ч после трансфекции. Клетки MCF-7 инкубировали с кондиционированной средой и 8 мкг/мл полибрена (Sigma, США). Для последующего отбора инфицированных клеток в течение 4–5 дней использовали пурамицин (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Microsoft Excel. Во всех случаях различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперименты проводили на клетках эстрогензависимого РМЖ линии MCF-7 (люминальный А подтип), эстрогеннезависимой сублинии MCF-7/T, полученной в результате длительного культивирования клеток родительской линии в присутствии антиэстрогена тамоксифена, и клетках эстрогеннезависимого РМЖ MDA-MB-231 (трижды негативный рак).

Доксорубин-индуцированное старение клеток MCF-7. Результаты сравнительного анализа чувствительности клеточных линий к доксорубину продемонстрировали относительно одинаковый уровень чувствительности клеток MCF-7 и MDA-MB-231; в то же время тамоксифенрезистентные клетки MCF-7/T отличались существенно более высокой чувствительностью к доксорубину (рис. 1).

При исследовании влияния доксорубина на активность β-галактозидазы установлено, что культивирование клеток MCF-7 в присутствии 0,2 мкМ этого препарата в течение 3 сут с последующим переводом в среду без него сопровождается выраженным повышением активности β-галактозидазы на фоне частичного блока пролиферации и характерных изменений морфологии клеток, в том числе увеличения размеров, изменения формы и пластичности клеток (рис. 2, а).

Как известно, индуцированное химиопрепаратами преждевременное старение сопровождается активацией p53-сигналинга, определяющего в итоге остановку клеточного деления и переход клеток в состояние

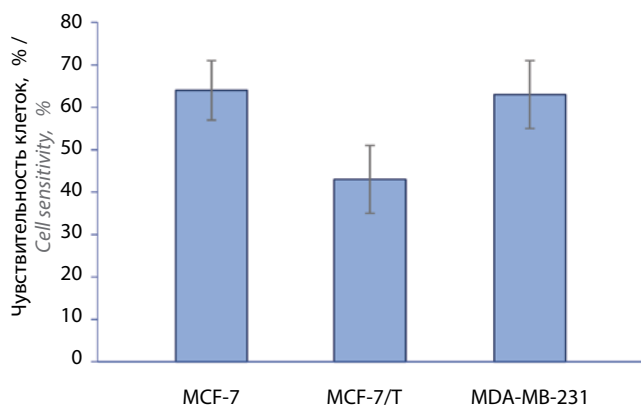


Рис. 1. Чувствительность клеток рака молочной железы к доксорубицину. Клетки MCF-7, MDA-MB-231 и MCF-7/T культивировали в присутствии 0,2 мкМ доксорубицина в течение 3 сут с дальнейшим определением количества выживших клеток с помощью МТТ-теста. Представлено количество выживших клеток в процентах относительно контроля

Fig. 1. Sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin. MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-7/T cells were cultured in the presence of 0.2 μ M doxorubicin for 3 days with subsequent determination of the cell viability using the MTT test. The number of viable cells is shown as a percentage of the control

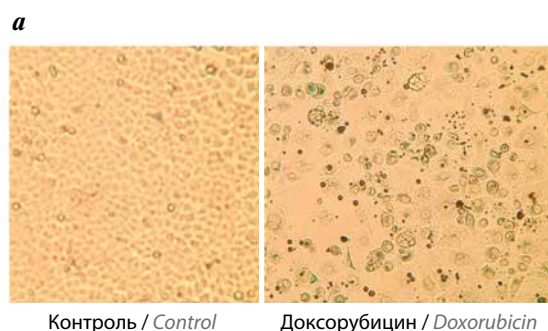


Рис. 2. Влияние доксорубицина на активность β -галактозидазы и профиль сигнальных белков в клетках MCF-7. Клетки MCF-7, культивированные в течение 3 сут в отсутствие (контроль) или в присутствии 0,2 мкМ доксорубицина с последующим переводом в стандартную среду и окрашкой на β -галактозидазу (а) и иммуноблоттингом белков (б). Представлены результаты одного из 3 независимых экспериментов

Fig. 2. Effect of doxorubicin on β -galactosidase activity and signaling protein profile in MCF-7 cells. MCF-7 cells cultured for 3 days in the absence (control) or presence of 0.2 μ M doxorubicin (doxorubicin), followed by transfer to standard medium and staining for β -galactosidase (a) and immunoblotting of proteins (b). Results from one of three independent experiments are presented

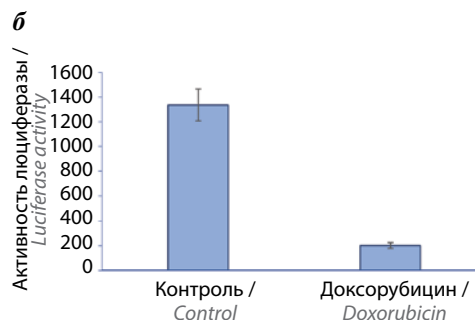


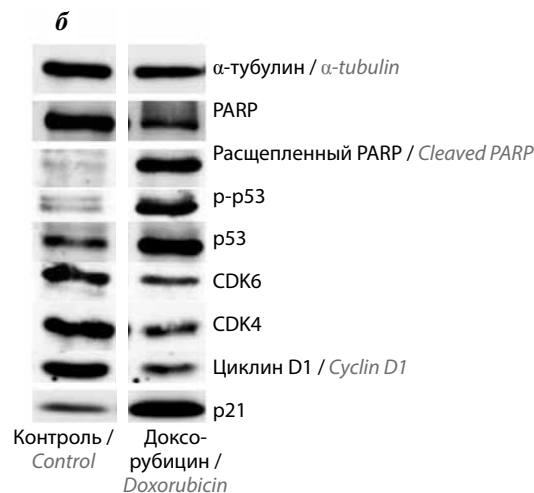
Рис. 3. Доксорубин и эстрогеновый сигналинг в клетках MCF-7. Клетки MCF-7 культивировали в течение 3 сут без добавок или в присутствии 0,2 мкМ доксорубицина с его последующей отменой на 5 сут. Представлены результаты иммуноблоттинга образцов клеток с антителами к рецептору эстрогенов α (ER α) (а) и определения транскрипционной активности ER α методом репортерного анализа (б)

Fig. 3. Doxorubicin and estrogen signaling in MCF-7 cells. MCF-7 cells were cultured in the absence or in the presence of 0.2 μ M doxorubicin for 3 days, followed by its withdrawal for 5 days. The results of immunoblotting of cell samples with antibodies to estrogen receptor α (ER α) (a) and determination of ER α transcriptional activity by reporter assay (b) are presented

senescence. Анализ профиля сигнальных белков в клетках MCF-7, предобработанных доксорубицином, выявил типичную для нерепликативного старения активацию p53 и p21, сопровождавшуюся подавлением экспрессии циклинзависимых киназ CDK 4 и 6 (рис. 2, б).

Результаты исследования влияния доксорубицина на эстрогеновый сигналинг показали существенное снижение экспрессии рецептора эстрогенов (рис. 3, а) и подавление транскрипционной активности последнего (рис. 3, б).

Влияние тамоксифена на доксорубин-индуцированное старение клеток MCF-7. В какой мере подавление эстрогенового сигналинга ассоциировано с развитием доксорубин-индуцированного старения? Для ответа на этот вопрос проведен анализ влияния антиэстрогена тамоксифена на эффективность нерепликативного старения клеток. Обнаружено, что культивирование клеток MCF-7, предобработанных доксорубицином, в присутствии тамоксифена сопровождается значительным повышением активности β -галактозидазы (рис. 4, а). Тамоксифен приводит к подавлению эстрогенового сиг-



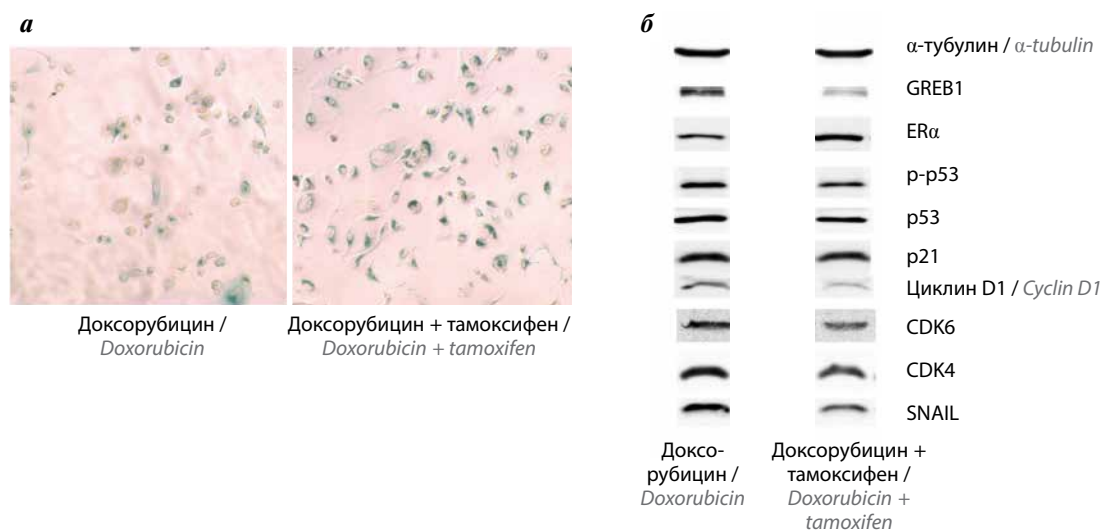


Рис. 4. Влияние тамоксифена на активность β -галактозидазы и профиль сигнальных белков в клетках MCF-7, предобработанных доксорубицином: а — окраска на β -галактозидазу; б — иммуноблоттинг белков. Клетки MCF-7 культивировали в течение 3 сут в присутствии 0,2 мкМ доксорубицина с его последующей отменой и культивированием в течение 3 сут без добавок (доксорубицин) и в присутствии 5 мкМ тамоксифена (доксорубицин + тамоксифен). Представлены результаты одного из 3 независимых экспериментов

Fig. 4. Effect of tamoxifen on β -galactosidase activity and signaling protein profile in MCF-7 cells pretreated with doxorubicin: a — staining for β -galactosidase; б — immunoblotting of proteins. MCF-7 cells were cultured for 3 days in the presence of 0.2 μ M doxorubicin, then withdrawn and cultured for 3 days without additions (doxorubicin) and in the presence of 5 μ M tamoxifen (doxorubicin + tamoxifen). Results of one of three independent experiments are presented

налинга на фоне практически неизменной экспрессии ER и частичному снижению ростового сигналинга без заметной активации апоптотических белков (рис. 4, б), что поддерживает клетки в состоянии пролиферативного блока и старения. Следует отметить, что действие этого препарата на исходные клетки MCF-7 в отсутствие доксорубицина не сопровождается сколько-нибудь заметным накоплением β -галактозидазы и клеточным старением (рис. 5, а), что свидетельствует о необходимости преактивации апоптотического сигналинга p53/p21 при нерепликативном старении клеток.

При оценке пролиферативного статуса доксорубицин-индуцированных клеток мы показали, что после отмены препарата клетки постепенно, в течение 10 сут, переходят к стадии активной пролиферации. Добавление тамоксифена поддерживает senescence-фенотип клеток и предотвращает реиндукцию опухолевого роста (рис. 5, б). Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной способности тамоксифена поддерживать клеточный арест и усиливать эффект преждевременного старения клеток эстрогензависимого РМЖ.

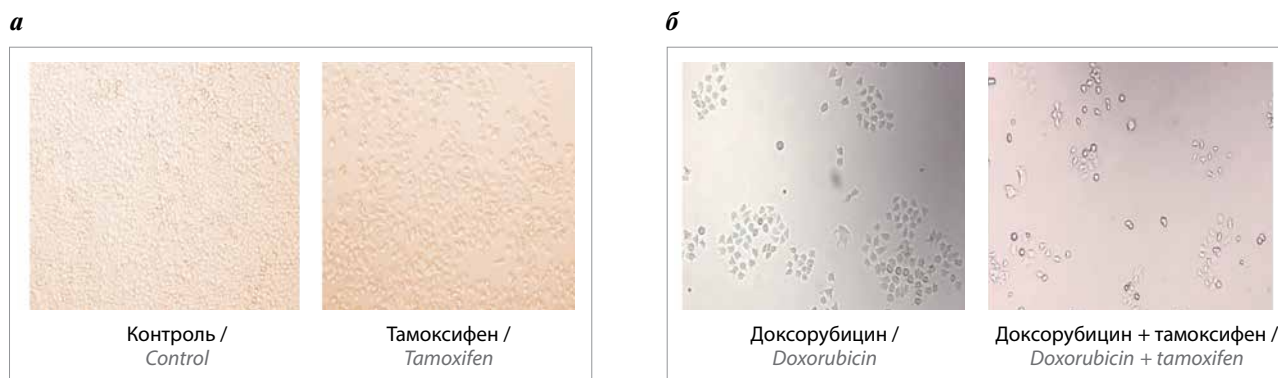


Рис. 5. Тамоксифен и регуляция опухолевого роста: а — окраска на β -галактозидазу клеток MCF-7 до (контроль) и после (тамоксифен) культивирования с тамоксифеном (5 мкМ, в течение 3 сут); б — световая микроскопия клеток MCF-7, культивированных в течение 3 сут в присутствии 0,2 мкМ доксорубицина и затем 10 сут в среде без доксорубицина без добавок (доксорубицин) и в присутствии 5 мкМ тамоксифена (доксорубицин + тамоксифен)

Fig. 5. Tamoxifen and regulation of tumor growth: a — β -galactosidase staining of MCF-7 cells before (control) and after (tamoxifen) cultivation with tamoxifen (5 μ M, 3 days); б — light microscopy of MCF-7 cells cultured for 3 days in the presence of 0.2 μ M doxorubicin and then 10 days in medium without doxorubicin without additions (doxorubicin) and in the presence of 5 μ M tamoxifen (doxorubicin + tamoxifen)

Доксорубин-индуцированное старение клеток эстрогеннезависимого рака молочной железы. Как известно, резистентность клеток РМЖ к тамоксифену, как врожденная, так и приобретенная, является одним из основных факторов, ограничивающих противоопухолевый эффект гормональной терапии. С учетом описанного выше участие тамоксифена в поддержании доксорубин-индуцированного старения представляло безусловный интерес и обуславливает важность исследования эффективности индуцированного старения в тамоксифенрезистентных клетках РМЖ. Эксперименты проводились на модели врожденной гормональной резистентности — на клетках трижды негативного РМЖ MDA-MB-231 и на клетках с приобретенной резистентностью к тамоксифену MCF-7/T, полученных в результате длительного культивирования родительских клеток MCF-7 с этим препаратом. Как отмечалось выше, выявлено, что чувствительность к рост-ингибирующему действию доксорубина клеток MCF-7 сравнима с чувствительностью клеток MDA-MB-231, в то время как клетки MCF-7/T отличались существенно более высокой чувствительностью к этому препарату (см. рис. 1). Как и в случае с клетками MCF-7, прекультивирование резистентных клеток MCF-7/T и MDA-MB-231 с доксорубином в течение 3 сут приводит к индукции характерных для стареющих клеток изменений: активации β -галактозидазы, клеточному аресту (рис. 6)

и активации p53/p21-сигналинга (рис. 7). При этом резистентные клетки MCF-7/T отличаются значительно более выраженной активацией β -галактозидазы под действием доксорубина, что коррелирует с большей чувствительностью этих клеток к рост-ингибирующему действию данного препарата. Добавление тамоксифена сопровождается дополнительной активацией β -галактозидазы, причем даже в рецептор-отрицательных клетках MDA-MB-231, что свидетельствует о возможных рецепторнезависимых эффектах этого лекарственного средства.

Следует отметить, что если клетки MCF-7 экспрессируют p53 дикого типа, то для клеток MDA-MB-231 характерна онкогенная мутация p53-R280K, блокирующая апоптотический потенциал p53 [23]. Согласно представленным результатам, несмотря на мутантный p53, клетки MDA-MB-231 отвечают на доксорубин и активацией p21 — одного из основных физиологических блокаторов клеточного цикла, и остановкой клеточного деления, что свидетельствует о реализации в данном случае p53-независимого механизма блока пролиферации и апоптоза.

В целом полученные данные свидетельствуют о плейотропных эффектах тамоксифена в клетках РМЖ, приводящих, в том числе в эстрогеннезависимых клетках, к частичному клеточному аресту и дополнительной стимуляции нерепликативного старения.

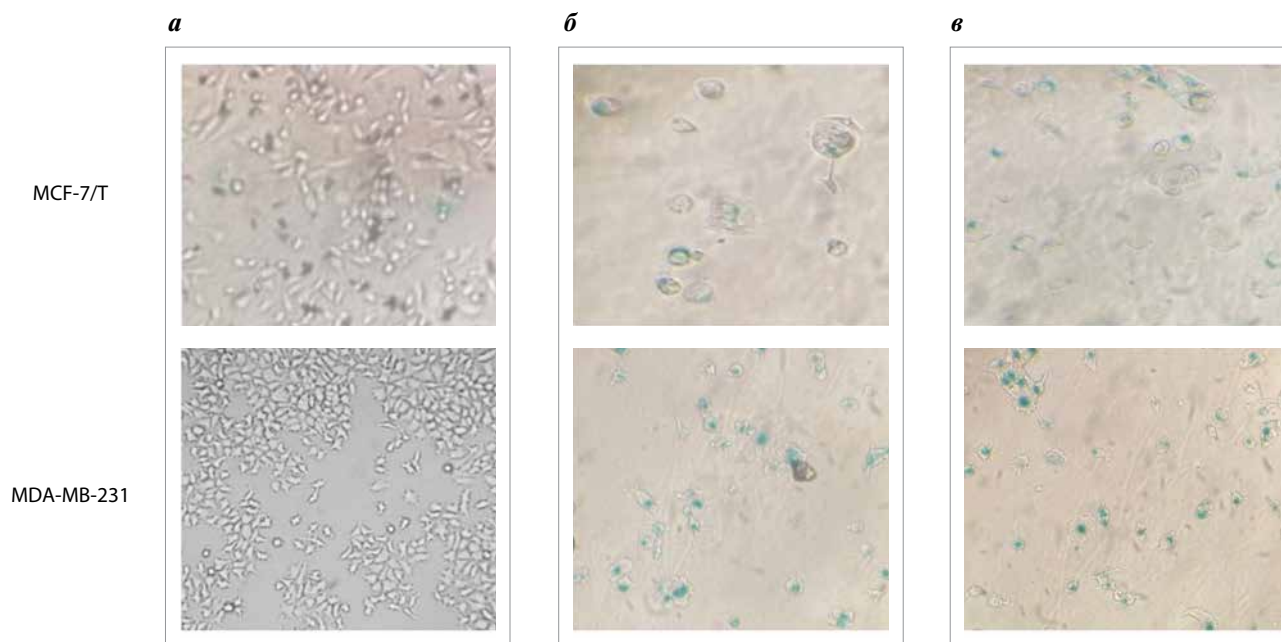


Рис. 6. Тамоксифен и резистентные клетки. Клетки MCF-7/T и MDA-MB-231 культивировали в течение 3 сут без добавок (а) и в присутствии 0,2 мкМ доксорубина (б, в) с последующей отменой доксорубина и продолжением культивирования без добавок (б) и в присутствии 5 мкМ тамоксифена (в) в течение 3 сут. Окраска на β -галактозидазу

Fig. 6. Tamoxifen and resistant cells. MCF-7/T and MDA-MB-231 cells were cultured for 3 days without additions (a) and in the presence of 0.2 μ M doxorubicin (б, в), followed by withdrawal of doxorubicin and continued cultivation without additions (б) and in the presence of 5 μ M tamoxifen (C) for 3 days. Staining for β -galactosidase

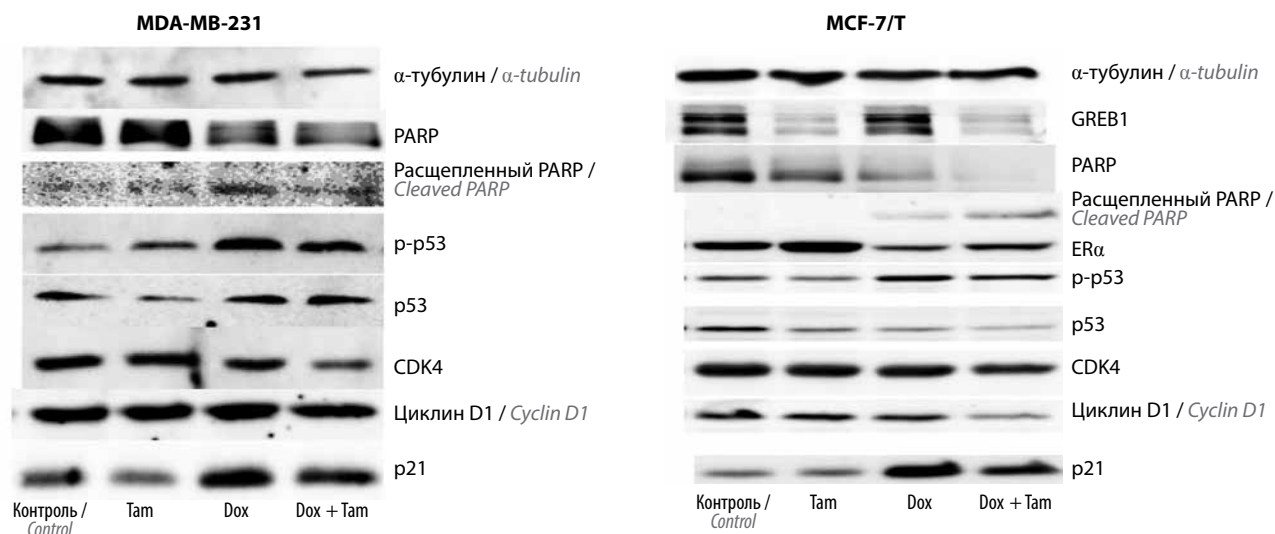


Рис. 7. Тамоксифен и резистентные клетки: иммуноблоттинг образцов клеток. Клетки MCF-7/T и MDA-MB-231 культивировали с доксорубицином (Dox) и тамоксифеном (Tam) по схеме, приведенной на рис. 6. Представлены результаты одного из 3 независимых экспериментов. ERα — рецептор эстрогенов α.

Fig. 7. Tamoxifen and resistant cells: Immunoblotting of cell samples. MCF-7/T and MDA-MB-231 cells were cultured with doxorubicin (Dox) and tamoxifen (Tam) as shown in fig. 6. Results from one of three independent experiments are shown. ERα — estrogen receptor α.

ДНК метилтрансферазы, апоптотический сигналинг и нерепликативное старение. Согласно полученным ранее данным, длительное культивирование клеток MCF-7 с тамоксифеном приводит к выраженному по-

давлению экспрессии и активности DNMT3A. Мы продемонстрировали, что формирование эстрогеннезависимого фенотипа может быть ассоциировано с конститутивным подавлением DNMT3A и активацией

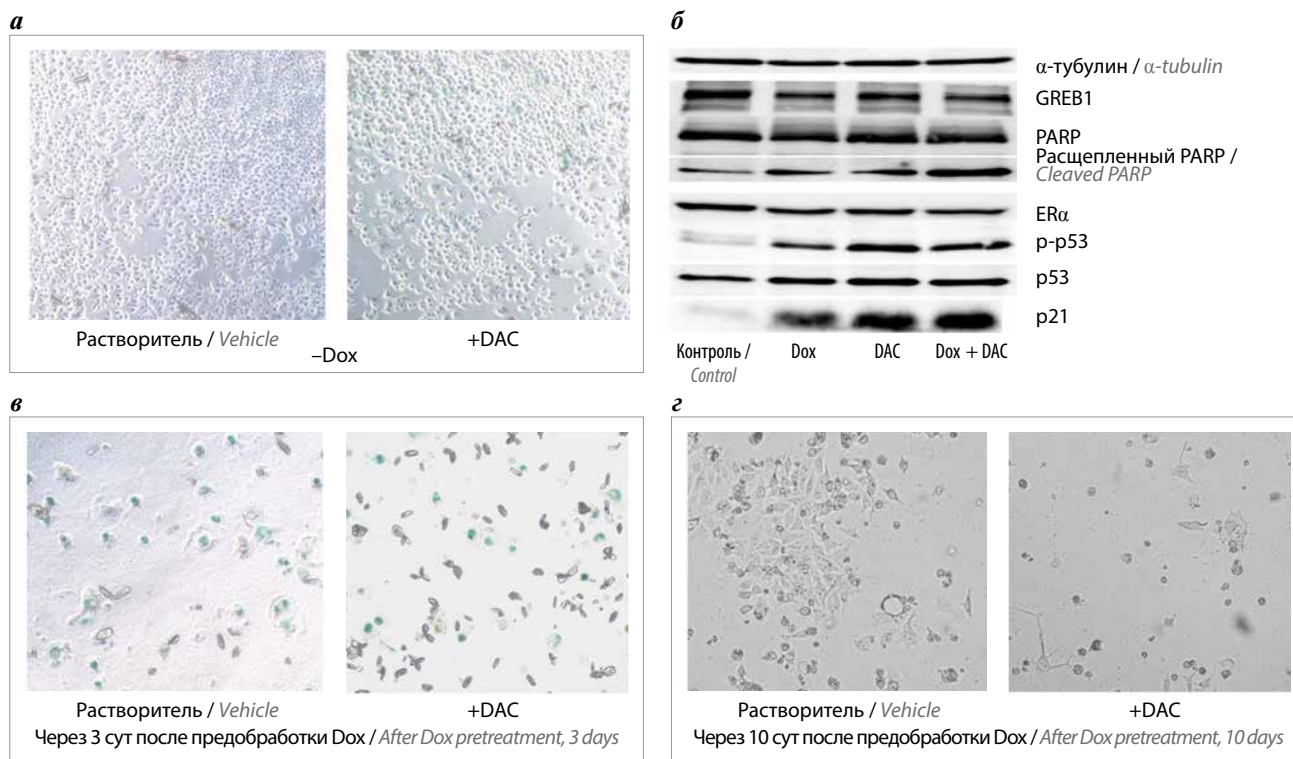


Рис. 8. Децитабин и доксорубин-индуцированное старение клеток MCF-7. Клетки MCF-7 без обработки (а) и предобработанные доксорубицином (Dox) (б) культивировали в отсутствие или в присутствии ингибитора DNMT децитабина (DAC) в течение 3 сут с последующим определением активности β-галактозидазы, затем проводили иммуноблоттинг клеточных экстрактов (в). Восстановление клеточного роста через 10 сут после предобработки доксорубицином и культивирования клеток с децитабином — световая микроскопия (г). ERα — рецептор эстрогенов α.

Fig. 8. Decitabine and doxorubicin-induced senescence of MCF-7 cells. MCF-7 cells, untreated (a) and pretreated with doxorubicin (b), were cultured in the absence or presence of the DNMT inhibitor decitabine (DAC) for 3 days, followed by determination of β-galactosidase activity, then immunoblotting was performed of cell extracts (e). Restoration of cell growth 10 days after doxorubicin pretreatment and cell cultivation with decitabine — light microscopy (g). ERα — estrogen receptor α.

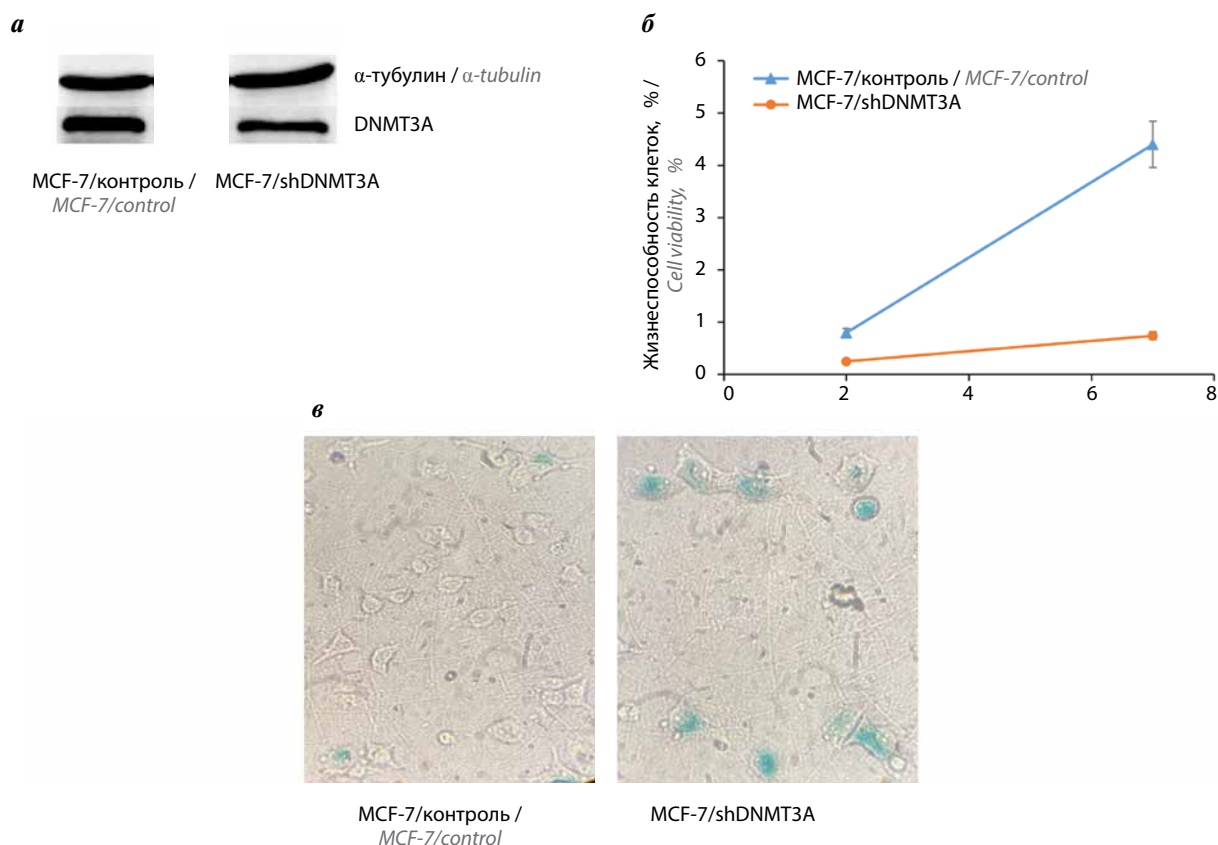


Рис. 9. Нокдаун ДНК-метилтрансферазы 3A (DNMT3A) и чувствительность клеток MCF-7 к доксорубицин-индуцированному старению. Экспрессия DNMT3A в клетках, трансфицированных shDNMT3A (а). Восстановление роста (б) и активность β-галактозидазы (в) в контрольных и shDNMT3A-трансфицированных клетках после предобработки доксорубицином

Fig. 9. DNA-methyltransferase 3A (DNMT3A) knockdown and sensitivity of MCF-7 cells to doxorubicin-induced senescence. DNMT3A expression in shDNMT3A-transfected cells (a). Growth restoration (b) and β-galactosidase activity (c) in control and shDNMT3A-transfected cells after doxorubicin pretreatment

апоптотического сигналинга. Эти изменения характерны также для клеток MCF-7/T и MDA-MB-231 [24].

В проведенных экспериментах для исследования роли DNMT в индукции нерепликативного старения клетки MCF-7 без обработки и предобработанные доксорубицином культивировали в присутствии ингибитора DNMT децитабина с последующим определением активности β-галактозидазы и экспрессии профильных сигнальных белков. Как и в случае с тамоксифеном, действие децитабина на необработанные клетки не приводило к повышению активности β-галактозидазы (рис. 8, а). В то же время культивирование с децитабином клеток, предобработанных доксорубицином, поддерживало высокий уровень β-галактозидазы, сопровождалось стимуляцией в клетках p53-сигналинга (рис. 8, б, в) и приводило к последующему торможению реиндукции опухолевого роста (рис. 8, г).

Участие DNMT3A в регуляции нерепликативного старения подтверждено в экспериментах по нокдауну DNMT3A при трансфекции shRNA DNMT3A. Мы показали, что подавление экспрессии DNMT3A (рис. 9, а) приводит к заметному снижению скорости роста (рис. 9, б)

и поддержанию высокого уровня (рис. 9, в) β-галактозидазы в клетках MCF-7, предобработанных доксорубицином.

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что подавление DNMT3A относится к числу факторов, поддерживающих нерепликативное старение опухолевых клеток, и позволяют рассматривать соединения — негативные регуляторы DNMT3A — в качестве агентов, стабилизирующих состояние клеточного старения и предотвращающих реиндукцию опухолевого роста.

ОБСУЖДЕНИЕ

Хорошо известно, что одним из ключевых свойств опухолевой клетки является иммортализация — отсутствие репликативного старения, характерного для соматических клеток [25]. В его основе лежит исходно ограниченное (в результате неизбежного сокращения длины теломер, концевых повторов ДНК, при каждом цикле деления) число делений, которое может претерпеть соматическая клетка. В подавляющем большинстве опухолевых клеток репликативное старение не происходит благодаря гиперактивации теломера-

зы — фермента, восстанавливающего длину теломера. Такая способность опухолевых клеток к неограниченному делению во многом определяет высокий уровень злокачественности опухолей, их быстрый рост и распространение по всему организму.

В то же время сравнительно недавно обнаружен эффект так называемого нерепликативного старения опухолевых клеток, индуцированный сублетальными дозами химиопрепаратов или облучением. Клетки после такого воздействия не погибают, но прекращают делиться и постепенно приобретают фенотип классических стареющих клеток (*senescence phenotype*), для которого характерны гиперактивация β -галактозидазы, изменение морфологии, снижение ростового сигналинга и активация апоптотического сигналинга. Характерной особенностью стареющих клеток является формирование специфического секретомы — SASP (*senescence-associated secretory phenotypes*), в состав которого входят биологически активные соединения разнонаправленного действия, в том числе цитокины, ростовые факторы, хемокины, проапоптотические факторы и проч. [26, 27]. Установлено, что определенную роль в реализации эффектов SASP играют экзосомы, продуцируемые стареющими клетками и доставляющие в окружающие клетки-реципиенты отдельные факторы SASP [28, 29]. Основное внимание исследователей направлено на изучение дистанционных, пара- и аутокринных эффектов SASP, определяющих собственно дальнейшую судьбу стареющих опухолевых клеток. Существуют 2 варианта нерепликативного старения: оно оказывается необратимым, и в опухолевых клетках в течение неопределенного времени поддерживается *senescence*-фенотип, или происходит реиндукция опухолевого роста, и клетки возвращаются к стадии активной пролиферации. Оба варианта в той или иной степени регулируются факторами SASP [30, 31]. Отдельный интерес представляют паракринные эффекты SASP, а именно — влияние клеток, находящихся в состоянии нерепликативного старения, на окружающие ткани. В первую очередь это индукция *senescence*-подобных и опухолеподобных изменений в окружающих клетках, в том числе хромосомной нестабильности, метаболического репрограммирования, а также активация сигнальных каскадов, что может стимулировать процесс нерепликативного старения или опухолевую трансформацию в окружающей ткани [32].

Современные подходы к исследованию нерепликативного старения опухолевых клеток включают разработку способов предотвращения реиндукции опухолевого роста и поддержания клеток в состоянии *senescence* и поиск и изучение соединений-синолитиков, направленно воздействующих на *senescence*-клетки и снижающих паракринную активность SASP-факторов.

В настоящей работе использована модель доксорубицин-индуцированного старения клеток РМЖ. По данным литературы [33] и результатам нашего ис-

следования, культивирование клеток MCF-7 с сублетальными дозами доксорубина приводит к формированию характерного фенотипа классических стареющих клеток — пролиферативному блоку, повышению активности β -галактозидазы, активации p53/p21-сигналинга. Установлено, что присутствие антиэстрогена тамоксифена усиливает и поддерживает клеточный арест и сопровождается резким повышением активности β -галактозидазы, что свидетельствует о свойстве этого препарата потенцировать доксорубин-индуцированное старение клеток РМЖ. Такой же потенцирующий эффект тамоксифена подтвержден в экспериментах на тамоксифенрезистентной сублинии MCF-7/T, отличающейся изначально более высокой чувствительностью к доксорубину и относительно низкой — к рост-ингибирующему действию тамоксифена. И в наших предыдущих исследованиях, и в работах других авторов отмечалась возможность off-target-эффектов тамоксифена, развивающихся без участия эстрогенового сигналинга [34–36]. Скорее всего, в случае с тамоксифенрезистентными клетками мы сталкиваемся с подобным действием данного препарата, результатом которого является усиление эффектов нерепликативного старения. Подтверждением этому являются результаты экспериментов на клетках трижды негативного РМЖ MDA-MB-231: добавление тамоксифена к доксорубин-индуцированным клеткам сопровождалось усилением пролиферативного блока и гиперактивацией β -галактозидазы. Таким образом, тамоксифен можно отнести к соединениям, усиливающим и поддерживающим клетки РМЖ в состоянии нерепликативного старения.

Ранее мы обнаружили, что клетки резистентного РМЖ, такие как MCF-7/T и MDA-MB-231, гиперчувствительные к доксорубин-индуцированному старению, отличаются низким уровнем DNMT3A, и показали возможность негативной регуляции DNMT3A тамоксифеном [24]. Результаты настоящей работы продемонстрировали, что подавление DNMT3A в присутствии децитабина или при нокдауне DNMT3A с помощью shRNA обеспечивает усиление и сохранение *senescence*-фенотипа в клетках MCF-7, что позволяет рассматривать снижение активности DNMT3A как один из факторов, участвующих в поддержании нерепликативного старения клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования установлена возможность усиления и поддержания нерепликативного старения в клетках РМЖ в присутствии антиэстрогена тамоксифена независимо от степени гормональной зависимости клеток, что, скорее всего, является следствием рецепторной активности тамоксифена. Впервые установлено, что подавление экспрессии ДНК метилтрансферазы 3A потенцирует эффект преждевременного старения и предотвращает реиндукцию опухолевого роста в клетках РМЖ.

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

- Di Micco R., Krizhanovsky V., Baker D. et al. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021;22(2):75–95. DOI: 10.1038/s41580-020-00314-w
- Sedrak M.S., Cohen H.J. The Aging-cancer cycle: mechanisms and opportunities for intervention. *Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2023;78(7):1234–8. DOI: 10.1093/gerona/glac247
- Razgonova M.P., Zakharenko A.M., Golokhvast K.S. et al. Telomerase and telomeres in aging theory and chronographic aging theory (review). *Mol Med Rep* 2020;22(3):1679–94. DOI: 10.3892/mmr.2020.11274
- Hornsby P.J. Telomerase and the aging process. *Exp Gerontol* 2007;42(7):575–81. DOI: 10.1016/j.exger.2007.03.007
- Rossiello F., Jurk D., Passos J.F. et al. Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Cell Biol* 2022;24(2):135–47. DOI: 10.1038/s41556-022-00842-x
- Montégut L., López-Otín C., Kroemer G. Aging and cancer. *Mol Cancer* 2024;23(1):106. DOI: 10.1186/s12943-024-02020-z
- Colucci M., Sarill M., Maddalena M. et al. Senescence in cancer. *Cancer Cell* 2025;43(7):1204–26. DOI: 10.1016/j.ccell.2025.05.015
- Schmitt C.A., Wang B., Demaria M. Senescence and cancer – role and therapeutic opportunities. *Nat Rev Clin Oncol* 2022;19(10):619–36. DOI: 10.1038/s41571-022-00668-4
- Wang L., Lankhorst L., Bernards R. Exploiting senescence for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* 2022;22(6):340–55. DOI: 10.1038/s41568-022-00450-9
- Guillon J., Petit C., Toutain B. et al. Chemotherapy-induced senescence, an adaptive mechanism driving resistance and tumor heterogeneity. *Cell Cycle* 2019;18(19):2385–97. DOI: 10.1080/15384101.2019.1652047
- Bisht A., Avinash D., Sahu K.K. et al. A comprehensive review on doxorubicin: mechanisms, toxicity, clinical trials, combination therapies and nanoformulations in breast cancer. *Drug Deliv Transl Res* 2025;15(1):102–33. DOI: 10.1007/s13346-024-01648-0
- Van der Zanden S.Y., Qiao X., Neeffes J. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *The FEBS J* 2021;288(21):6095–111. DOI: 10.1111/febs.15583
- Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G. et al. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* 1969;11(6):1101–10. DOI: 10.1002/bit.260110607
- Cortés-Funes H., Coronado C. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovasc Toxicol* 2007;7(2):56–60. DOI: 10.1007/s12012-007-0015-3
- Huang Z., Lin S., Long C. et al. Notch signaling pathway mediates Doxorubicin-driven apoptosis in cancers. *Cancer Manag Res* 2018;10:1439–48. DOI: 10.2147/cmars.160315
- Synowiec E., Hoser G., Białkowska-Warzecha J. et al. Doxorubicin differentially induces apoptosis, expression of mitochondrial apoptosis-related genes, and mitochondrial potential in BCR-ABL1-expressing cells sensitive and resistant to imatinib. *BioMed Res Int* 2015;2015:673512. DOI: 10.1155/2015/673512
- Karabici M., Alptekin S., Firtina Karagonlar Z. et al. Doxorubicin-induced senescence promotes stemness and tumorigenicity in EpCAM-/CD133-nonstem cell population in hepatocellular carcinoma cell line, HuH-7. *Mol Oncol* 2021;15(8):2185–202. DOI: 10.1002/1878-0261.12916
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1–2):55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Scherbakov A.M., Komkov A.V., Komendantova A.S. et al. Steroidal pyrimidines and dihydropyrimidines as novel classes of anticancer agents against hormone-dependent breast cancer cells. *Front Pharmacol* 2017;8:979. DOI: 10.3389/fphar.2017.00979
- Reid G., Hübner M.R., Métivier R. et al. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 2003;11(3):695–707. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00090-x
- Shchegolev Y., Sorokin D., Scherbakov A. et al. Upregulation of Akt/Raptor signaling is associated with rapamycin resistance of breast cancer cells. *Chem Biol Inter* 2020;330:109243. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109243
- Mruk D.D., Cheng C.Y. Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits. *Spermatogenesis* 2011;1(2):121–2. DOI: 10.4161/spmg.1.2.16606
- Bae Y.-H., Shin J.-M., Park H.-J. et al. Gain-of-function mutant p53-R280K mediates survival of breast cancer cells. *Genes Genomics* 2014;36(2):171–8. DOI: 10.1007/s13258-013-0154-9
- Andreeva O.E., Sorokin D.V., Vinokurova S.V. et al. The effect of DNA methyltransferase 3A suppression in progression of the resistance phenotype in breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):149–56. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-4-149-156
- 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
- Faget D.V., Ren Q., Stewart S.A. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer* 2019;19(8):439–53. DOI: 10.1038/s41568-019-0156-2
- Niklander S.E., Lambert D.W., Hunter K.D. Senescent cells in cancer: wanted or unwanted citizens. *Cells* 2021;10(12):3315. DOI: 10.3390/cells10123315
- Kadota T., Fujita Y., Yoshioka Y. et al. Emerging role of extracellular vesicles as a senescence-associated secretory phenotype: Insights into the pathophysiology of lung diseases. *Mol Aspects Med* 2018;60:92–103. DOI: 10.1016/j.mam.2017.11.005
- Jakhar R., Crasta K. Exosomes as emerging pro-tumorigenic mediators of the senescence-associated secretory phenotype. *Int J Mol Sci* 2019;20(10):2547. DOI: 10.3390/ijms20102547
- Yamauchi S., Takahashi A. Cellular senescence: mechanisms and relevance to cancer and aging. *J Biochem* 2025;177(3):163–9. DOI: 10.1093/jb/mvae079
- Shimizu K., Inuzuka H., Tokunaga F. The interplay between cell death and senescence in cancer. *Sem Cancer Biol* 2025;108:1–16. DOI: 10.1016/j.semcancer.2024.11.001
- Gorgoulis V., Adams P.D., Alimonti A. et al. Cellular Senescence: defining a path forward. *Cell* 2019;179(4):813–27. DOI: 10.1016/j.cell.2019.10.005
- Ewald J. A., Desotelle J.A., Wilding G. et al. Therapy-induced senescence in cancer. *J Nat Cancer Inst* 2010;102(20):1536–46. DOI: 10.1093/jnci/djq364
- Semreen M.H., Alniss H., Cacciatore S. et al. GC-MS based comparative metabolomic analysis of MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cells treated with tamoxifen and/or paclitaxel. *J Proteomics* 2020;225:103875. DOI: 10.1016/j.jpro.2020.103875
- Lin H., Ai D., Liu Q. et al. Natural isoflavone glabridin targets PI3Kγ as an adjuvant to increase the sensitivity of MDA-MB-231 to tamoxifen and DU145 to paclitaxel. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2024;236:106426. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2023.106426
- Sorokin D., Shchegolev Y., Scherbakov A. et al. Metformin restores the drug sensitivity of mcf-7 cells resistant derivatives via the cooperative modulation of growth and apoptotic-related pathways. *Pharmaceuticals (Basel)* 2020;13(9):206. DOI: 10.3390/ph13090206

Вклад авторов

Е.И. Михаевич, П.Б. Копнин: постановка экспериментов, анализ результатов, подготовка иллюстративного материала, редактирование;
О.Е. Андреева, Д.В. Сорокин: постановка экспериментов, анализ результатов;
А.М. Щербаков, М.В. Гудкова: анализ результатов, подготовка иллюстративного материала, редактирование;
М.А. Красильников: разработка концепции и дизайна экспериментов; анализ результатов, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи.

Authors' contributions

E.I. Mikhaevich, P.B. Kopnin: setting up experiments, analyzing results, preparing illustrative material, editing;
O.E. Andreeva, D.V. Sorokin: setting up experiments, analyzing the results;
A.M. Scherbakov, M.V. Gudkova: analysis of results, preparation of illustrative material, editing;
M.A. Krasil'nikov: development of the concept and design of experiments; analysis of results, preparation of illustrative material, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.И. Михаевич / E.I. Mikhaevich: <https://orcid.org/0000-0002-1299-9080>
О.Е. Андреева / O.E. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0002-6015-6619>
Д.В. Сорокин / D.V. Sorokin: <https://orcid.org/0000-0002-1264-7405>
А.М. Щербаков / A.M. Scherbakov: <https://orcid.org/0000-0002-2974-9555>
П.Б. Копнин / P.B. Kopnin: <https://orcid.org/0000-0002-2078-4274>
М.В. Гудкова / M.V. Gudkova: <https://orcid.org/0000-0003-2694-5232>
М.А. Красильников / M.A. Krasil'nikov: <https://orcid.org/0000-0002-5902-7633>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflicts of interest. All authors declared that there are no conflicts of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-15-00173; <https://rscf.ru/project/24-15-00173/>).

Funding. This work was supported by Russian Science Foundation (grant No. 24-15-00173; <https://rscf.ru/project/24-15-00173/>).

Статья поступила: 18.07.2025. **Принята к публикации:** 01.08.2025. **Опубликована онлайн:** 06.10.2025.

Article submitted: 18.07.2025. **Accepted for publication:** 01.08.2025. **Published online:** 06.10.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-57-69>

Ген рецептора урокиназы *PLAUR* как регулятор экспрессии генов эпителиально-мезенхимального перехода и миграции клеток глиом и нейробластом

А.В. Ласица¹, М.И. Антипина¹, Д.А. Назарова¹, К.А. Рубина², В.Ю. Сысоева², Е.В. Семина^{1, 2}

¹Лаборатория трансляционных исследований, ОНК «Институт медицины и наук о жизни», ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта»; Россия, 236041 Калининград, ул. Университетская, 2;

²лаборатория морфогенеза и репарации тканей, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119234 Москва, Ломоносовский пр-кт, 27, корп. 10

Контакты: Екатерина Владимировна Семина e-semina@yandex.ru

Введение. Белки урокиназной системы, включающие сериновую протеазу – урокиназу (uPA), ее рецептор (uPAR) и ингибиторы PAI-1 и PAI-2, играют ключевую роль в биологии опухолей, влияя на клеточную пролиферацию и рост опухоли, инвазию, метастазирование и ангиогенез. Несмотря на доказанную роль этих белков в канцерогенезе многих типов опухолей, до сих пор недостаточно изучены механизмы, лежащие в основе их действия, в том числе влияние на миграцию клеток, эпителиально-мезенхимальный переход и стволовость.

Цель исследования – оценить влияние гиперэкспрессии гена рецептора урокиназы *PLAUR* на экспрессию генов адгезии и стволовости и миграцию клеток глиомы и нейробластомы человека.

Материалы и методы. В исследовании использованы 2 клеточные линии глиомы человека (U87 и U251) и клеточная линия нейробластомы человека SH-SY5Y. Для гиперэкспрессии гена *PLAUR* создана плаزمиды и проведена трансфекция опухолевых клеток. Для оценки относительной экспрессии генов использовали полимеразную цепную реакцию в реальном времени. Для оценки миграции клеток применяли тест на заживления раны (Wound Healing Assay) и анализ изображений в программе ImageJ с использованием плагина MRI Wound Healing Tool. Статистический анализ результатов выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism v.10.

Результаты. Высокая экспрессия гена рецептора урокиназы *PLAUR* сопряжена с существенным повышением миграции клеток и сложными фенотипическими изменениями в клетках глиомы U251 с индукцией экспрессии генов *CD56*, *CDH1*, *CDH2*, *ZEB2*, *SOX2*; в клетках глиомы U87 с индукцией экспрессии генов *PLAU*, *CD56*, *CDH1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI1*, *SNAI2*, *SOX2*, *NANOG* и подавлением экспрессии генов *CDH2*; в клетках нейробластомы SH-SY5Y с индукцией экспрессии генов *CD56*, *CDH1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI2*, *SOX2* и подавлением экспрессии гена урокиназы *PLAU* по сравнению с трансфицированными контрольной плазмидой pGFP клетками.

Заключение. Полученные результаты подчеркивают сложность регуляции процессов канцерогенеза с участием гена *PLAUR* и углубляют наше понимание биологии опухолей. Высокая экспрессия гена *PLAUR* в клетках опухоли усиливает их миграцию за счет индукции экспрессии генов *SNAI1/2* и *ZEB1/2* – ключевых транскрипционных факторов, инициирующих эпителиально-мезенхимальный переход.

Ключевые слова: рецептор урокиназы, *PLAUR*, uPAR, глиома, нейробластома, эпителиально-мезенхимальный переход, миграция клеток

Для цитирования: Ласица А.В., Антипина М.И., Назарова Д.А. и др. Ген рецептора урокиназы *PLAUR* как регулятор экспрессии генов эпителиально-мезенхимального перехода и миграции клеток глиом и нейробластом. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(3):57–69.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-57-69>

Urokinase receptor gene *PLAUR* as a regulator of epithelial-mesenchymal transition gene expression and migration of glioma and neuroblastoma cells

A.V. Lasitsa¹, M.I. Antipina¹, D.A. Nazarova¹, K.A. Rubina², V.Yu. Sysoeva², E.V. Semina^{1,2}

¹Laboratory of Translational Research, Institute of Medicine and Life Sciences, I. Kant Baltic Federal University; 2 Universitetskaya St., Kaliningrad 236041, Russia;

²Laboratory of Mechanisms of Morphogenesis and Tissue Repair, Medical Research and Education Institute, Lomonosov Moscow State University; Bld. 10, 27 Lomonosovsky Prospekt, Moscow 119234, Russia

Contacts: Ekaterina Vladimirovna Semina e-semina@yandex.ru

Introduction. The proteins of the urokinase system, including serine protease urokinase (uPA), its receptor (uPAR), and inhibitors PAI-1 and PAI-2, play a key role in tumor biology by influencing cellular proliferation and tumor growth, invasion, metastasis, and angiogenesis. Despite the established role of these proteins in the carcinogenesis of many tumor types, the mechanisms underlying their action, including their effects on cell migration, epithelial-mesenchymal transition, and stemness, remain insufficiently studied.

Aim. To evaluate the influence of the urokinase receptor gene *PLAUR* on the expression of adhesion and stemness genes, as well as on the migration of human glioma and neuroblastoma cells.

Materials and methods. The study utilized two human glioma cell lines, U87 and U251, and the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. To achieve the overexpression of the *PLAUR* gene, a non-viral plasmid was created, followed by the transfection of the cells. Relative gene expression was assessed using real-time polymerase chain reaction. For evaluating cell migration, a Wound Healing Assay was performed, with image analysis conducted using ImageJ software and MRI Wound Healing Tool. Statistical analysis of the results was carried out using GraphPad Prism v.10.

Results. High expression of the urokinase receptor gene *PLAUR* is associated with a significant increase in cell migration and complex phenotypic changes. Specifically, in U251 glioma cells, there is an induction of the expression of the genes *CD56*, *CDH1*, *CDH2*, *ZEB2*, and *SOX2*. In U87 glioma cells, the expression of the genes *PLAU*, *CD56*, *CDH1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI1*, *SNAI2*, *SOX2*, and *NANOG* is induced, while the expression of the gene *CDH2* is suppressed. In SH-SY5Y neuroblastoma cells, there is an induction of the expression of the genes *CD56*, *CDH1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI2*, and *SOX2*, along with a suppression of the expression of the urokinase gene *PLAU* compared to cells transfected with the control plasmid pGFP.

Conclusion. The results highlight the complexity of the regulation of carcinogenesis processes involving the *PLAUR* gene and deepen our understanding of tumour biology. High expression of the *PLAUR* gene may enhance the activity and invasion of tumor cells by regulating the epithelial-mesenchymal transition and altering the expression of key transcription factors.

Keywords: urokinase receptor, *PLAUR*, uPAR, glioma, neuroblastoma, epithelial-mesenchymal transition, cell migration

For citation: Lasitsa A.V., Antipina M.I., Nazarova D.A. et al. Urokinase receptor gene *PLAUR* as a regulator of epithelial-mesenchymal transition gene expression and migration of glioma and neuroblastoma cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(3):57–69. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-57-69>

ВВЕДЕНИЕ

Урокиназная система, включающая сериновую протеазу — урокиназу (uPA), ее высокоспецифичный рецептор (uPAR) и ингибиторы PAI-1 и PAI-2, активно регулирует процессы распада фибрина, восстановление тканей и реконструкцию внеклеточного матрикса [1]. Ген *PLAUR* у человека кодирует белок uPAR, играющий ключевую роль в ремоделировании тканей и деградации внеклеточного матрикса — процессов, которые способствуют инвазии и метастазированию злокачественных опухолей [2, 3]. Кроме того, uPAR может активировать ангиогенез, что обеспечивает опухоль необходимыми питательными веществами и кислородом для ее роста [2]. Результаты исследований показывают, что экспрессия *PLAUR* повышается в различных типах опухолей, в том числе в глиомах и нейробластомах, и ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [4–8].

Глиомы представляют собой группу наиболее распространенных злокачественных опухолей центральной нервной системы [9]. Их лечение часто включает хирургическое вмешательство, лучевую и химиотерапию, однако прогноз при высокозлокачественных формах глиом остается неблагоприятным. Нейробластома представляет собой злокачественное новообразование с неясным механизмом спонтанной регрессии или дифференциации и в основном встречается у детей [10]. Клинические проявления этого заболевания неоднородны: его течение варьирует от благоприятного до тяжелого, с обширным метастазированием. Несмотря на увеличение 5-летней безрецидивной выживаемости, в различных подгруппах смертность при нейробластоме существенно различается [11]. Повышенные уровни экспрессии uPA и ее рецептора uPAR предсказывают неблагоприятные исходы и частые рецидивы у пациентов с данной опухолью [12].

Результаты исследований демонстрируют прямую связь между высокими концентрациями uPA и uPAR и степенью злокачественности опухолей, что подчеркивает их ключевую роль в патогенезе заболевания.

В процессе канцерогенеза эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) играет ведущую роль в приобретении инвазивного потенциала клетками глиом и нейробластом. Важным отличительным признаком ЭМП является изменение экспрессии трансмембранных гликопротеинов, участвующих в клеточной адгезии.

Результаты проведенных нами ранее исследований на клетках нейробластомы показали, что экспрессия uPAR необходима для поддержания их эпителиального фенотипа, а нокаут uPAR способствует ЭМП и усилению миграции клеток [1]. При этом подавление экспрессии uPAR коррелирует с дормантностью, химио-резистентностью (нечувствительностью к цисплатину и доксорубину) и образованием метастазов на мышинной модели *in vivo* [12]. Мы выявили, что изначально высокая экспрессия гена *PLAUR* предсказывает низкие показатели выживаемости при нейробластоме у человека, а при рецидивирующих нейробластомах наблюдается значительное понижение экспрессии гена *PLAUR*. В совокупности эти данные подчеркивают сложность регуляции процессов канцерогенеза, в которых участвует ген uPAR. Однако, несмотря на установленную патогенетическую роль экспрессии uPAR в различных типах опухолей, механизмы его действия, включая влияние на клеточную миграцию, ЭМП и стволовость, остаются недостаточно изученными.

Цель исследования — оценить влияние гиперэкспрессии гена рецептора урокиназы *PLAUR* на экспрессию генов адгезии и стволовости и миграцию клеток глиомы и нейробластомы человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. Для работы использованы клеточные линии мультиформной глиобластомы человека U251 и U87 и линия нейробластомы человека SH-SY5Y.

Клетки культивировали в полноценной среде роста Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), содержащей 4,5 г/л глюкозы («ПанЭко», Россия), 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS; Capricorn Scientific, Германия) и раствор антибиотика/антимикотика (Capricorn Scientific, Германия; рабочая концентрация 100 мг/мл). Культивирование клеток проводили в клеточном инкубаторе при 37 °C и 5 % CO₂. Замену среды осуществляли по необходимости, но не реже чем 1 раз в 3 дня. При достижении 80–90 % конfluence клетки пассировали. Для этого среду удаляли, клетки однократно промывали раствором PBS (phosphate buffered saline; Capricorn Scientific, Германия) и инкубировали 3–5 мин в 1 % растворе трипсина (Capricorn Scientific, Германия). Для деагрегации раствор с клетками и полноценной средой роста пипетировали и рассаживали на новые культуральные чашки в соотношении 1:4–1:5.

Получение плазмиды для гиперэкспрессии гена рецептора урокиназы. Ген uPAR *PLAUR* выделяли из матричной РНК (мРНК) нормальных фибробластов человека (первичная культура фибробластов любезно предоставлена коллегами с факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова). Матричную РНК uPAR амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью специфических праймеров, содержащих сайты рестрикции BmtI и SalI (*PLAUR_amplicon*) (табл. 1) с последующим лигированием по липким концам. Для вектора, содержащего комплементарную ДНК (кДНК) uPAR (плазмида pPLAUR), использовали коммерческую плазмиду AddGene (кат. № 178310), содержащую ген зеленого флуоресцентного белка для оценки трансфекции и работы вектора. Для создания липких концов у вставки и вектора проведена двойная рестрикция плазмиды pTYF-EF1a-hIRES-EGFP и ампликона с геном *PLAUR*. Рестрикция выполнена с использованием ферментов BmtI (сайт узнавания — GCTAG↑C/C↓GATCG) и SalI (сайт узнавания — G↑TCGAC/CAGCT↓G) (SibEnzyme, Россия). Лигирование проводили с помощью T4 ДНК лигазы (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для реакции использован буфер 5X Quick ligation, позволяющий осуществлять быстрое лигирование. Итоговые соотношения вставки и вектора рассчитаны с помощью программы NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>), которая учитывает количество и длину фрагментов. В качестве контроля GFP использована плазмида pTYF-EF1a-EGFP (pGFP).

Для подтверждения правильности встраивания *PLAUR* в вектор использовали секвенирование по Сэнгеру. Для этого к последовательности гена *PLAUR* подобраны 3 праймера (Seq_1, Seq_2, Seq_3), позволяющие прочитать *PLAUR* полностью. Секвенирующую реакцию проводили в объеме 10 мкл (1 мкл — 2.5x BigDye premix; 1,5 мкл — 5x Sequencing Buffer; 0,5 мкл PCR-grade DMSO (Thermo Fisher Scientific, США)), 1 мкг плазмиды pTYF-EF1a-PLAUR-hIRES-EGFP (pPLAUR) с добавлением 10 мкМ праймера. Последовательности праймеров для секвенирования представлены в табл. 1. Амплификацию проводили с использованием амплификатора T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Перед секвенированием образцы были очищены с помощью набора D-Pure™ Dye Terminator Removal Kit (NimaGen, Нидерланды).

Очищенные продукты амплификации секвенировали на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500/3500xL (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные результаты визуализированы в программе SnapGene 7.1.1 для оценки качества хроматограмм и выровнены в программе NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) для определения правильного встраивания вставки в вектор.

Трансфекция опухолевых клеток. Клеточные линии U251, U87 и SH-SY5Y рассажены на 24-луночный планшет (Servicebio, Китай) и культивировались при 37 °C и 5 % CO₂. Для трансфекции использовали реагент

Таблица 1. Характеристика праймеров, используемых в исследовании
Table 1. Characteristics of the primers used in the study

Ген Gene	Праймер Primer	Последовательность Sequence	Температура отжига, °C Annealing temperature, °C
PLAUR_amplicon	Forward_BmtI	TAATGCTAGCATGGGTCACCCGCCG	58
	Reverse_SaII	TATTGTCGACTTAGGTCCAGAGGAGAGTGCCT	
Seq_1	Forward	CAGACAGTGGTTCAAAGTTT	54
Seq_2	Forward	TTACCTCGAATGCATTTCTT	
Seq_3	Forward	TCACGAACCGAAAAACCAA	
PLAUR	Forward	CCACTCAGAGAAGACCAACAGG	59
	Reverse	GTAACGGCTTCGGGAATAGGTG	
PLAU	Forward	GGCTTAAACTCCAACACGCAAGG	59
	Reverse	CCTCCTTGGAACGGATCTTCAG	
CD44	Forward	CCAGAAGGAACAGTGGTTTGGC	59
	Reverse	ACTGTCCTCTGGGCTTGGTGTT	
CD56	Forward	CATCACCTGGAGGACTTCTACC	59
	Reverse	CAGTGTA CTGGATGCTCTTCAGG	
CDH1	Forward	GGCTGGACCGAGAGAGTTTC	55
	Reverse	ACGACGTTAGCCTCGTTCTC	
CDH2	Forward	ATGGGAAATGGAACTTGATGGC	57
	Reverse	CAGTTGCTAAACTTCACTGAAAGG	
ZEB1	Forward	GGCATACACCTACTCAACTACGG	59
	Reverse	TGGGCGGTGTAGAATCAGAGTC	
ZEB2	Forward	AATGCACAGAGTGTGGCAAGGC	59
	Reverse	CTGCTGATGTGCGAACTGTAGG	
SNAI1	Forward	GCGAGCTGCAGGACTCTAAT	61
	Reverse	CATCTGACAGGGAGGTCAGC	
SNAI2	Forward	ATCTGCGGCAAGGCGTTTTCCA	61
	Reverse	GAGCCCTCAGATTTGACCTGTC	
NANOG	Forward	CTCCAACATCCTGAACCTCAGC	59
	Reverse	CGTCACACCATTGCTATTCTTCG	
SOX2	Forward	GAAGGATAAGTACACGCTGC	63
	Reverse	GTTCA TTGTCGCGTAACTGT	
c-Myс	Forward	CCTGGTGCTCCATGAGGAGAC	63
	Reverse	CAGACTCTGACCTTTTGCCAGG	
ACTB	Forward	CTTTCCGCTCGGCTGTTTTT	59
	Reverse	GGCCTTACGTCTGCGGAT	

Invitrogen™ Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) и клетки, достигшие 50–60 % конфлюэнтности. Также применяли плазмиду pPLAUR для гиперэкспрессии гена *PLAUR* и контрольную плазмиду pGFP; для каждого типа клеток проведены 6 биологических повторов. Трансфекцию выполняли по протоколу Invitrogen (США). В день трансфекции полноценная среда для культивирования клеток была заменена на среду DMEM («Панэко», Россия), не содержащую сыворотки и антибиотика. Для каждой точки трансфекции подготовлены 2 реакции — с плазмидой pPLAUR/pGFP и DMEM (на общий объем 50 мкл брали 1 мкг плазмиды) и с Lipofectamine 2000 и DMEM (на общий объем 50 мкл брали 1 мкл трансфектанта). Через 5 мин инкубации раствор, содержащий плазмиду, смешивали с раствором, содержащим Lipofectamine 2000, и полученную смесь инкубировали 20 мин. Далее полученный комплекс аккуратно вносили к клеткам и инкубировали в течение 12 ч. По истечении этого времени клеткам меняли среду на полноценную и не позднее чем через 48 ч после трансфекции анализировали экспрессию генов интереса в клетках и миграцию клеток *in vitro* (Wound Healing Assay).

Выделение РНК из клеток. Тотальную РНК из клеток выделяли с использованием реагента ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Далее выделенную РНК конвертировали в кДНК с использованием метода обратной транскрипции. Для получения кДНК применяли 1 мкг тотальной РНК. Реакцию проводили с использованием фермента обратной транскриптазы MMLV (ЗАО «Евроген», Россия) и праймеров Oligo(dT) в соответствии с протоколом производителя.

Оценка экспрессии генов в клетках. Оценена экспрессия ряда генов, кодирующих белки, участвующие в процессах ЭМП, адгезии и поддержании стволовости клеток опухоли. Исследованные гены, сгруппированные по их функциональным характеристикам и роли в опухолевом процессе, представлены в табл. 2.

Экспрессия мРНК генов оценена с помощью ПЦР в реальном времени и реагента 2X qPCRmix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия). Для анализа экспрессии генов урокиназной системы *PLAUR* и *PLAU*, клеточной адгезии (*CD44*, *CD56*), ЭМП (*CDH1*, *CDH2*, *ZEB1/2*, *SNAIL/2*) и стволовости (*SOX2*, *NANOG*, *c-Myc*) подобраны праймеры с использованием онлайн-сервиса Primer-Blast NCBI и дополнительных инструментов проверки правильности подбора праймеров (T_m Calculator (Thermo Fisher Scientific, США) и Oligonucleotide Properties Calculator). Для увеличения специфичности к кДНК праймеры отобраны таким образом, чтобы как минимум 1 последовательность из пары лежала на сочленении экзонов. Последовательность используемых праймеров представлена в табл. 1. Предварительную денатурацию кДНК проводили при 95 °C в течение 30 с, далее выполняли денатурацию при 95 °C в течение 30 с, отжиг праймеров 30 с при температуре, указанной для соответствующего праймера (см. табл. 1),

и элонгацию при 72 °C в течение 30 с. Для нормирования данных использовали ген домашнего хозяйства *ACTB*, относительно которого рассчитан показатель ΔCt . Значения Ct целевых генов определены эмпирически в ходе подготовительных оценочных экспериментов и варьировали от 26 до 38 циклов, что соответствует различным уровням экспрессии. Показатель ΔCt позволяет нормировать значения Ct целевого гена на референсный ген. Относительный уровень транскрипта рассчитан с использованием метода $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

Оценка миграции клеток *in vitro* (Wound Healing Assay). Для исследования миграции клеток проведен тест «заживление раны» *in vitro*. Перед экспериментом клетки находились в состоянии депривации в течение суток. В каждой лунке делали царапину стерильным наконечником объемом 1000 мкл. После этого клеткам меняли среду на новую и помещали их в систему визуализации живых клеток в реальном времени JuLi Stage. Во время эксперимента в системе поддерживали стандартные условия культивирования клеток — 5 % CO_2 и 37 °C. Система визуализации осуществляла цейтраферную съемку 3 полей зрения в каждой лунке в течение 48 ч. Скорость миграции клеток оценивали с использованием программы ImageJ и плагина MRI Wound Healing Tool с помощью вычисления процента площади царапины/раны через 0–24–48 ч для клеток глиомы U251, U87 и 0–12–24 ч для клеток нейробластомы SH-SY5Y с учетом их быстрой скорости базовой миграции. Для каждой экспериментальной точки подсчитаны не менее 4 лунок по 3 поля зрения в лунке.

Статистический анализ. Полученные данные об относительной экспрессии генов обработаны в программе GraphPad Prism (версия 10.3.0). Выбывающиеся из общей выборки показатели Ct предварительно были удалены. Показатели нормальности и значимость различий в уровнях транскрипции генов рассчитаны с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA — тест Dunnett). Различия между сравниваемыми выборками считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Все результаты представлены как среднее (3 биологических повтора) $\pm$ стандартное отклонение.

Для анализа миграции опухолевых клеток с использованием программы ImageJ рассчитаны средние значения для временных интервалов, после чего значения на 12, 24 или 48 ч делили на контрольные значения на 0 ч и выражали в процентах для оценки относительного изменения миграции. Затем полученные результаты были перенесены в программу GraphPad Prism (версия 10.3.0) для дальнейшего анализа и визуализации. Статистический анализ проводили с использованием параметрического анализа one-way ANOVA — тест Tukey. Различия между сравниваемыми выборками считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены как средняя остаточная площадь раны через 24 ч (12 ч для клеток нейробластомы SH-SY5Y) в процентах от исходной площади раны в 0 ч.

Таблица 2. Характеристика исследуемых генов [13–18]

Table 2. Characteristics of the studied genes [13–18]

Ген Gen	Кодируемый белок Coded protein	Функциональная группа Functional group	Роль в опухолевом процессе Role in tumor growth
<i>PLAUR</i>	Рецептор урокиназы (uPAR) Urokinase receptor (uPAR)	Ремоделирование внеклеточного матрикса, инвазия Extracellular matrix remodeling, invasion	Активирует миграцию, инвазию клеток и эпителиально-мезенхимальный переход Activates migration, cell invasion and epithelial-mesenchymal transition
<i>PLAU</i>	Урокиназа (uPA) Urokinase (uPA)	Активация плазминогена, протеолиз, инвазия Plasminogen activation, proteolysis, invasion	Активирует плазминоген, способствует деградации матрикса и миграции клеток Activates plasminogen, promotes matrix degradation and cell migration
<i>CDH1</i>	Е-кадгерин E-cadherin	Межклеточная адгезия, поддержание эпителиального фенотипа Intercellular adhesion, maintenance of epithelial phenotype	Обеспечивает межклеточную адгезию, снижение экспрессии связано с активацией эпителиально-мезенхимального перехода Mediates intercellular adhesion, lowered expression is associated with activation of epithelial-mesenchymal transition
<i>CDH2</i>	N-кадгерин N-cadherin	Межклеточная адгезия, поддержание мезенхимального фенотипа Intercellular adhesion, maintenance of epithelial phenotype	Обеспечивает межклеточную адгезию, повышение экспрессии связано с активацией эпителиально-мезенхимального перехода, стимулирует инвазию и миграцию клеток Mediates intercellular adhesion, increased expression is associated with activation of epithelial-mesenchymal transition, stimulates cell invasion and migration
<i>ZEB1, ZEB2</i>	ZEB1, ZEB2	Транскрипционные факторы эпителиально-мезенхимального перехода Transcription factors of epithelial-mesenchymal transition	Напрямую подавляют экспрессию гена <i>CDH1</i> и активируют эпителиально-мезенхимальный переход Directly suppress <i>CDH1</i> gene expression and activate epithelial-mesenchymal transition
<i>SNAI1, SNAI2</i>	SNAI1, SNAI2	Транскрипционные факторы эпителиально-мезенхимального перехода Transcription factors of epithelial-mesenchymal transition	Подавляют экспрессию генов эпителиального фенотипа, активируют эпителиально-мезенхимальный переход Suppress expression of epithelial phenotype genes, activate epithelial-mesenchymal transition
<i>CD44</i>	CD44 (рецептор гиалуроновой кислоты) CD44 (hyaluronic acid receptor)	Молекула адгезии Adhesion molecule	Участвует в клеточной адгезии, миграции, поддерживает стволовые свойства клеток и способствует инвазии Participates in cell adhesion, migration, supports stem-like properties of the cells and promotes invasion
<i>CD56 (NCAM)</i>	NCAM, молекула адгезии нервных клеток NCAM, neural cell adhesion molecule	Молекула адгезии Adhesion molecule	Ассоциирован с поддержанием стволовых свойств клеток Associated with maintenance of stem-like properties of the cells
<i>SOX2, NANOG, c-Myc</i>	SOX2, NANOG, c-Myc	Транскрипционные факторы, маркеры стволовости Transcription factors, stemness markers	Поддерживают плюрипотентность и самообновление опухолевых клеток Maintain pluripotency and self-renewal of tumor cells

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение опухолевых клеток, гиперэкспрессирующих ген *PLAUR*. В исследовании использованы клеточные линии глиомы U251, U87 и нейробластомы SH-SY5Y человека, гиперэкспрессирующие ген *PLAUR*. Гиперэкспрессию этого гена определяли методом ПЦР в реальном времени до и после трансфекции клеточ-

ных линий плазмидами для гиперэкспрессии *PLAUR* rPLAUR и контрольной плазмидой rGFP. В результате трансфекции плазмидой rPLAUR экспрессия гена *PLAUR* в клетках глиомы U251 увеличилась в 3,4 раза, в клетках глиомы U87 — в 20 раз, в клетках SH-SY5Y — в 234 раза по сравнению с клетками rGFP, трансфицированными контрольной плазмидой GFP (рис. 1).

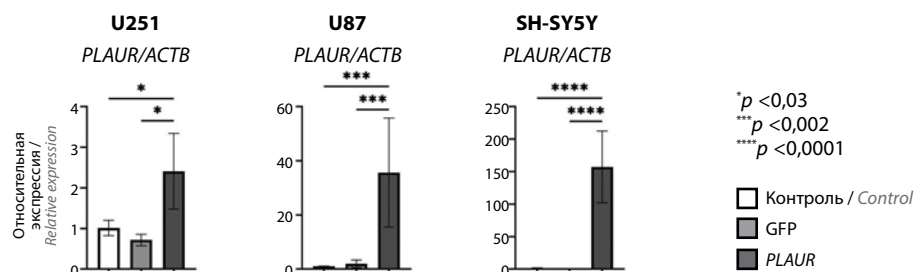


Рис. 1. Экспрессия гена *PLAUR* в клеточных линиях глиомы U251, U87 и нейробластомы SH-SY5Y. Относительная экспрессия гена *PLAUR* нормирована на референсный ген *ACTB*. В качестве контроля использовали нетрансфицированные клетки. GFP — клетки после трансфекции с контрольной плазмидой pGFP; PLAUR — клетки после трансфекции плазмидой pPLAUR. Результаты представлены как среднее (3 биологических повтора) $\pm$ стандартное отклонение. Статистический анализ параметрических данных проведен с помощью one-way ANOVA — теста Dunnett

Fig. 1. *PLAUR* gene expression in glioma cell lines U251, U87 and neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Relative expression of *PLAUR* gene is normalized by *ACTB* reference gene. Non-transfected cells were used as control. GFP — cells after transfection with pGFP control plasmid; PLAUR — cells after transfection with pPLAUR plasmid. Results are presented as mean (3 biological replicates) $\pm$ standard deviation. Statistical analysis of parametric data was performed using one-way ANOVA, Dunnett test

Влияние экспрессии гена *PLAUR* на экспрессию генов адгезии, эпителиально-мезенхимального перехода и стволовости в клетках глиомы и нейробластомы человека. Далее проведена оценка экспрессии генов адгезии, ЭМП и стволовости до и после индукции экспрессии гена *PLAUR*. В клетках глиомы U251 индукция

экспрессии гена *PLAUR* привела к увеличению экспрессии гена адгезии *CD56* в 2,78 раза, гена ЭМП *CDH1* — в 5,5 раза, *CDH2* — в 6,9 раза, *ZEB2* — в 2,5 раза, гена стволовости *SOX2* — в 19,2 раза по сравнению с клетками, трансфицированными контрольной плазмидой pGFP (рис. 2). Статистически значимых разли-

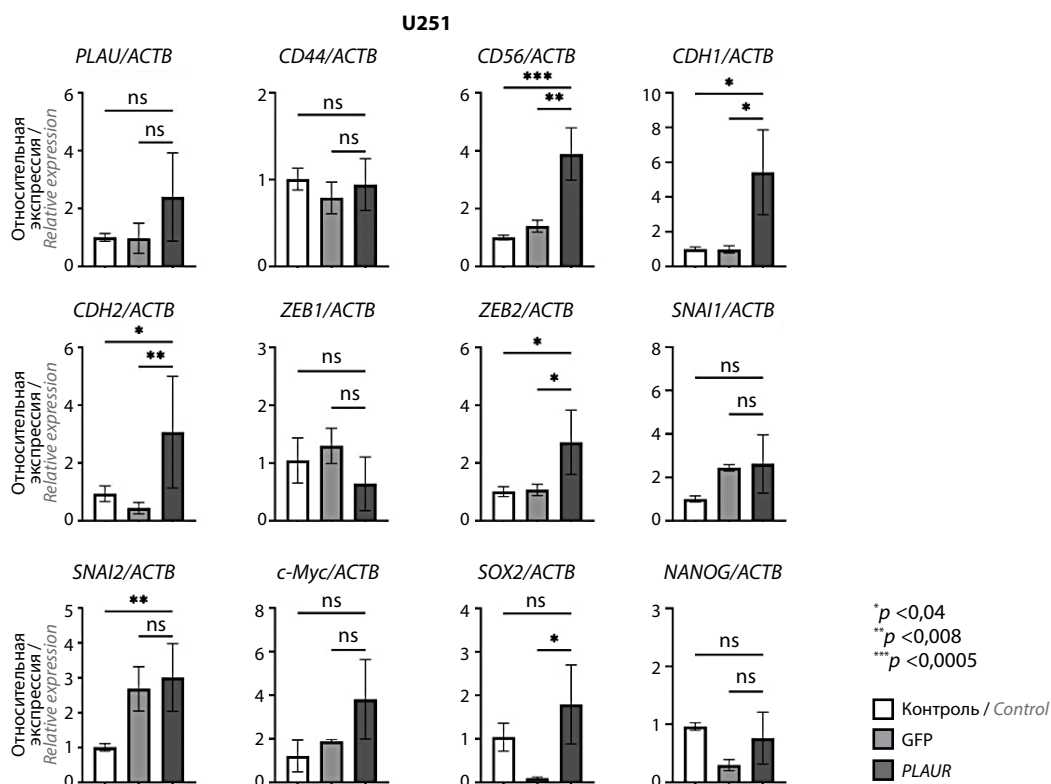


Рис. 2. Экспрессия генов адгезии, эпителиально-мезенхимального перехода и стволовости в клеточной линии глиомы U251. Относительная экспрессия генов нормирована на референсный ген *ACTB*. Контроль — нетрансфицированные клетки; GFP — клетки после трансфекции контрольной плазмидой pGFP; PLAUR — клетки после трансфекции плазмидой pPLAUR; различия статистически незначимы. Результаты представлены как среднее (3 биологических повтора) $\pm$ стандартное отклонение. Статистический анализ параметрических данных проведен с помощью one-way ANOVA — теста Dunnett

Fig. 2. Expression of genes of adhesion, epithelial-mesenchymal transition and stemness in glioma cell line U251. Relative gene expression was normalized by *ACTB* reference gene. Control — non-transfected cells; GFP — cells after transfection with pGFP control plasmid; PLAUR — cells after transfection with pPLAUR plasmid; differences are not statistically significant. Results are presented as mean (3 biological replicates) $\pm$ standard deviation. Statistical analysis of parametric data was performed using one-way ANOVA, Dunnett test

чий в экспрессии генов *PLAU*, *CD44*, *ZEB1*, *SNAI1*, *SNAI2*, *c-Мyc* и *NANOG* до и после индукции экспрессии гена *PLAUR* обнаружено не было.

В клетках глиомы U87 индукция экспрессии гена *PLAUR* привела к увеличению экспрессии гена адгезии *CD56* в 5,22 раза, гена ЭМП *CDH1* — в 4,76 раза, *ZEB1* — в 4 раза, *ZEB2* — в 7,7 раза, *SNAI1* — в 2,4 раза, *SNAI2* — в 2 раза, гена стволовости *SOX2* — в 3,74 раза, *NANOG* — в 8,9 раза по сравнению с клетками pGFP (рис. 3). Также наблюдалось значимое увеличение экспрессии гена *PLAU* в 2,35 раза и значимое снижение экспрессии гена *CDH2* в 0,31 раза. Статистически значимых различий в экспрессии генов *CD44* и *c-Мyc* до и после индукции экспрессии гена *PLAUR* обнаружено не было.

В клетках нейробластомы SH-SY5Y индукция экспрессии гена *PLAUR* привела к увеличению экспрессии гена адгезии *CD56* в 4,8 раза, гена ЭМП *CDH1* — в 2,15 раза, *ZEB1* — в 2,21 раза, *ZEB2* — в 3,3 раза, *SNAI2* — в 3,5 раза, гена стволовости *SOX2* — в 3,11 раза по сравнению с клетками pGFP (рис. 4). Также наблюдалось значимое снижение экспрессии гена *PLAU*

в 0,35 раза. Статистически значимых различий в экспрессии генов *CD44*, *CDH2*, *SNAI1*, *c-Мyc* и *NANOG* до и после индукции экспрессии гена *PLAUR* обнаружено не было.

Результаты оценки экспрессии анализируемых генов в клеточных линиях (глиомы U87 и U251 и нейробластомы SH-SY5Y) при гиперэкспрессии *PLAUR* представлены в табл. 3, где приведены только данные, которые статистически значимо отличаются от соответствующих контрольных значений, полученных на клетках, трансфицированных контрольной плазмидой pGFP.

Регуляция миграции клеток опухоли экспрессией гена *PLAUR*. После индукции экспрессии гена *PLAUR* клетки глиобластомы U251 и U87 и нейробластомы SH-SY5Y демонстрировали значимо более высокую подвижность по сравнению с нетрансфицированными клетками (группа контроля) и клетками, трансфицированными контрольной плазмидой pGFP (рис. 5–7).

Так, в клетках глиомы U251, гиперэкспрессирующих *PLAUR*, площадь раны через 48 ч статистически значимо уменьшилась на 70 % по сравнению с исходным

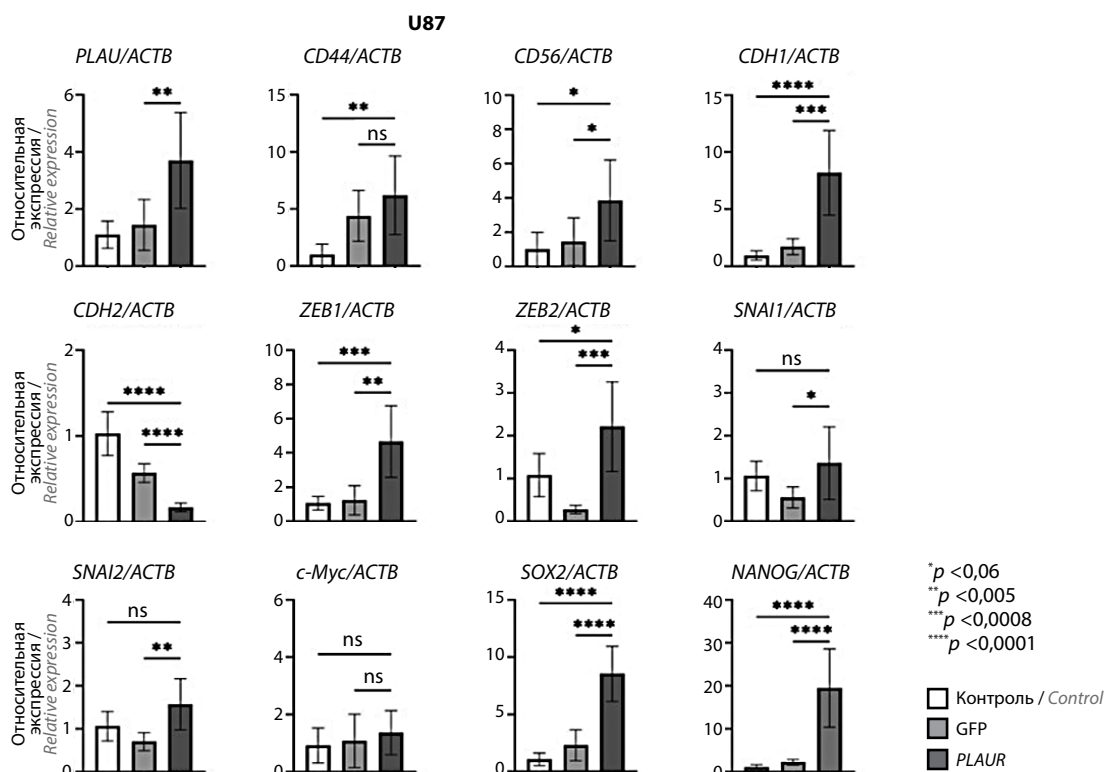


Рис. 3. Экспрессия генов адгезии, эпителиально-мезенхимального перехода и стволовости в клеточной линии глиомы U87. Относительная экспрессия генов нормирована на референсный ген *ACTB*. Контроль — нетрансфицированные клетки; GFP — клетки после трансфекции с контрольной плазмидой pGFP; PLAUR — клетки после трансфекции плазмидой pPLAUR; различия статистически незначимы. Результаты представлены как среднее (3 биологических повтора) $\pm$ стандартное отклонение. Статистический анализ параметрических данных проведен с помощью one-way ANOVA — теста Dunnett

Fig. 3. Expression of genes of adhesion, epithelial-mesenchymal transition and stemness in glioma cell line U87. Relative gene expression was normalized by *ACTB* reference gene. Control — non-transfected cells; GFP — cells after transfection with pGFP control plasmid; PLAUR — cells after transfection with pPLAUR plasmid; differences are not statistically significant. Results are presented as mean (3 biological replicates) $\pm$ standard deviation. Statistical analysis of parametric data was performed using one-way ANOVA, Dunnett test

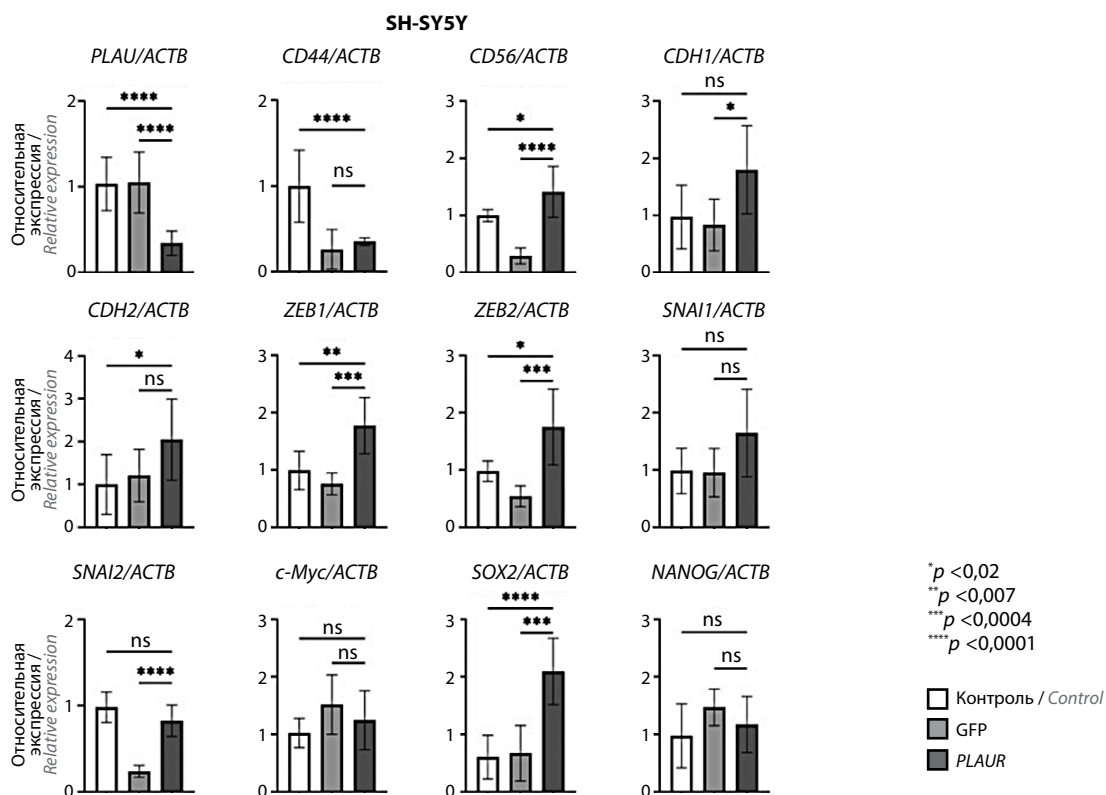


Рис. 4. Экспрессия генов адгезии, эпителиально-мезенхимального перехода и стволовости в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y. Относительная экспрессия генов нормирована на референсный ген ACTB. Контроль — нетрансфицированные клетки; GFP — клетки после трансфекции с контрольной плазмидой pGFP; PLAUR — клетки после трансфекции плазмидой pPLAUR; ns — различия статистически незначимы. Результаты представлены как среднее (3 биологических повтора) $\pm$ стандартное отклонение. Статистический анализ параметрических данных проведен с помощью one-way ANOVA — тестом Dunnett

Fig. 4. Expression of genes of adhesion, epithelial-mesenchymal transition and stemness in neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Relative gene expression was normalized by ACTB reference gene. Control — non-transfected cells; GFP — cells after transfection with pGFP control plasmid; PLAUR — cells after transfection with pPLAUR plasmid; differences are not statistically significant. Results are presented as mean (3 biological replicates) $\pm$ standard deviation. Statistical analysis of parametric data was performed using one-way ANOVA, Dunnett test

значением. В контрольных клетках площадь сократилась на 32 % по сравнению с исходным значением (см. рис. 5, а). В клетках pGFP, трансфицированных контрольной плазмидой, площадь раны через 48 ч уменьшилась на 36 %. Клетки глиомы U251, гиперэкспрессирующие PLAUR, показали статистически значимо большую миграционную активность (в 2 раза выше) по сравнению с клетками pGFP через 48 ч и клетками группы контроля через 24 и 48 ч после начала эксперимента (см. рис. 5, б).

В клетках глиомы U87, гиперэкспрессирующих PLAUR, площадь раны через 48 ч статистически значимо уменьшилась на 87 % по сравнению с исходным значением. В контрольных клетках через 48 ч площадь раны уменьшилась на 35 % по сравнению с начальным значением (см. рис. 6, а). В клетках pGFP наблюдалось снижение площади раны на 69 % за 48 ч. Клетки глиомы U87, гиперэкспрессирующие PLAUR, показали большую миграционную активность по сравнению с клетками pGFP (в 1,5 раза выше) и группой контроля

(в 2 раза выше) через 24 и 48 ч после начала эксперимента (см. рис. 4, б).

При анализе миграции гиперэкспрессирующих PLAUR клеток нейробластомы SH-SY5Y обнаружено значимое снижение площади раны на 55 % от исходного значения через 24 ч. В контрольных клетках нейробластомы площадь раны сократилась на 31 % по сравнению с исходным значением (см. рис. 7, а). В клетках pGFP, трансфицированных контрольной плазмидой pGFP, площадь раны сократилась на 30 % за тот же период. Оценку миграции клеток нейробластомы проводили через 12 и 24 ч, поскольку эти клетки обладают повышенной подвижностью и уже через 48 ч полностью закрывают царапину, формируя монослой. Клетки нейробластомы SH-SY5Y, гиперэкспрессирующие PLAUR, показали статистически значимо большую миграционную активность по сравнению с клетками pGFP (в 1,5 раза выше) и группы контроля (в 1,7 раза выше) через 12 и 24 ч после начала эксперимента (см. рис. 7, б).

Table 3. Changes in gene expression in glioma cell lines U87 and U251 and neuroblastoma cell line SH-SY5Y with PLAU gene hyperexpression

Ген/белок Gene/protein	Глиома U251 U251 glioma	Глиома U87 U87 glioma	Нейробластома SH-SY5Y Neuroblastoma SH-SY5Y
<i>PLAUR</i> /uPAR	↑	↑	↑
<i>PLAU</i> /uPA	—	↑	↓
<i>CD44</i>	—	—	—
<i>CD56</i> /NCAM	↑	↑	↑
<i>CDH1</i> /Е-кадгерин <i>CDH1</i> /E-cadherin	↑	↑	↑
<i>CDH2</i> /N-кадгерин <i>CDH2</i> /N-cadherin	↑	↓	—
<i>ZEB1</i>	—	↑	↑
<i>ZEB2</i>	↑	↑	↑
<i>SNAI1</i>	—	↑	—
<i>SNAI2</i>	—	↑	↑
<i>SOX2</i>	↑	↑	↑
<i>NANOG</i>	—	↑	—
<i>c-Myc</i>	—	—	—

Note. uPA — urokinase; uPAR — urokinase receptor; ↑ — significant induction of expression; ↓ — significant suppression of expression; “—” — absence of changes in expression of each gene in each tumor cell line.

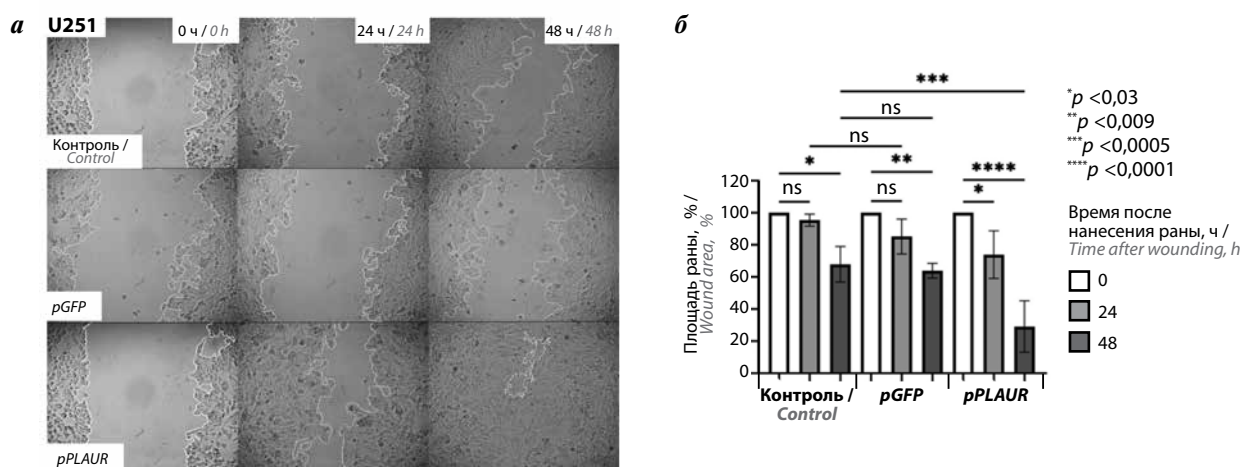


Fig. 5. Migration of glioma cell line U251 before and after PLAUR gene expression: a – wound area 24 and 48 hours after wounding; b – analysis of wound areas in 3 independent experiments. Control – non-transfected cells; GFP – cells after transfection with pGFP control plasmid; PLAUR – cells after transfection with pPLAUR plasmid; ns – differences are not statistically significant. Data are presented as mean wound area after 24 and 48 hours relative to baseline wound area (0 h) in percents. Statistical analysis of data was performed using one-way ANOVA, Tukey test

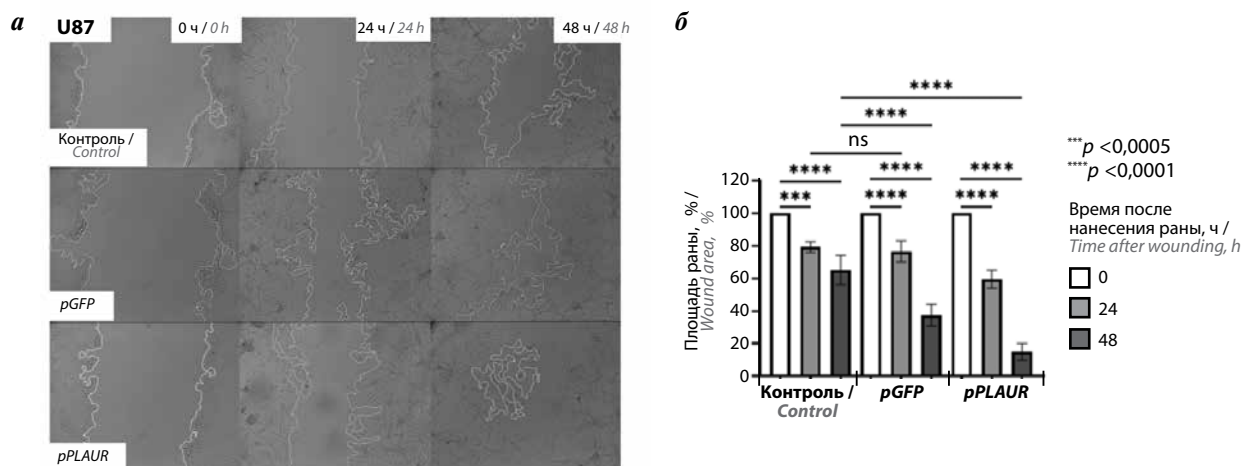


Рис. 6. Миграция клеточной линии глиомы U87 до и после индукции экспрессии гена *PLAUR*: а — площадь раны через 24 и 48 ч после нанесения царапины; б — анализ площади ран 3 независимых экспериментов. Контроль — нетрансфицированные клетки; pGFP — клетки после трансфекции с контрольной плазмидой pGFP; pPLAUR — клетки после трансфекции плазмидой pPLAUR; ns — различия статистически незначимы. Данные представлены как средняя площадь раны через 24 и 48 ч в процентах относительно исходной площади раны (0 ч). Статистический анализ данных проведен с помощью one-way ANOVA — теста Tukey

Fig. 6. Migration of glioma cell line U87 before and after *PLAUR* gene expression: а — wound area 24 and 48 hours after wounding; б — analysis of wound areas in 3 independent experiments. Control — non-transfected cells; GFP — cells after transfection with pGFP control plasmid; PLAUR — cells after transfection with pPLAUR plasmid; ns — differences are not statistically significant. Data are presented as mean wound area after 24 and 48 hours relative to baseline wound area (0 h) in percents. Statistical analysis of data was performed using one-way ANOVA, Tukey test

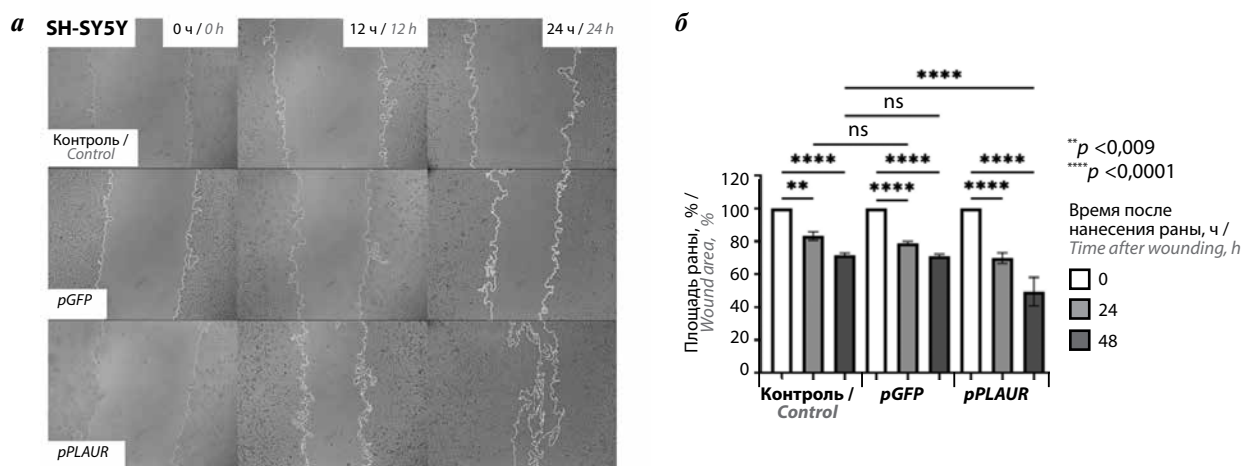


Рис. 7. Миграции клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y до и после индукции экспрессии гена *PLAUR*: а — площадь раны через 12 и 24 ч после нанесения царапины; б — анализ площади ран 3 независимых экспериментов. Контроль — нетрансфицированные клетки; pGFP — клетки после трансфекции с контрольной плазмидой pGFP; pPLAUR — клетки после трансфекции плазмидой pPLAUR; различия статистически незначимы. Данные представлены как средняя площадь раны через 12 и 24 ч в процентах относительно исходной площади раны (0 ч). Статистический анализ данных проведен с помощью one-way ANOVA — теста Tukey

Fig. 7. Migration of neuroblastoma cell line SH-SY5Y before and after *PLAUR* gene expression: а — wound area 12 and 24 hours after wounding; б — analysis of wound areas in 3 independent experiments. Control — non-transfected cells; GFP — cells after transfection with pGFP control plasmid; PLAUR — cells after transfection with pPLAUR plasmid; ns — differences are not statistically significant. Data are presented as mean wound area after 12 and 24 hours relative to baseline wound area (0 h) in percents. Statistical analysis of data was performed using one-way ANOVA, Tukey test

ОБСУЖДЕНИЕ

Рецептор уроткиназы, кодируемый геном *PLAUR*, является ключевым компонентом патогенеза злокачественных новообразований. Его повышенная экспрессия в клетках опухоли способствует ее прогрессии, инвазии и метастазированию. Результаты многочисленных экспериментальных и клинических исследований демонстрируют стойкую зависимость между

высоким уровнем экспрессии гена *PLAUR* и агрессивным фенотипом опухолей, что делает uPAR перспективной мишенью для противоопухолевой терапии [19].

В ходе нашего исследования установлено, что индукция экспрессии гена *PLAUR* в клетках глиомы и нейробластомы человека сопровождается увеличением экспрессии *CDH1* и *CDH2* (Е- и N-кадгеринов соответственно) как ключевых генов, кодирующих

белки межклеточной адгезии и ассоциированных с ЭМП и повышенной миграционной активностью опухолевых клеток. В частности, в клетках глиомы U87 отмечено снижение уровня экспрессии *CDH2*, что может быть связано с особенностями молекулярной регуляции ЭМП в данной клеточной линии, тогда как в нейробластоме SH-SY5Y и глиоме U251 наблюдается повышение уровня экспрессии *CDH2*, что согласуется с ролью uPAR в активации интегринов и ремоделировании внеклеточного матрикса [13–15]. Кроме того, выявлена *PLAUR*-зависимая индукция экспрессии транскрипционных факторов ЭМП генов *ZEB1* и *ZEB2*, которые подавляют экспрессию гена *CDH1* и способствуют активации мезенхимального фенотипа и миграции клеток. В клетках U251 эти гены не продемонстрировали статистически значимых изменений в уровне экспрессии по сравнению с контролем (клетками рGFP), что может отражать особенности регуляции ЭМП в данной клеточной линии [20]. Аналогично гены *SNAIL1* и *SNAIL2*, кодирующие транскрипционные факторы *SNAIL* и *SLUG* соответственно, играют большую роль в индукции ЭМП. Результаты нашего исследования показали, что наблюдаемая вслед за гиперэкспрессией *PLAUR* в клетках SH-SY5Y индукция *SNAIL1* сопровождается повышенной миграцией клеток в рану (см. рис. 5–7), что может отражать усиление инвазивности опухолевых клеток [13, 21].

Мы также определили ответ на гиперэкспрессию *PLAUR* генов стволовости. Обнаруженная нами достоверная индукция *CD56* (*NCAM*) в нейробластоме и глиоме может способствовать изменению клеточного фенотипа и устойчивости к апоптозу [17]. Мы выявили такие факторы стволовости, как умеренное повышение уровней экспрессии *SOX2* и *NANOG*, поддерживающих плюрипотентность, в то время как значимые изменения в уровне экспрессии *c-Мус* обнаружены не были, что указывает на сложную и клеточнозави-

симую регуляцию стволовых свойств под влиянием *PLAUR* [18, 22–24].

Динамическая индукция экспрессии генов ЭМП, таких как *CD56*, *CDH1*, *ZEB1/2*, *SNAIL1/2*, *SOX2* и *NANOG*, наблюдаемая в нашем исследовании, может свидетельствовать о комплексной регуляции фенотипической пластичности клеток под влиянием экспрессии гена *PLAUR*. Мы выявили изменение экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие в процессе ЭМП. Результаты нашего исследования также продемонстрировали, что гиперэкспрессия *PLAUR* способствует активации ЭМП, что ведет к повышению миграционной активности клеток глиом и нейробластомы, стимулируя прогрессию опухолевого роста и метастазирование.

Таким образом, наблюдается не только усиление экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих ЭМП, но и заметное увеличение миграционной способности опухолевых клеток. В некоторых случаях выявлено снижение уровня экспрессии гена урокиназы *PLAU*, что может свидетельствовать о нарушениях обратных связей в регуляции протеолитической активности и миграционной способности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в клетках глиомы и нейробластомы выявлена статистически значимая ассоциация высокого уровня экспрессии гена *PLAUR* с индукцией экспрессии ключевых генов, отвечающих за клеточную адгезию, ЭМП и миграцию клеток опухоли. Наблюдаемое снижение экспрессии некоторых генов стволовости указывает на потенциальное влияние гиперэкспрессии гена *PLAUR* на переход в дормантность. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения механизма действия гена uPAR в патогенезе опухолей, что может способствовать разработке более эффективных терапевтических стратегий в лечении нейробластом и глиом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Semina E.V., Rubina K.A., Shmakova A.A. et al. Downregulation of uPAR promotes urokinase translocation into the nucleus and epithelial to mesenchymal transition in neuroblastoma. *J Cell Physiol* 2020;235(9):6268–86. DOI: 10.1002/jcp.29555
2. Choong P.F.M., Nadesapillai A.P.W. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin Orthop Relat Res* 2003;415:S46–58. DOI: 10.109701.blo.0000093845.72468.bd
3. Zeng F., Li G., Liu X. et al. Plasminogen activator urokinase receptor implies immunosuppressive features and acts as an unfavorable prognostic biomarker in glioma. *Oncologist* 2021;26(8):e1460–9. DOI: 10.1002/onco.13750
4. Gouri A., Dekaken A., El Bairi K. et al. Plasminogen activator system and breast cancer: potential role in therapy decision making and precision medicine. *Biomark Insights* 2016;11:105–11. DOI: 10.4137/BMI.S33372
5. Gilder A.S., Natali L., Van Dyk D.M. The urokinase receptor induces a mesenchymal gene expression signature in glioblastoma cells and promotes tumor cell survival in neurospheres. *Sci Rep* 2018;8(1):2982. DOI: 10.1038/s41598-018-21358-1
6. Hildenbrand R., Schaaf A. The urokinase-system in tumor tissue stroma of the breast and breast cancer cell invasion. *Int J Oncol* 2009;34(1):15–23.
7. Boonstra M.C., Verspaget H.W., Ganesh S. et al. Clinical applications of the urokinase receptor (uPAR) for cancer patients. *Curr Pharm Des* 2011;17(19):1890–910. DOI: 10.2174/138161211796718233
8. Noh H., Hong S., Huang S. Role of urokinase receptor in tumor progression and development. *Theranostics* 2013;3(7):487–95. DOI: 10.7150/thno.4218
9. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 2016;131(6):803–20. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1
10. Brodeur G.M. Spontaneous regression of neuroblastoma. *Cell Tissue Res* 2018;372(2):277–86. DOI: 10.1007/s00441-017-2761-2

11. Linabery A.M., Ross J.A. Childhood and adolescent cancer survival in the US by race and ethnicity for the diagnostic period 1975–1999. *Cancer* 2008;113(9):2575–96. DOI: 10.1002/cncr.23866
12. Shmakova A.A., Klimovich P.S., Rysenkova K.D. et al. Urokinase receptor uPAR downregulation in neuroblastoma leads to dormancy, chemoresistance and metastasis. *Cancers (Basel)* 2022;14(4):994. DOI: 10.3390/cancers14040994
13. Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(3):178–96. DOI: 10.1038/nrm3758
14. Noronha C., Ribeiro A.S., Taipa R. et al. Cadherin expression and EMT: a focus on gliomas. *Biomedicines* 2021;9(10):1328. DOI: 10.3390/biomedicines9101328
15. Meel M.H., Schaper S.A., Kaspers G.J.L. et al. Signaling pathways and mesenchymal transition in pediatric high-grade glioma. *Cell Mol Life Sci* 2018;75(5):871–87. DOI: 10.1007/s00018-017-2714-7
16. Inoue A., Ohnishi T., Nishikawa M. et al. A Narrative review on CD44's role in glioblastoma invasion, proliferation, and tumor recurrence. *Cancers (Basel)* 2023;15(19):4898. DOI: 10.3390/cancers15194898
17. Van Acker H.H., Capsomidis A., Smits E.L. et al. CD56 in the immune system: more than a marker for cytotoxicity? *Front Immunol* 2017;8:892. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00892
18. Miller D.M., Thomas S.D., Islam A. et al. c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res* 2012;18(20):5546–53. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0977.
19. Zhai B.-T., Tian H., Sun J. et al. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) as a therapeutic target in cancer. *J Transl Med* 2022;20(1):135. DOI: 10.1186/s12967-022-03329-3
20. Suzuki K., Kawataki T., Endo K. et al. Expression of ZEBs in gliomas is associated with invasive properties and histopathological grade. *Oncol Lett* 2018;16(2):1758–64. DOI: 10.3892/ol.2018.8852
21. Шмакова А.А., Климович П.С., Рысенкова К.Д. и др. Рецептор урокиназы uPAR как мишень в онкологии: подавление экспрессии uPAR в клетках нейробластомы снижает пролиферацию, но вызывает дормантность, химиорезистентность и метастазирование. *Злокачественные опухоли* 2021;11:75–6. Shmakova A.A., Klimovich P.S., Rysenkova K.D. et al. UPA urokinase receptor as a target in oncology: suppression of uPAR expression in neuroblastoma cells reduces proliferation, but causes dormancy, chemoresistance, and metastasis. *Zlokachestvennyye opukholi = Malignant Tumors* 2021;11:75–6. (In Russ.).
22. Бойченко В.С., Климович П.С., Шипова А.А. и др. Механизмы участия урокиназного рецептора в репрограммировании клеток опухолевой стромы. *Гены и клетки* 2022;17:32. Boychenko V.S., Klimovich P.S., Shchipova A.A. et al. Mechanisms of participation of the urokinase receptor in the reprogramming of tumor stroma cells. *Geny i kletki = Genes and Cells* 2022;17:32. (In Russ.).
23. Mamun M.A., Mannoer K., Cao J. et al. SOX2 in cancer stemness: tumor malignancy and therapeutic potentials. *J Mol Cell Biol* 2020;12(2):85–98. DOI: 10.1093/jmcb/mjy080
24. Jeter C.R., Yang T., Wang J. et al. Concise review: NANOG in cancer stem cells and tumor development: an update and outstanding questions. *Stem Cells* 2015;33(8):2381–90. DOI: 10.1002/stem.2007

Благодарность. Авторы выражают благодарность Галине Валерьевне Павловой из ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский институт нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России за предоставление линий глиомы и Максиму Николаевичу Карагяру из ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» за предоставление линии нейробластомы.

Acknowledgment. The authors would like to thank Galina Valeryevna Pavlova from the National Medical Research Institute of Neurosurgery named after Academician N.N. Burdenko, Ministry of Health of Russia for the provision of glioma lines and Maxim Nikolaevich Karagayur from the Lomonosov Moscow State University for the provision of a neuroblastoma line.

Вклад авторов

А.В. Ласица, М.И. Антипина, Е.В. Семина: разработка дизайна исследования, планирование исследования, анализ данных, написание текста статьи;

Д.А. Назарова: клонирование плазмид для эксперимента, получение данных для анализа;

К.А. Рубина, В.Ю. Сысоева: обсуждение дизайна исследования, анализ данных.

Authors' contributions

A.V. Lasitsa, M.I. Antipina, E.V. Semina: development of research design, research planning, data analysis, article writing;

D.A. Nazarova: cloning plasmids for experiment, obtaining data for analysis;

K.A. Rubina, V.Yu. Sysoeva: discussion of research design, data analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.В. Ласица / A.V. Lasitsa: <https://orcid.org/0009-0005-3938-4798>

М.И. Антипина / M.I. Antipina: <https://orcid.org/0000-0002-1818-7139>

Д.А. Назарова / D.A. Nazarova: <https://orcid.org/0009-0006-3971-7668>

К.А. Рубина / K.A. Rubina: <https://orcid.org/0000-0002-7166-7406>

В.Ю. Сысоева / V.Yu. Sysoeva: <https://orcid.org/0000-0001-9885-9056>

Е.В. Семина / E.V. Semina: <https://orcid.org/0000-0002-3927-9286>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Разработка и наращивание плазмиды, а также работа с опухолевыми линиями выполнены в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» (задание № 03р-23/110-03). Молекулярно-биологические исследования (полимеразная цепная реакция) и оценка миграционной активности опухолевых клеток выполнены на средства программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» ФГАУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта».

Funding. The development and expansion of plasmids, as well as work with tumor lines, were carried out within the framework of the state assignment of the Lomonosov Moscow State University (assignment No. 03р-23/110-03). Molecular biological research (polymerase chain reaction) and assessment of the migration activity of tumor cells were carried out using the funds of the strategic academic leadership program “Priority 2030” of the I. Kant Baltic Federal University.

Статья поступила: 04.05.2025. **Принята к публикации:** 10.06.2025. **Опубликована онлайн:** 06.10.2025.

Article submitted: 04.05.2025. **Accepted for publication:** 10.06.2025. **Published online:** 06.10.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-70-77>

Метилирование промотора гена *MGMT* как прогностический маркер глиобластомы

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

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

Контакты: Анатолий Владимирович Лихтенштейн alicht@mail.ru

Введение. Глиобластома является наиболее распространенной злокачественной опухолью головного мозга у взрослых и характеризуется неблагоприятным прогнозом. Лечение пациентов с данной патологией включает хирургическую резекцию, облучение и применение алкилирующего агента темозоломида (TMZ). Терапевтическая эффективность последнего, обусловленная способностью повреждать ДНК и индуцировать апоптоз, нейтрализуется экспрессией фермента репарации ДНК O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT). Метилирование промотора гена *MGMT* подавляет синтез этого фермента и повышает цитотоксическую эффективность TMZ.

Цель исследования – выявление феномена метилирования промотора *MGMT* у пациентов с глиобластомой и оценка его прогностической значимости.

Материалы и методы. Проанализированы обработанные бисульфитом образцы ДНК, выделенные из заключенной в парафиновые блоки опухолевой ткани. Метилирование *MGMT* выявляли с помощью качественного метода метил-специфичной полимеразной цепной реакции. Прогностическую значимость этого феномена в совокупности с рядом других клинических показателей оценивали с использованием однофакторного и многофакторного анализов.

Результаты. Установлено, что метилирование промотора *MGMT* является одним из наиболее значимых благоприятных прогностических факторов глиобластомы: риск развития рецидива заболевания или летального исхода в определенный период времени у таких больных примерно в 2 раза ниже, чем у пациентов с интактным *MGMT*.

Заключение. Метил-специфичная полимеразная цепная реакция, рутинно применяемая в клинической практике, дает возможность оценить статус метилирования *MGMT* как фактор прогноза, но не позволяет судить о его предсказательном потенциале.

Ключевые слова: глиобластома, метил-специфичная полимеразная цепная реакция, метилирование *MGMT*, темозоломид

Для цитирования: Ботезату И.В., Кондратова В.Н., Строганова А.М. и др. Метилирование промотора гена *MGMT* как прогностический маркер глиобластомы. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(3):70–7.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-70-77>

Methylation of *MGMT* promoter as a prognostic marker of glioblastoma

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

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

Contacts: Anatoly Vladimirovitch Lichtenstein alicht@mail.ru

Introduction. Glioblastoma is the most common malignant brain tumor in adults with a poor prognosis. Treatment of patients includes surgical resection, radiation and the alkylating agent temozolomide (TMZ). The therapeutic efficacy of TMZ is due to its ability to damage DNA and induce apoptosis, but it is neutralized by the expression of the DNA repair enzyme O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT). Methylation of the *MGMT* gene promoter suppresses the synthesis of the corresponding enzyme and increases the cytotoxic efficiency of TMZ.

Aim. To determine the *MGMT* promoter methylation in glioblastoma patients and to evaluate the prognostic significance of this phenomenon.

Materials and methods. Bisulfite-treated DNA samples isolated from formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissues obtained from glioblastoma patients were analyzed. *MGMT* methylation was assessed by qualitative methylation-specific polymerase chain reaction. The prognostic significance of this phenomenon in conjunction with a number of other clinical parameters was assessed by means of univariate and multivariate analysis.

Results. *MGMT* promoter methylation was found to be one of the most significant favorable prognostic factors of glioblastoma: the likelihood of disease reappearance or a fatal outcome at a specific point in time is approximately two-fold lower in such patients than in those with intact *MGMT*.

Conclusion. The methylation-specific polymerase chain reaction, which is routinely used in clinical practice, adequately assesses *MGMT* methylation status as a prognostic factor, but it does not allow for the evaluation of its predictive potential.

Keywords: glioblastoma, methylation-specific polymerase chain reaction, *MGMT* methylation, temozolomide

For citation: Botezatu I.V., Kondratova V.N., Stroganova A.M. et al. Methylation of *MGMT* promoter as a prognostic marker of glioblastoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(3):70–7. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-70-77>

ВВЕДЕНИЕ

Глиобластома — наиболее распространенная злокачественная первичная опухоль головного мозга у взрослых [1–3], характеризующаяся плохим прогнозом. Лечение пациентов с данной патологией включает хирургическую резекцию и облучение с одновременным применением алкилирующего агента темозоломида (TMZ). Терапевтическая эффективность TMZ обусловлена его способностью повреждать ДНК и индуцировать гибель опухолевых клеток. Однако экспрессия фермента репарации ДНК — O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (*MGMT*) — способна в значительной степени нейтрализовать цитотоксический эффект TMZ [4]. Метилирование промотора гена *MGMT*, характерное для многих раковых клеток, подавляет синтез соответствующего фермента и повышает тем самым цитотоксическую эффективность TMZ. Известно также, что у пациентов с глиобластомой с метилированным *MGMT* наблюдаются более высокие показатели общей (ОВ) и безрецидивной (БРВ) выживаемости, чем у пациентов с неметилированным геном [5, 6]. Таким образом, статус *MGMT* является важным прогностическим и предсказательным (в отношении эффективности TMZ) маркером глиобластомы.

Метилирование *MGMT* определяют разными методами, эффективность которых является предметом исследований [1, 7–16]. Рутинно используемый в клинической практике качественный метод метил-специфичной полимеразной цепной реакции (МС-ПЦР) с последующим гель-электрофорезом продуктов амплификации [17, 18] предполагает визуальную оценку электрофоретических полос и по этой причине может считаться не вполне объективным. В связи с необходимостью оценки достоверности получаемых с помощью этого метода результатов на 1-м этапе исследования сравнили эффективность МС-ПЦР и апробированного коммерческого набора, основанного на ПЦР в реальном времени. Задачей 2-го этапа явилось определение прогностической значимости феномена метилирования *MGMT* с учетом других клинических показателей.

Цель исследования — выявление феномена метилирования промотора *MGMT* у пациентов с глиобластомой и оценка его прогностической значимости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические образцы. В ретроспективное исследование включены больные, получавшие лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина ($n = 74$). Клиническая характеристика больных представлена в табл. 1.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование ($n = 74$)

Table 1. Clinical characteristics of patients included in the study ($n = 74$)

Показатель Parameter	Значение Value
Пол, n : Sex, n :	
мужской male	38
женский female	36
Возраст, медиана (диапазон), лет Age, median (range), years	57 (28–82)
Хирургическая резекция, n : Surgery resection, n :	
полная и субтотальная complete and subtotal	24
частичная и биопсия partial and biopsy	50
Гистологический тип опухоли, n : Histological type of tumor, n :	
астроцитомы astrocytoma	15
глиобластома glioblastoma	59
<i>IDH</i> , n : IDH , n :	
дикого типа wild type	53
мутантный mutant	14
Индекс Карновского (%), n : Karnofsky score (%), n :	
20	10
30	29
40	32
60	3

Выделение ДНК. Выделение ДНК из заключенной в парафиновые блоки опухолевой ткани проводили после ее депарафинизации ксилолом методом фенольно-хлороформной депротеинизации. ДНК конвертировали обработкой бисульфитом натрия посредством коммерческого набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Метил-специфичная полимеразная цепная реакция. МС-ПЦР промотора гена *MGMT* (GenBank accession number NG_052673.1; локализация ампликона — chr10: 131155502–131155623, hg18) проводили, как описано ранее [17, 18]. Для амплификации метилированной последовательности использовали сенс-праймер 5'-TTTCGACGTTCTAGGTTTTCGC и 2 антисенс-праймера: 5'-GCACTCTTCCGAAAACGAAACG и 5'-ACCACT CGAAACTACCACCGTCC. Для амплификации неметилированной последовательности применяли сенс-праймер 5'-GTGTTTTGATGT-TTGTAGGTTTTTGT и 2 антисенс-праймера: 5'-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAACA и 5'-ACCACTCAAACTAC CACCATCC. Условия ПЦР: начальная денатурация — 5 мин при 95 °C; 40 циклов — 30 с при 95 °C, 30 с при 60 °C, 40 с при 72 °C; 10 мин при 72 °C (для метилированной последовательности); начальная денатурация — 5 мин при 95 °C; 40 циклов — 30 с при 95 °C, 30 с при 64 °C, 40 с при 72 °C; 10 мин при 72 °C (для неметилированной последовательности).

Продукты ПЦР разделяли в 4 % агарозном геле с бромистым этидием (0,5 мкг/мл). Каждому образцу ДНК соответствовали 4 дорожки геля (по 2 для метилированных и неметилированных последовательностей *MGMT*). Полосы метилированного *MGMT* — 81 пара оснований (п.о.) и 118 п.о., полосы неметилированного *MGMT* — 90 и 121 п.о. О статусе метилирования *MGMT* судили по присутствию полос в дорожках: обязательному — в дорожках 1 и 2 (их отсутствие свидетельствует о неэффективности ПЦР) и показательному — в дорожках 3 и 4 (указывают на наличие в образце метилированного *MGMT*).

В качестве метода сравнения использовали коммерческий набор *MGMT* Gene Methylation Detection Kit (Xiamen Spacegen, Китай), основанный на ПЦР в реальном времени (FAM-меченный зонд отражает амплификацию метилированного *MGMT*, VIC-меченный зонд — амплификацию фрагмента гена актина как внутреннего контроля).

Статистический анализ. Согласованность результатов 2 качественных методов детекции метилированного *MGMT* (МС-ПЦР и использование коммерческого набора Xiamen Spacegen) оценивали с помощью определения величины коэффициента межэкспертного согласия (Cohen's kappa testing) (κ) [19] (табл. 2). Для однофакторного анализа выживаемости по методу Каплана–Майера и многофакторного анализа (регрессия Кокса) использовали программы Cutoff Finder [20],

Таблица 2. Сила межэкспертного согласия

Table 2. Strength of inter-expert agreement

Коэффициент межэкспертного согласия (κ) The coefficient of inter-expert agreement (κ)	Характеристика Characteristic
<0,20	Слабая Poor
0,21–0,40	Удовлетворительная Fair
0,41–0,60	Средняя Moderate
0,61–0,80	Хорошая Good
0,81–1,00	Почти идеальная Almost perfect

GraphPad Prism 9.5.1 (GraphPad Software, США) и MedCalc (MedCalc Software, Бельгия). Все статистические тесты двусторонние, различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Метил-специфичная ПЦР широко применяется для оценки степени метилирования промотора *MGMT*. Варианты этого метода различаются способом регистрации ампликонов метилированных и неметилированных последовательностей (М+ и М– соответственно). Используются, в частности, визуальная оценка разделенных гель-электрофорезом полос (как в данном исследовании), или сопоставление кривых амплификации ПЦР в реальном времени (как в избранном нами методе сравнения) (рис. 1).

Сравнение проводили на 25 образцах ДНК, случайно выбранных из общего массива (совпадение результатов получено в 22 случаях; конкордантность — 88 %). При сопоставлении качественных методов принято использовать коэффициент κ [19], величина которого характеризует степень согласованности результатов (табл. 2). В данном случае результаты теста (табл. 3) оказались вполне удовлетворительными: $\kappa = 0,76$; стандартная ошибка — 0,13; доверительный интервал 0,52–1,00.

Определение прогностических маркеров глиобластомы. В качестве факторов прогноза ОВ и БРВ больных глиобластомой рассматривали возраст, пол пациентов, гистологический тип опухоли (астроцитомы или глиобластомы), статус гена *IDH* (дикий тип или мутантный), функциональное состояние больного (по шкале Карновского), степень хирургического вмешательства (радикальное или частичное), а также наличие метилирования промотора *MGMT* (обнаружено в 36 (49 %) образцах ДНК из 74). Проведен однофакторный ана-

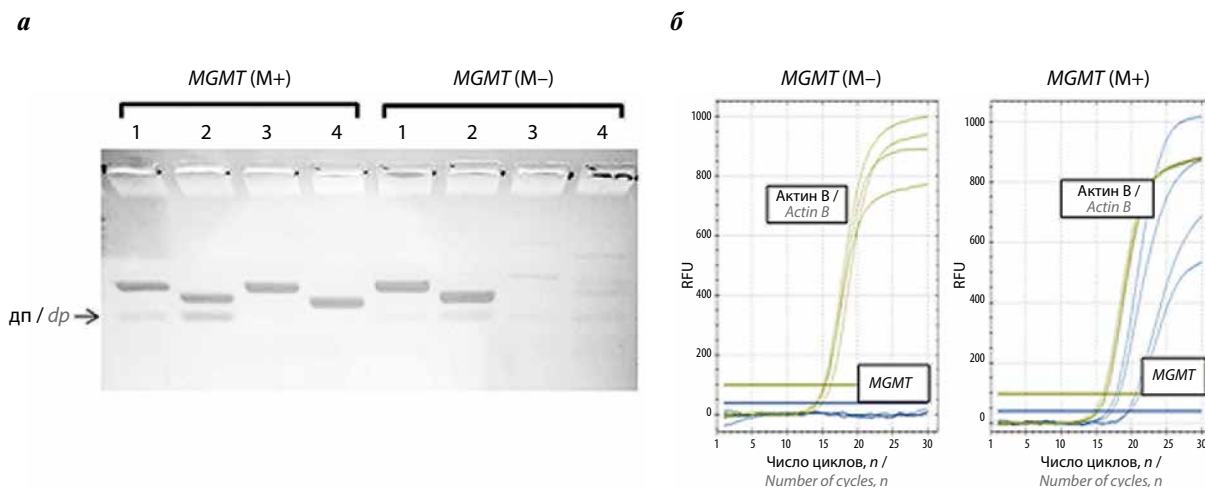


Рис. 1. Метил-специфичная полимеразная цепная реакция промотора *MGMT*: а — идентификация метилированных (*M+*) и неметилированных (*M-*) последовательностей методом гель-электрофореза ампликонов; б — полимеразная цепная реакция в реальном времени (FAM-меченный зонд отражает амплификацию метилированного *MGMT*, VIC-меченный зонд — амплификацию фрагмента гена актина как внутреннего контроля). Дорожки 1 и 2 — ампликоны (длинный и короткий соответственно) неметилированных последовательностей, 3 и 4 — ампликоны (длинный и короткий соответственно) метилированных последовательностей; дп — димеры праймеров; RFU — относительные единицы флуоресценции

Fig. 1. Methylation-specific polymerase chain reaction of the *MGMT* promoter: а — identification of methylated (*M+*) and unmethylated (*M-*) sequences by gel electrophoresis of amplicons; б — real-time polymerase chain reaction (FAM-labelled probe reflects amplification of methylated *MGMT*, VIC-labelled probe reflects amplification of actin gene fragment as an internal control). Lanes: 1 and 2 — amplicons (long and short, accordingly) of unmethylated sequences, 3 and 4 — amplicons (long and short, accordingly) of methylated sequences; dp — primer dimers; RFU — relative fluorescence units

Таблица 3. Согласованность результатов

Table 3. Consistency of results

Метил-специфичная полимеразная цепная реакция Methyl-specific polymerase chain reaction	Коммерческий набор <i>MGMT</i> Gene Methylation Detection Kit (Xiamen Spacegen, Китай) Commercial <i>MGMT</i> Gene Methylation Detection Kit (Xiamen Spacegen, China)		
	M–	M+	Всего, n (%) Total, n (%)
M–	10	3	13 (52)
M+	0	12	12 (48)
Всего Total	10 (40)	15 (60)	25

Примечание. «M+» — ампликоны метилированных последовательностей; «M–» — ампликоны неметилированных последовательностей.

Note. “M+” — amplicons of methylated sequences; “M–” — amplicons of unmethylated sequences.

лиз (кривые выживаемости Каплана–Майера и *log-rank*-тест), ориентированный на выявление взаимосвязи между 1 зависимой и 1 независимой переменными (рис. 2). Статистически значимые различия в ОВ и БРВ выявлены в группах больных, дихотомизированных по следующим факторам: возраст (порог 39,5 года), хирургическое вмешательство (полная или частичная резекция; статистически значимые различия только по ОВ), статус *MGMT* (метилированный или неметилированный).

Для выявления взаимосвязи между 1 зависимой и 2 или более независимыми переменными дополнительно использовали многофакторный анализ (регрессия Кокса). В ходе применения пошагового метода введения переменных в анализируемую модель получено подтверждение прогностической значимости возраста, хирургического вмешательства и метилирования *MGMT* как для ОВ, так и для БРВ пациентов с глиобластомой (по другим исследованным факторам различия статистически незначимы) (табл. 4 и 5).

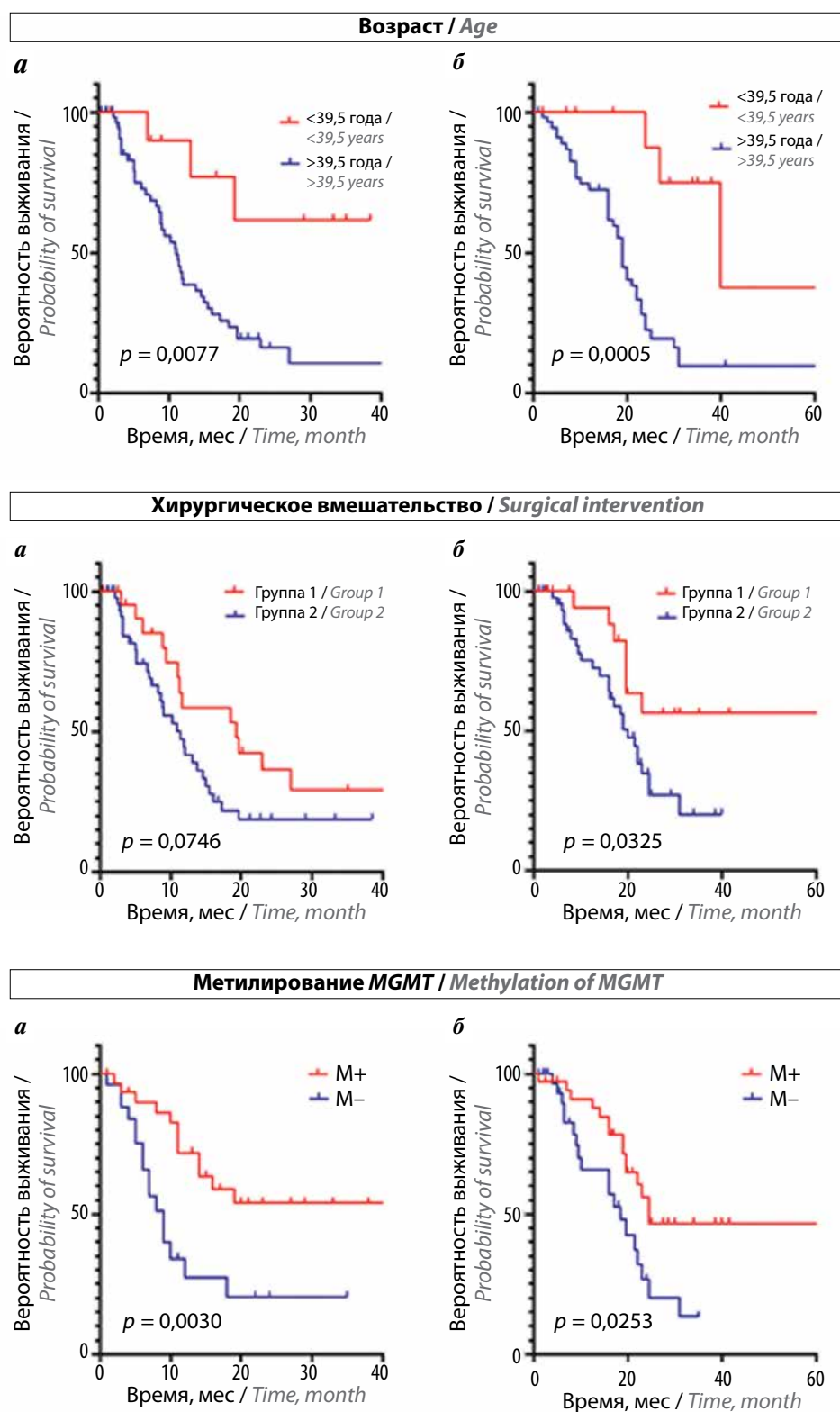


Рис. 2. Безрецидивная (а) и общая (б) выживаемость пациентов с глиобластомой в зависимости от возраста (порог – 39,5 года), хирургического вмешательства (радикального – группа 1, частичного – группа 2) и метилирования MGMT

Fig. 2. Recurrence-free (a) and overall (б) survival curves of glioblastoma patients depending on age (threshold – 39.5 years), surgical intervention (radical – group 1, partial – group 2), and MGMT methylation

Таблица 4. Результаты многофакторного анализа безрецидивной выживаемости

Table 4. Results of multivariate analysis of progression free survival

Показатель Parameter	<i>p</i>	Отношение рисков Hazard ratio	95 % доверительный интервал 95 % confidence interval
Возраст Age	0,0040	5,89	1,76–19,69
<i>MGMT</i> (M+)	0,0208	0,48	0,25–0,89
Хирургическое вмешательство Surgery	0,0356	0,48	0,23–0,95

Примечание. Здесь и в табл. 5: «M+» — ампликоны метилированных последовательностей.
Note. Here and in table 5: “M+” — amplicons of methylated sequences.

Таблица 5. Результаты многофакторного анализа общей выживаемости

Table 5. Results of multivariate analysis of overall survival

Показатель Parameter	<i>p</i>	Отношение рисков Hazard ratio	95 % доверительный интервал 95 % confidence interval
Возраст Age	0,0173	5,86	1,36–25,14
<i>MGMT</i> (M+)	0,0360	0,46	0,22–0,95
Хирургическое вмешательство Surgery	0,0215	0,35	0,14–0,86

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что феномен метилирования промотора *MGMT* является одним из наиболее важных прогностических факторов глиобластомы. Риск развития неблагоприятных событий (рецидива или смерти) в определенный момент времени у таких больных, судя по величине отношения рисков, существенно (примерно в 2 раза) ниже, чем у больных с интактным *MGMT*. Установлено также, что качественный метод МС-ПЦР, рутинно применяемый в клинической практике, позволяет определить статус метилирования этого гена как фактора прогноза.

Необходимо отметить, что, по данным литературы, феномен метилирования *MGMT* обладает не только прогностическим, но и важным предсказательным потенциалом (имеется в виду эффективность лечения темозоломидом) [3, 15, 21]. Для его реализации необходимо, однако, применять метод, дающий возможность не только констатировать факт метилирования, но и количественно оценить его. Определение опти-

мального порога метилирования в этом случае может позволить дихотомизировать больных на группы риска [22, 23]. Поскольку пиросеквенирование, являющееся «золотым стандартом» количественной оценки метилирования *MGMT* [8, 10], сопряжено с необходимостью постаmplификационного секвенирования, наличием дорогостоящего оборудования, значительными затратами времени и труда, осложняющими его практическое применение, существует потребность в новых методических подходах, лишенных этих недостатков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Качественный метод МС-ПЦР дает возможность оценить феномен метилирования промотора *MGMT* как одного из наиболее показательных прогностических факторов глиобластомы, но не позволяет использовать его предсказательный потенциал (эффективность терапии темозоломидом). Это обстоятельство стимулирует разработку новых количественных методов, пригодных для рутинного применения в клинической практике.

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

- Gibson D., Vo A.H., Lambing H. et al. A systematic review of high impact CpG sites and regions for *MGMT* methylation in glioblastoma [A systematic review of *MGMT* methylation in GBM]. *BMC Neurol* 2024;(1);24:103. DOI: 10.1186/s12883-024-03605-3
- 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
- Brandner S., McAleenan A., Kelly C. et al. *MGMT* promoter methylation testing to predict overall survival in people with glioblastoma treated with temozolomide: a comprehensive meta-analysis based on a Cochrane Systematic Review. *Neuro Oncol* 2021;23(9):1457–69. DOI: 10.1093/neuonc/noab105
- Esteller M., Garcia-Foncillas J., Andion E. et al. Inactivation of the DNA-repair gene *MGMT* and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000;343(19):1350–4. DOI: 10.1056/NEJM200011093431901
- Hegi M.E., Diserens A.C., Gorlia T. et al. *MGMT* gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352(10):997–1003. DOI: 10.1056/NEJMoa043331
- Wick A., Kessler T., Platten M. et al. Superiority of temozolomide over radiotherapy for elderly patients with RTK II methylation class, *MGMT* promoter methylated malignant astrocytoma. *Neuro Oncol* 2020;2298:1162–72. DOI: 10.1093/neuonc/noaa033
- Sepulveda A.R., Jones D., Ogino S. et al. CpG methylation analysis – current status of clinical assays and potential applications in molecular diagnostics: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2009;11(4):266–78. DOI: 10.2353/jmoldx.2009.080125
- Quillien V., Lavenu A., Karayan-Tapon L. et al. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer* 2012;118(17):4201–11. DOI: 10.1002/cncr.27392
- Bienkowski M., Berghoff A.S., Marosi C. et al. Clinical Neuropathology practice guide 5-2015: *MGMT* methylation pyrosequencing in glioblastoma: unresolved issues and open questions. *Clin Neuropathol* 2015;34(5):250–7. DOI: 10.5414/np300904
- Chai R.C., Liu Y.Q., Zhang K.N. et al. A novel analytical model of *MGMT* methylation pyrosequencing offers improved predictive performance in patients with gliomas. *Mod Pathol* 2019;32(1):4–15. DOI: 10.1038/s41379-018-0143-2
- Estival A., Sanz C., Ramirez J.L. et al. Pyrosequencing versus methylation-specific PCR for assessment of *MGMT* methylation in tumor and blood samples of glioblastoma patients. *Sci Rep* 2019;9(1):11125. DOI: 10.1038/s41598-019-47642-2
- Yamashita S., Yokogami K., Matsumoto F. et al. *MGMT* promoter methylation in patients with glioblastoma: is methylation-sensitive high-resolution melting superior to methylation-sensitive polymerase chain reaction assay? *J Neurosurg* 2019;130(3):780–8. DOI: 10.3171/2017.11.JNS171710
- Filipits M., Preusser M., Hainfellner J.A. et al. Evaluation of an assay for *MGMT* gene promoter methylation in glioblastoma samples. *Anticancer Res* 2020;40:6229–36. DOI: 10.21873/anticancer.14643
- Malmstrom A., Lysiak M., Kristensen B.W. et al. Do we really know who has an *MGMT* methylated glioma? Results of an international survey regarding use of *MGMT* analyses for glioma. *Neurooncol Pract* 2020;7(1):68–76. DOI: 10.1093/nop/npz039
- McAleenan A., Kelly C., Spiga F. et al. Prognostic value of test(s) for O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) promoter methylation for predicting overall survival in people with glioblastoma treated with temozolomide. *Cochrane Database Syst Rev* 2021;3(3):CD013316. DOI: 10.1002/14651858.CD013316.pub2
- Lhotska H., Janeckova K., Cechova H. et al. Validating a clinically based MS-MLPA threshold through comparison with Sanger sequencing in glioblastoma patients. *Clin Epigenetics* 2025;17(1):16. DOI: 10.1186/s13148-025-01822-2
- Табаков Д.В., Строганова А.М., Сендерович А.И. и др. Анализ метилирования гена *MGMT* в глиомах методом модифицированной метил-специфичной ПЦР. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина* 2015;26:29–33. Tabakov D.V., Stroganova A.M., Senderovich A.I. et al. Analysis of *MGMT* gene methylation in gliomas by modified methyl-specific PCR. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina* = Bulletin of the N.N. Blokhin Russian Scientific Research Center 2015;26:29–33. (In Russ.).
- Табаков Д.В., Катаргин А.Н., Строганова А.М. и др. Мутации изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 и метилирование гена *MGMT* в глиомах. *Успехи молекулярной онкологии* 2017;4:53–9. DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-1-53-59 Tabakov D.V., Katargin A.N., Stroganova A.M. et al. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes mutations and *MGMT* methylation in gliomas. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = Advances in Molecular Oncology 2017;4(1):53–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-1-53-59
- Pum J.K. W. Evaluation of analytical performance of qualitative and semi-quantitative assays in the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta* 2019;497:197–203. DOI: 10.1016/j.cca.2019.07.018
- Budczies J., Klauschen F., Sinn B.V. et al. Cutoff finder: a comprehensive and straightforward web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* 2012;7(12):e51862. DOI: 10.1371/journal.pone.0051862
- Gomes I., Moreno D.A., Dos Reis M.B. et al. Low *MGMT* digital expression is associated with a better outcome of IDH1 wildtype glioblastomas treated with temozolomide. *J Neurooncol* 2021;151(2):135–44. DOI: 10.1007/s11060-020-03675-6
- Silva F.F. V. E., Di D.M., Caponio V.C. A. et al. Pyrosequencing analysis of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase methylation at different cut-offs of positivity associated with treatment response and disease-specific survival in isocitrate dehydrogenase-wildtype grade 4 glioblastoma. *Int J Mol Sci* 2024;25(1):612. DOI: 10.3390/ijms25010612
- Nguyen N., Redfield J., Ballo M. et al. Identifying the optimal cutoff point for *MGMT* promoter methylation status in glioblastoma. *CNS Oncol* 2021;10(3):CNS74. DOI: 10.2217/cns-2021-0002

Вклад авторов

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

Authors' contributions

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

ORCID авторов / ORCID of authors

И.В. Ботезату / I.V. Botezatu: <https://orcid.org/0000-0002-0297-4963>
В.Н. Кондратова / V.N. Kondratova: <https://orcid.org/0000-0003-0614-8789>
А.М. Строганова / A.M. Stroganova: <https://orcid.org/0000-0002-7297-5240>
С.Л. Дранко / S.L. Dranko: <https://orcid.org/0000-0003-3315-0817>
Д.Р. Насхлеташвили / D.R. Naskhletashvili: <https://orcid.org/0000-0002-4218-9652>
А.В. Лихтенштейн / A.V. Lichtenstein: <https://orcid.org/0000-0002-0190-5069>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Финансируется в рамках госбюджетной темы.

Funding. It is funded under the state budget theme.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

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

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.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-78-99>

Особенности регуляции транскрипционной активности генов раково-тестикулярных антигенов при раке желудка

Д.С. Кутилин¹, О.И. Кит¹, А.Ю. Максимов¹, Л.Х. Чалхакян¹, А.В. Дашков¹, С.А. Малинин¹, Г.В. Каминский¹, Т.П. Шкурят²

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

²ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет»; Россия, 344006 Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, 105/42

Контакты: Денис Сергеевич Кутилин k.denees@yandex.ru

Введение. Рак желудка остается серьезной проблемой здравоохранения. Гены раково-тестикулярных антигенов (РТ-гены) при данной патологии могут быть перспективными мишенями для иммунотерапии из-за их ограниченной экспрессии в нормальных тканях. Большую роль в регуляции экспрессии РТ-генов при раке желудка играют сети эндогенных конкурентно взаимодействующих РНК (ceRNAs). Эти сети сложны и требуют комплексного биоинформатического и экспериментального анализов.

Цель исследования – биоинформатический анализ с последующей валидацией экспрессии РТ-генов и ее регуляции в злокачественных опухолях желудка.

Материалы и методы. Данные для биоинформатического этапа исследования взяты из базы Gene Expression Omnibus (GEO). Идентификацию дифференциально экспрессирующихся генов осуществляли с помощью GEO2R, микроРНК, таргетирующих гены-мишени, – с использованием метода машинного обучения Random forest. Также проводили анализ взаимодействия микроРНК и длинных некодирующих РНК (lncRNAs). Клиническим материалом для экспериментального этапа исследования послужили опухолевые и условно нормальные ткани 100 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом «рак желудка». Величины относительной экспрессии 6 РТ-генов (*MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6*, *MAGEH1*), а также таргетирующих их микроРНК и lncRNAs определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. С использованием GEO2R обнаружены 18 617 дифференциально экспрессирующихся локусов, включая кодирующие белки гены, микроРНК и lncRNAs. Выявлено изменение экспрессии 6 РТ-генов: *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6* и *MAGEH1*, взаимодействующих с 40 микроРНК, которые, в свою очередь, взаимодействуют с 17 lncRNAs. В опухолевой ткани пациентов обнаружены повышение экспрессии генов *MAGEA10*, *MAGEA3* и *MAGEA6* ($p < 0,0001$), снижение экспрессии miR-1207-5p, -6858-5p, -3127-3p, -3940-3p, -6807-3p, -3085-3p, -3934-5p, -4488, -4530, -6777-3p и -99a-3p ($p < 0,0001$), увеличение экспрессии miR-7113-3p, miR-874-3p, а также повышение экспрессии *LINC01089*, *AC145285.6*, *GAS5*, *AC005034.3*, *AL691447.2* ($p < 0,001$) и снижение экспрессии *SNHG14*, *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1* и *AL118506.1* ($p < 0,001$). На основании полученных данных построена модель регуляторной сети для РТ-генов при раке желудка.

Заключение. Продemonстрированы нарушения в сети конкурентно-взаимодействующих РНК РТ-генов при аденокарциноме желудка. Полученные данные имеют большое значение для понимания фундаментальных механизмов регуляции РТ-генов, а также для совершенствования подходов к иммунотерапии (новые мишени и регуляторные молекулы) и диагностики (новые молекулярные маркеры) этого заболевания.

Ключевые слова: рак желудка, ген раково-тестикулярного антигена, сеть конкурентно-взаимодействующих РНК, экспрессия, некодирующая РНК, молекулярный маркер, мишень иммунотерапии

Для цитирования: Кутилин Д.С., Кит О.И., Максимов А.Ю. и др. Особенности регуляции транскрипционной активности генов раково-тестикулярных антигенов при раке желудка. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(3):78–99. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-78-99>

Features of cancer-testicular antigen genes transcriptional activity regulation in gastric cancer

D.S. Kutilin¹, O.I. Kit¹, A.Yu. Maksimov¹, L.Kh. Chalkhakhyan¹, A.V. Dashkov¹, S.A. Malinin¹, G.V. Kaminsky¹, T.P. Shkurat²

¹National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14th Line St., Rostov-on-Don 344037, Russia;

²Southern Federal University; 105/42 Bolshaya Sadovaya St., Rostov-on-Don 344006, Russia

Contacts: Denis Sergeevich Kutilin *k.denees@yandex.ru*

Introduction. Gastric cancer remains a serious public health problem. Cancer-testicular antigen genes (CT-genes) in gastric cancer may be promising targets for immunotherapy due to their limited expression in normal tissues. Competing endogenous RNA networks (ceRNAs) play an important role in regulating CT-gene expression in gastric cancer. These networks are complex and require comprehensive bioinformatics and experimental study.

Aim. To conduct a bioinformatic analysis followed by validation of CT-gene expression and its regulation in malignant gastric tumors.

Materials and methods. Data for the bioinformatics stage were downloaded from GEO. Identification of differentially expressed genes was carried out using GEO2R, microRNA targeting genes – using the Random forest machine learning method. An analysis of the interaction of microRNA and long non-coding RNA (lncRNAs) was also performed. The clinical material for the experimental stage was tissues (tumor and conditionally normal) of 100 patients with a histologically confirmed diagnosis of gastric cancer. The relative expression values of 6 CT-genes (*MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6*, *MAGEH1*), as well as their targeting microRNAs and lncRNAs, were determined using real-time polymerase chain reaction.

Results. Using GEO2R, 18,617 differentially expressed loci were detected, including protein-coding genes, microRNA and lncRNAs. Of these, a change in the expression of 6 CT-genes was revealed – *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6*, *MAGEH1*, interacting with 40 microRNAs, in turn interacting with 17 lncRNAs. In the patients tumor tissue, an increase in expression of the *MAGEA10*, *MAGEA3* and *MAGEA6* genes ($p < 0.0001$), a decrease in expression of miR-1207-5p, -6858-5p, -3127-3p, -3940-3p, -6807-3p, -3085-3p, -3934-5p, -4488, -4530, -6777-3p, -99a-3p ($p < 0.0001$) and an increase in expression of miR-7113-3p, miR-874-3p, as well as an increase in expression of *LINC01089*, *AC145285.6*, *GAS5*, *AC005034.3*, *AL691447.2* ($p < 0.001$) and decreased expression of *SNHG14*, *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1* and *AL118506.1* ($p < 0.001$) was found. Based on the obtained data, a model of the regulatory network for CT-genes in gastric cancer was constructed.

Conclusion. The study showed disturbances in the CT-genes competitively interacting RNA network in gastric adenocarcinoma. The obtained data are important for understanding the fundamental mechanisms of CT-gene regulation, as well as for improving approaches to immunotherapy (new targets and regulatory molecules) and diagnostics (new molecular markers) of this disease.

Keywords: gastric cancer, gene transcriptional activity regulation, network of competitively interacting RNA, expression, non-coding RNA, molecular marker, immunotherapy target

For citation: Kutilin D.S., Kit O.I., Maksimov A.Yu. et al. Features of cancer-testicular antigen genes transcriptional activity regulation in gastric cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025; 12(3):78–99. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-78-99>

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ) остается серьезной проблемой здравоохранения, несмотря на снижение заболеваемости и смертности за последние десятилетия. Это одна из самых смертельных злокачественных опухолей, характеризующаяся низкими показателями 5-летней выживаемости. Рак желудка является 5-м по распространенности видом злокачественных новообразований в мире и основной причиной смерти от них, особенно в Азии, где регистрируют около 75 % случаев данной патологии и летальных исходов, связанных с ней [1].

Экспрессия генов при РЖ характеризуется различными паттернами, которые ассоциированы с прогрессированием опухоли, метастазами и неблагоприятным прогнозом. Такие гены, как *COL1A1*, *CDH17*, *APOC1* и *APOE*, часто сверхэкспрессируются в тканях РЖ. Эти гены связаны с инвазией опухоли, метастазами и прогрессированием заболевания [2, 3]. Гены-концентраторы *FNI*, *SPARC* и *SERPINE1* высоко экспрессируются в аденокарциноме желудка, их наличие связано с неблагоприятным прогнозом [4].

Особую группу генов при РЖ, которые вызывают интерес у исследователей в последнее время, состав-

ляют гены раково-тестикулярных антигенов (РТ-гены), кодирующие белки, обычно экспрессирующиеся в зародышевых клетках и различных видах рака, включая РЖ. Они считаются перспективными мишенями для иммунотерапии рака из-за их ограниченной экспрессии в нормальных тканях [5–8].

Например, известно, что при РЖ наблюдается высокий уровень экспрессии генов *MAGE-A1*, *MAGE-A3* и *NY-ESO-1*. При этом *MAGE-A1* и *MAGE-A3* демонстрируют значимые ассоциации с лимфатической и сосудистой инвазиями, что указывает на их потенциальную роль в прогрессии опухоли [9, 10].

Важным, по мнению ряда авторов, является изучение механизмов регуляции экспрессии РТ-генов, так как полученные при этом данные могут быть использованы в иммунотерапии опухолей [5, 6, 10]. При РЖ подобные исследования не проводились.

Большую роль в патогенезе и прогрессировании РЖ играют сети эндогенных конкурентно взаимодействующих РНК (ceRNAs), предполагающих взаимодействия между различными типами РНК, включая длинные некодирующие РНК (lncRNAs), микроРНК (miRNAs) и матричные РНК (mRNAs), которые регулируют экспрессию генов, конкурируя за общие эле-

менты ответа [11]. Сети ceRNA при РЖ сложны, включают многочисленные РНК и взаимодействия. Понимание этих сетей требует комплексного биоинформатического анализа и экспериментальной проверки [12].

Цель исследования — биоинформатический анализ с последующей валидацией экспрессии РТ-генов и ее регуляции в злокачественных опухолях желудка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоинформатический анализ данных. Сведения об экспрессии генов получены из базы данных Gene Expression Omnibus (GEO) (300 образцов РЖ и 100 образцов нормальных тканей желудка (GSE66229, GSE62254)). Дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) в опухолевых и нормальных тканях выявляли с помощью веб-сервиса GEO2R [13], позволяющего сравнить исходные таблицы обработанных данных с использованием пакетов GEOquery и limma R из проекта Bioconductor [14, 15].

Поиск miRNAs, таргетирующих гены-мишени, осуществляли с использованием метода машинного обучения Random forest (метод случайного леса), который сочетает методы бэггинга Бреймана и случайных подмножеств. Модель Random forest позволяет предсказать вероятность того, что miRNA является истинным регулятором конкретного гена [16].

Анализ взаимодействия miRNAs и lncRNAs проводили следующим образом:

- 1) из базы GEO извлекали данные HITS-CLIP, PAR-CLIP и CLASH, которые были обработаны с помощью FASTX-Toolkit v.0.0.13 и проанализированы с использованием PARalyzer v.1.1;
- 2) с помощью UCSC LiftOver Tool все координаты сайтов связывания преобразовывали в сборки hg19, mm9/mm10 и ce6/ce10. Геномные координаты консервативных сайтов-мишеней miRNA, предсказанные TargetScan, miRanda/mirSVR, PITA, Pictar и RNA22, также собирали и преобразовывали в сборки hg19, mm9/mm10 и ce6/ce10 с использованием LiftOver;
- 3) проводили сравнение полученных на шаге 2 координат с ранее описанными кластерами CLIP с использованием BEDTools [16].

Для оценки потенциала направленной деградации miRNA под действием lncRNA использовали TDMD-Score.

Пациенты. Клиническим материалом для исследования послужили ткани (опухолевые и условно нормальные) 100 пациентов в возрасте от 35 до 79 лет с гистологически подтвержденным диагнозом «рак желудка»: аденокарциномами G₁₋₂ (n = 60) и G₃ (n = 40) (табл. 1). Образцы тканей получены в процессе хирургических вмешательств, проведенных с 2013 по 2024 г. в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии (г. Ростов-на-Дону). Все пациенты, вошедшие в исследование, имели статус по шкале

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов с гистологически подтвержденной аденокарциномой желудка
Table 1. Clinical characteristics of patients with histologically confirmed of gastric adenocarcinoma

Показатель Parameter	Вся когорта Entire cohort (n = 100)	Опухоль G ₁₋₂ Tumor G ₁₋₂ (n = 60)	Опухоль G ₃ Tumor G ₃ (n = 40)
Средний возраст, лет Average, age	65 ± 3,2	68 ± 9,1	62 ± 1,4
Мужской пол, % Male sex, %	72,5	70	75
Локализация, %: Location, %:			
антральный отдел antral part	45	50	35
тело желудка body of the stomach	20	25	10
кардия/проксимальный отдел cardia/proximal part	25	15	35
тотальное поражение Total defeat	5	2	8
Стадия по классификации Tumor, Nodus and Metastasis, %: Tumor, Nodus and Metastasis stage, %:			
I (T1–2N0M0)	10	15	5
II (T1–3N1–3M0)	20	30	10
III (T2–4a/bN0–3M0)	40	35	45
IV (T ^{любая} _{any} , N ^{любая} _{any} , M1)	30	20	40
Глубина инвазии, %: Depth of invasion, %:			
T1 (ранний рак) T1 (early cancer)	10	15	5
T2 (поражение мышечного слоя) T2 (lesions in the muscle layer)	15	20	10
T3 (поражение субсерозы) T3 (lesions in the subserosa)	30	25	35
T4a (поражение серозы/висцеральной брюшины) T4a (lesions in the serosa/visceral peritoneum)	25	22	30
T4b (прорастание в соседние органы) T4b (growth into adjacent organs)	20	18	20
Гистологический тип по Lauren, %: Histological type per Lauren, %:			
кишечный intestinal	55	70	35
диффузный diffuse	33	15	50
смешанный mixed type	12	15	15

Восточной кооперативной онкологической группы (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG) от 0 до 2.

Образцы тканей до исследования хранили в жидком азоте на базе централизованного криохранилища Национального медицинского исследовательского центра онкологии. Для верификации образцов проводили стандартное патолого-морфологическое исследование с окрашиванием фиксированных срезов тканей гематоксилином и эозином. Биоптаты тканей после проведения патолого-морфологического исследования разделяли на 2 группы: опухолевые (малигнизированные) и нормальные (немалигнизированные) образцы [17].

Анализ экспрессии генов. Фрагменты ткани гомогенизировали в 300 мкл лизирующего буфера, содержащего 4 М тиоцианата гуанидина, 25 мМ цитрата натрия, 0,5 % саркозила и 0,1 М β-меркаптоэтанола. Выделение суммарной РНК из лизата тканей проводили методом фенол-хлороформной экстракции в нашей модификации: к лизату добавляли 60 мкл 2 М ацетата натрия (рН 4.0) и перемешивали; к полученной смеси добавляли 700 мкл насыщенного водой фенола и перемешивали. Для разделения водной и органической фаз добавляли 200 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта (49:1), перемешивали и инкубировали 15 мин при 4 °С; затем полученную смесь центрифугировали при 10 000g 15 мин при 2 °С, верхнюю водную фазу отбирали в новую пробирку и добавляли равный объем этанола, далее наносили смесь на колонку с фильтром из диоксида кремния (использовали колонки из набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) (РНК эффективно связывается с мембраной из диоксида кремния). Колонку дважды промывали буфером (4 М гуанидина изотиоцианата, 10 мМ трис-ацетата, 50 % этанола, 1 % 2-меркаптоэтанола) и центрифугировали, дважды промывали буфером (10 мМ трис-НСl; рН 7,5; 0,1 М NaCl; 75 % этанола) и центрифугировали при 400 g 1 мин. Для элюции РНК в ко-

лонку добавляли 120 мкл деионизированной воды с ингибитором РНКаз (1 ед. акт/мкл РНКазина) [18]. Элюат собирали центрифугированием при 400g 10 мин. Для длительного хранения препарат РНК пересаждали 80 % этиловым спиртом, помещали в криобоксы и хранили при –80 °С.

Для очистки от примесей ДНК образцы обрабатывали препаратами ДНКазы I. Концентрацию полученных препаратов РНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 с использованием набора Qubit RNA HS Assay Kit (Invitrogen, США). Для оценки качества полученного препарата РНК проводили электрофорез в 2 % агарозном геле (интенсивность полос 18S и 28S рРНК в соотношении 1:1 свидетельствовала о приемлемом для дальнейшей работы качестве РНК) [19].

Синтез комплементарной ДНК (кДНК) выполняли с использованием коммерческих наборов Reverta-L («ИнтерЛабСервис», Россия) по инструкции производителя. Концентрацию полученных препаратов кДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 с помощью набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity (HS) Assay Kit (Invitrogen, США).

Методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени определяли величины относительной экспрессии 6 РТ-генов: *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6* и *MAGEH1* (табл. 2). При выборе референсного гена использовали алгоритм, описанный Д.С. Кутилиным [20] и J. Vandesompele и соавт. [21]: рассчитывали среднее попарное изменение соотношения экспрессии между 2 генами во всех образцах (M-value) и стабильность (S-value). Чем ниже значение M-value, тем стабильнее ген. Гены ранжировали по возрастанию M-value. Ген с наименьшим значением этого показателя считали наиболее стабильным. S-value рассчитывается по формуле:

$$S\text{-value} = \ln(1/M\text{-value}).$$

Таблица 2. Последовательности праймеров для определения экспрессии генов (Primer-BLAST; дизайн de novo)

Table 2. Primer sequences for gene expression determination (Primer-BLAST; de novo design)

Ген Gene	Последовательность прямого праймера (5'→3') Forward primer sequence (5'→3')	Последовательность обратного праймера (5'→3') Reverse primer sequence (5'→3')
<i>MAGEA2</i>	CGCAGGCTCCGTGAGG	CTGTGTTGACCTGAGTCACCT
<i>MAGEA3</i>	TGAGCAACGAGCGACGG	TCAGCCTGTCCCCTCAGAA
<i>MAGEA6</i>	GGTGAGGAGGCAAGGTTCTG	TTGCAGTGCTGACTCCTCTG
<i>MAGEA10</i>	TCTGTGAGGAGGCAAGGGAG	CTTGTCAGATCCTGCGACCC
<i>MAGEA12</i>	GACGTCGGTGAGGGAAG	TGTCTCCTCAGAACCTGGATG
<i>MAGEH1</i>	GCCTCTAGCAGGAGACATGC	TGAGGCCTGGATTTTTCGAT
<i>GAPDH</i>	GTCAAGGCTGAGAACGGGAA	TCGCCCCACTTGATTTTGA
<i>B2M</i>	AGATGAGTATGCCTGCCGTG	CCATGATGCTGCTTACATGTCTC

Гены с M -value $< 0,5$ считали идеальными. В качестве референсных выбраны 2 гена: *GAPDH* (M -value = 0,047; S -value = 3,057) и *B2M* (M -value = 0,244; S -value = 1,410).

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени (в 3 технических повторах) проводили на термоблокере Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 12 нг кДНК; 0,25 мМ каждого из dNTPs; 2,5 мМ $MgCl_2$; ПЦР-буфер; 1 ед. ДНК-полимеразы *SynTaq*; краситель *EVA-Green* и по 500 нМ прямого и обратного праймеров для референсных генов или гена-мишени по следующей схеме: первичная денатурация при 95 °C в течение 3 мин; 40 циклов — 10 с при 95 °C, 25 с при 60 °C (температура подобрана экспериментальным путем с использованием температурного градиента), 30 с при 72 °C. Специфичность ПЦР контролировали с использованием анализа кривых плавления (melting curve analysis). Относительную экспрессию (RE) рассчитывали по формуле:

$$RE = E^{-\Delta\Delta C_t}$$

где E — эффективность амплификации, рассчитанная по формуле: $E = 10^{-1/k}$ (k — коэффициент из уравнения прямой $C(T) = k \cdot \lg P_0 + b$, полученного путем линейной аппроксимации экспериментальных данных ($E_{\text{среднее}} = 1,968$)).

Нормализацию результатов проводили по 2 референсным генам — *GAPDH* и *B2M* — и уровню экспрессии соответствующих генов-мишеней в образцах нормальной ткани по приведенной ниже схеме:

- 1) нормализация по среднему значению референсных генов: $\Delta C(t) = C(t)_{\text{target}} - C(t)_{\text{g-reference}}$, где $C(t)_{\text{g-reference}}$ — среднее геометрическое $C(t)$ референсных генов (изменялось в диапазоне от 18,1 до 18,9); $C(t)_{\text{target}}$ — среднее геометрическое $C(t)$ генов-мишеней (изменялось в диапазоне от 22,5 до 30,1 в зависимости от гена и типа ткани — норма или опухоль);
- 2) расчет $E^{-\Delta C(t)}$ и медианы $E^{-\Delta C(t)}$ по каждому гену для условно нормальной и опухолевой тканей каждого пациента;
- 3) нормализация по условно нормальной ткани и получение окончательного результата как кратность изменений (fold change, FC) [20] по формуле: $FC = E^{-\Delta C(t)}_{\text{медиана опухолевой ткани}} / E^{-\Delta C(t)}_{\text{медиана нормальной ткани}}$ (что тождественно $E^{-\Delta\Delta C(t)}$, или $E^{-(\Delta C(t)_{\text{медиана опухолевой ткани}} - \Delta C(t)_{\text{медиана нормальной ткани}})}$).

Оценка экспрессии miRNA и lncRNA. Зрелые miRNAs и малую ядерную РНК U6 выявляли с использованием метода, предложенного I. Balcells и соавт. [22]. Выделенную суммарную РНК использовали в реакции обратной транскрипции, которую проводили одновременно с полиаденилированием РНК, с применением специфичных RT-праймеров: 5'-CAGGTCCAGT⁽¹⁵⁾ V-3' (где вместо V могут быть нуклеотиды AA, CA, AC, CC, TC, CT, TT, AT, TA, TG, GT, GG, GC, CG, AG,

GA в зависимости от исходной последовательности miRNA). Полученную кДНК детектировали с помощью ПЦР в реальном времени.

Специфичные олигонуклеотидные праймеры определяли с использованием алгоритма, разработанного ранее [22]. К каждой miRNA подбирали несколько комплектов олигонуклеотидов, из которых выбирали те, которые характеризовались наиболее высокой эффективностью обратной транскрипции и ПЦР. Эффективность обратной транскрипции оценивали по значениям пороговых циклов (C_t), полученных при анализе синтетических аналогов miRNA и mRNA («Биосан», Россия), взятых в известной концентрации. Эффективность амплификации (E) для каждой системы оценивали с помощью калибровочной кривой, используя для анализа разведения соответствующие РНК, выделенные из клинических проб согласно описанному выше протоколу ($E = 2,0$). При анализе стабильности экспрессии для подбора референсных miRNAs применяли алгоритм, описанный выше (для референсных генов) [20]. Первоначальный список предлагаемых нормализаторов включал miR-191 (экспрессия этой miRNA была наиболее стабильной в 13 сравниваемых тканях [23]) и U6 (традиционно используется в качестве отдельного эталона для нормализации данных экспрессии miRNA). С помощью алгоритма для нормализации данных экспрессии miRNA выбран U6 (табл. 3).

Отдельно проводили реакцию обратной транскрипции miRNA в 1 повторе, в которой использовали реакционную смесь, содержащую 1× поли(А)-буфера (New England Biolabs Inc., США); 10 U/мкл обратной транскриптазы MMLV («Синтол», Россия); 0,1 мМ dNTP («Синтол», Россия); 0,1 мМ АТФ (New England Biolabs Inc., США); 1 мкМ RT-праймера; 0,5 U/мкл поли(А)-полимеразы (New England Biolabs Inc., США) и 1 мкг суммарной РНК. Реакцию проводили по следующей схеме: 15 мин при 16 °C, 15 мин при 42 °C; затем обратную транскриптазу инактивировали в течение 2 мин при 95 °C [20].

Изменение относительной экспрессии miRNA оценивали методом ПЦР в реальном времени. Амплификацию проводили в 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей 1 × ПЦР-буфера; 0,25 мМ dNTP; 2 мМ $MgCl_2$; 1 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы, по 500 нМ прямого и обратного праймеров. Количественную ПЦР с обратной транскрипцией каждого образца проводили в 3 повторах. Полученные смеси инкубировали в амплификаторе CFX 96 (Bio-Rad Lab, США) по следующей схеме: 2 мин при 94 °C, денатурация — 10 с при 95 °C, отжиг и элонгация — 20 с при 64 °C. Результаты, соответствующие $C_t > 40$, считали отрицательными.

Относительную экспрессию miRNA (RE) рассчитывали по формуле:

$$E^{-\Delta\Delta C_t} (E = 1,988).$$

Нормализацию результатов проводили по референсному локусу и уровню экспрессии соответствующих

Таблица 3. Специфические праймеры для miRNA и малой ядерной РНК U6 (дизайн de novo).

Table 3. Specific primers for miRNA and small nuclear RNA U6 (de novo design)

МикроРНК miRNA	Последовательность праймеров (5'→3') Primer sequence (5'→3')	МикроРНК miRNA	Последовательность праймеров (5'→3') Primer sequence (5'→3')
hsa-miR-1207-5p	F: GTGGCAGGGAGGCT R: CCAGTTTTTTTTTTTTTTC CCCTC	hsa-miR-4313	F: CCCCTGGCCCCA R: GTCCAGTTTTTTTTTTTTT TTGGGT
hsa-miR-5006-3p	F: GCAGTTTCCCTTTCCATCCT R: CCAGTTTTTTTTTTTTTCT GCCA	hsa-miR-4488	F: GGGGGCGGGCT R: GTTTTTTTTTTTTTTTCG CGGA
hsa-miR-6848-5p	F: TGGGGGCTGGGATG R: AGGTCCAGTTTTTTTTTTTT TACC	hsa-miR-4530	F: CCAGCAGGACGGGA R: TCCAGTTTTTTTTTTTTT TCGCT
hsa-miR-6858-5p	F: GGAGGGGCTGGCA R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TGTC	hsa-miR-4687-5p	F: GCCCTCCTCCCGCA R: GTCCAGTTTTTTTTTTTT TTGGGT
hsa-miR-3127-3p	F: AGTCCCCTTCTGCAGG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TCCA	hsa-miR-4695-5p	F: GAGGCAGTGGGCGA R: CCAGTTTTTTTTTTTTTTC CTGCT
hsa-miR-3940-3p	F: AGCCCGGATCCCAG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TAAGTG	hsa-miR-5787	F: GGGCGCGGGGA R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTACCT
hsa-miR-4463	F: GCAGGAGACTGGGGTG R: GTCCAGTTTTTTTTTTTT TTGGC	hsa-miR-6735-3p	F: CTGTGGCTCCTCCCT R: GTCCAGTTTTTTTTTTTT TTCTGA
hsa-miR-4687-3p	F: GCAGTGGCTGTTGGAG R: CCAGTTTTTTTTTTTTTG CCTG	hsa-miR-6749-3p	F: GCTCCTCCCCTGCCT R: GTTTTTTTTTTTTTTCTG GCCA
hsa-miR-4726-3p	F: AGACCCAGGTCCCTCT R: GTTTTTTTTTTTTTTGCG CCA	hsa-miR-6756-5p	F: TGGGGCTGGAGGTG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTAGC
hsa-miR-6741-3p	F: TCGGCTCTCTCCCTCA R: CCAGTTTTTTTTTTTTT TCTAGGGT	hsa-miR-6757-3p	F: GCAGAACTGGCCTTG R: CAGTTTTTTTTTTTTTTG GGATAG
hsa-miR-6807-3p	F: GCACTGCATTCTGCT R: GTTTTTTTTTTTTTTCTG GGCCA	hsa-miR-6763-3p	F: GCTCCCCGGCCTCT R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTCTG
hsa-miR-6846-5p	F: GGGCTGGATGGGGTAG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTACTC	hsa-miR-6777-3p	F: CGCAGTCCACTCTCCTG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTCTG
hsa-miR-1296-5p	F: GGCCCTGGCTCCAT R: GTCCAGTTTTTTTTTTTT GGAGA	hsa-miR-6778-5p	F: GAGTGGGAGGACAGGAG R: AGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTTACC
hsa-miR-1914-5p	F: GCCCGGCCCACTT R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTTCAGA	hsa-miR-6786-5p	F: GGTGGGGCCGGAG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTACG
hsa-miR-3085-3p	F: GCAGTCTGGCTGCTATG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTGAG	hsa-miR-6829-3p	F: CAGTGCCTCCTCCGT R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTCTGA
hsa-miR-3180-5p	F: GCAGCTTCCAGACGCT R: GTCCAGTTTTTTTTTTTT TCGAC	hsa-miR-6836-5p	F: GGCCCTGGCGCA R: TCCAGTTTTTTTTTTTTTA TGCCT
hsa-miR-3934-5p	F: GTCAGGTGTGGAACTGAG R: GTCCAGTTTTTTTTTTTT TCTGC	hsa-miR-6851-5p	F: CAGAGGAGGTGGTACTAGG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTTGCT
hsa-miR-4253	F: GCAGAGGGCATGTCCAG R: AGGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTTACC	hsa-miR-7110-3p	F: TCTCTCTCCCACTCCCT R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTTCTG

Окончание табл. 3

End of table 3

МикроРНК miRNA	Последовательность праймеров (5'→3') Primer sequence (5'→3')
hsa-miR-7113-3p	F: CTGCCCCGCTCTCT R: GGTCCAGTTTTTTTTTTT TTCTG
hsa-miR-7160-3p	F: CAGGGCCCTGGCT R: TCCAGTTTTTTTTTTT TCTGCT
hsa-miR-874-3p	F: CCTGGCCCGAGGGA R: GTCCAGTTTTTTTTTTT TTCGGT
hsa-miR-99a-3p	F: AAGCTCGCTTCTATGGGT R: GGTCCAGTTTTTTTTTTT TTTCAG
U6	F: CGGCAGCACATATACTAAAA TTGGAACGATACAGAGAAGATT AGCATGGCCCTGCGCAAGGA TGACACGCAAATTCGTGAAG R: CAGGTCCAGTTTTTTTTTT TTTTAA

Примечание. Последовательности основаны на зрелых микроРНК из miRDB.

Note. Sequences are based on mature miRNAs from miRDB.

miRNA-мишеней в образцах нормальной ткани последовательно по схеме, приведенной ниже:

1) нормализация по референсному локусу:

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{target}} - C(t)_{\text{reference}}$$

где $C(t)_{\text{reference}} - C(t)$ референсного локуса;

2) расчет $E^{-\Delta C(t)}$ и медианы $E^{-\Delta C(t)}$ по каждой miRNA для условно нормальной и опухолевой тканей каждого пациента;

3) нормализация по условно нормальной ткани и определение окончательного результата как кратность изменений по формуле:

$$FC = RE = E^{-\Delta C(t) \text{ медиана опухолевой ткани}} / E^{-\Delta C(t) \text{ медиана нормальной ткани}}$$

(что тождественно $E^{-\Delta \Delta C(t)}$,

или $E^{-(\Delta C(t) \text{ медиана опухолевой ткани} - \Delta C(t) \text{ медиана нормальной ткани})}$) [20].

Экспрессию lncRNA оценивали с использованием метода ПЦР, аналогичного примененному для анализа экспрессии мРНК. С помощью алгоритма для нормализации данных экспрессии выбран ген lncRNA *LINC00115* ($M\text{-value} = 0,096$; $S\text{-value} = 2,343$) (табл. 4).

Методы статистической обработки полученных данных. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Нормальность распределения показателей оценивали с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Для анализа различий применяли критерий Манна–Уитни для порогового уровня статистической значимости $p < 0,05$; для учета множественного сравнения — поправку Бонферрони. Связь между пе-

ременными оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биоинформатический анализ. С использованием GEO2R проанализирована дифференциальная экспрессия генов в 400 образцах тканей (300 опухолевых и 100 нормальных) больных РЖ. Обнаружены 18 617 дифференциально экспрессирующихся локусов, включая кодирующие белки гены, miRNAs и lncRNAs. Из них 9061 генетический локус статистически значимо снижал экспрессию, а 9556 локусов были гиперэкспрессированы (рис. 1).

Из ДЭГ особый интерес представляет группа так называемых РТ-генов. Так, в ходе анализа базы данных GEO выявлено изменение экспрессии 11 РТ-генов: *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6*, *MAGEH1*, *MAGEE1*, *BAGE2*, *CTAGE5*, *MAGED2* и *MAGEL2* (табл. 5).

Для локусов *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6*, *MAGEH1*, изменивших экспрессию более чем в 1,25 раза, проведен поиск таргетирующих их miRNAs. Выявлены 789 уникальных miRNAs: 270 для *MAGEA10*, 93 — для *MAGEA12*, 98 — для *MAGEA2*, 84 — для *MAGEA3*, 109 — для *MAGEA6* и 135 — для *MAGEH1*. Наиболее стабильным взаимодействием с целевой мРНК (оценивалось по свободной энергии взаимодействия, не более $-26,0$) обладала 201 miRNA: 73 — для *MAGEA10*, 27 — для *MAGEA12*, 20 — для *MAGEA2*, 31 — для *MAGEA3*, 33 — для *MAGEA6* и 17 — для *MAGEH1*.

Среди выявленных 40 miRNAs таргетируют несколько рассматриваемых локусов (рис. 2, табл. 6). Для 4 из них установлена возможность взаимодействия с 90 lncRNAs. При этом ncRNA *KCNQ1OT1* способна взаимодействовать с 3 miRNAs (hsa-miR-3940-3p, -1296-5p и -874-3p), *AC109460.3* и *AC131212.3* — с 2 miRNAs (hsa-miR-3940-3p и hsa-miR-874-3p), *MIR29B2CHG* и *XIST* — с 2 miRNAs (hsa-miR-6807-3p и hsa-miR-1296-5p), *NEAT1* и *SNHG29* — с 2 miRNAs (hsa-miR-6807-3p и hsa-miR-874-3p) (рис. 3).

Для оценки потенциала направленной деградации miRNA под действием lncRNA используют TDMDScore. По этому показателю финальный список lncRNAs был следующим: для hsa-miR-3940-3p — *KCNQ1OT1*, *LINC01089* и *AC145285.6*, для hsa-miR-6807-3p — *GAS5*, *AC005034.3*, *AC104447.1*, *AL691447.2* и *AC024580.1*, для hsa-miR-1296-5p — *AL355075.4*, *AC069281.2*, *SNHG14* и *SNHG15*, для hsa-miR-874-3p — *AC040162.3*, *MIRLET7BHG*, *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1* и *AL118506.1*.

Экспериментальная валидация данных биоинформатического анализа. На основе данных биоинформатического анализа выбран фрагмент потенциально существующей регуляторной сети конкурентно взаимодействующих РНК для валидации на образцах 100 пациентов со злокачественными опухолями желудка.

Таблица 4. Последовательности праймеров для определения экспрессии длинных некодирующих РНК (дизайн de novo)**Table 4.** Primer sequences for determining the expression of long non-coding RNAs (de novo design)

Ген Gene	Последовательность праймеров (5'→3') Primer sequence (5'→3')	Длина ампликона (п. н.) Amplicon length (bp)
<i>KCNQ10T1</i>	F: GTCTGCTGGCTTGTGTGTTG R: GGCTACGACCACAGGTGAAA	106
<i>LINC01089</i>	F: AGAGGCCAACAGATGAGGGA R: GTTGGGTAGGCAAAAAGGCG	98
<i>AC145285.6</i>	F: GCCTGCACTGTGCTAGAGTA R: GTTTCCCCTCCTGTGTGCTC	146
<i>GAS5</i>	F: AAGCCCCTGGAGGAAAGTCT R: CCCTTTAGCCAGTTCCTCCTC	76
<i>AC005034.3</i>	F: TACTCCACCATGTTGCTCAAGT R: CATCGGCACATAGGAGCCTTC	198
<i>SNHG14</i>	F: TGAAGCTCAGGCCTTTCTCTG R: ATACCGGTCAATGCCAAGTG	91
<i>SNHG15</i>	F: GGCAGTCTAGTCATCCACCG R: AGGAACTGGCAGCTAACACG	106
<i>SLC9A3-AS1</i>	F: GCGGGGATCTGGGGTTTCTC R: TCCGAAGGCTGACTAGCCG	148
<i>MIRLET7BHG</i>	F: GTCCAGACGAGCAGACACTG R: GGACGGGGCCACATTTATCT	129
<i>AL118506.1</i>	F: TGATGGGTGCACAAAGGGTT R: ATCATGGGTGGGAAAGCTGG	115
<i>LINC00115</i>	F: CCTGTAACAACCCTCGTGCT R: ATCCACAGCGAGGCAATGAA	132

Примечание. Праймеры подобраны на основе базы данных NCBI и программы Primer-BLAST, использован de novo дизайн с валидацией in silico.

Note. Primers were selected on public databases (NCBI and program Primer-BLAST), de novo design with in silico validation was used.

В этот фрагмент вошли 6 РТ-генов (*MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6*, *MAGEH1*), 40 miRNAs (hsa-miR-1207-5p, -5006-3p, -6848-5p, -6858-5p, -3127-3p, -3940-3p, -4463, -4687-3p, -4726-3p, -6741-3p, -6807-3p, -6846-5p, -1296-5p, -1914-5p, -3085-3p, -3180-5p, -3934-5p, -4253, -4313, -4488, -4530, -4687-5p, -4695-5p, -5787, -6735-3p, -6749-3p, -6756-5p, -6757-3p, -6763-3p, -6777-3p, -6778-5p, -6786-5p, -6829-3p, -6836-5p, -6851-5p, -7110-3p, -7113-3p, -7160-3p, -874-3p и -99a-3p) и 17 lncRNAs (*KCNQ10T1*, *LINC01089*, *AC145285.6*, *GAS5*, *AC005034.3*, *AC104447.1*, *AL691447.2*, *AC024580.1*, *AL355075.4*, *AC069281.2*, *SNHG14*, *SNHG15*, *AC040162.3*, *MIRLET7BHG*, *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1*, *AL118506.1*).

На рис. 4 представлены результаты анализа экспрессии 6 РТ-генов (*MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6* и *MAGEH1*).

Обнаружено статистически значимое увеличение экспрессии генов *MAGEA10*, *MAGEA3* и *MAGEA6* в 2,74; 2,54 и 3,57 раза соответственно в опухолевой ткани относительно нормальной ($p < 0,0001$).

С учетом того, что изменение экспрессии выявлено только для 3 генетических локусов, панель для валидации miRNA была сокращена до 32 miRNAs, таргетирующих эти локусы (рис. 5).

Обнаружено статистически значимое снижение уровней экспрессии hsa-miR-1207-5p (в 1,72 раза), -6858-5p (в 2,7 раза), -3127-3p (в 1,96 раза), -3940-3p (в 7,14 раза), -6807-3p (в 4,76 раза), -3085-3p (в 1,75 раза), -3934-5p (в 2,86 раза), -4488 (в 3,45 раза), -4530 (в 2,04 раза), -6777-3p (в 1,82 раза), -99a-3p (в 2,33 раза) ($p < 0,0001$), а также статистически значимое повышение уровней экспрессии hsa-miR-7113-3p (в 1,78 раза) и hsa-miR-874-3p (в 2,04 раза) в опухолевой ткани относительно нормальной ткани ($p < 0,0001$) (см. рис. 5).

Для 4 miRNAs установлено взаимодействие с 17 lncRNAs с высоким индексом TDMDScore. Результаты анализа экспрессии 17 lncRNAs представлены на рис. 6.

В опухолевой ткани обнаружено статистически значимое повышение уровней экспрессии *LINC01089* (в 3,72 раза), *AC145285.6* (в 2,14 раза), *GAS5* (в 1,95 раза),

Таблица 5. Дифференциально экспрессирующиеся гены раково-тестикулярных антигенов при раке желудка (результаты биоинформатического анализа)

Table 5. Differentially expressed cancer-testicular antigen genes in gastric cancer (results of bioinformatics analysis)

Ген Gene	Полное название гена Full name of the gene	FC, раз FC, times	logFC	p-value
<i>MAGEA10</i>	Член семейства генов <i>MAGE A10</i> <i>MAGE family member A10</i>	1,339*	0,421	0,00000000053700
<i>MAGEA2</i>	Член семейства генов <i>MAGE A2</i> <i>MAGE family member A2</i>	1,444*	0,530	0,00000000015300
<i>MAGEA12</i>	Член семейства генов <i>MAGE A12</i> <i>MAGE family member A12</i>	1,503*	0,589	0,00000000012700
<i>MAGEA3</i>	Член семейства генов <i>MAGE A3</i> <i>MAGE family member A3</i>	1,751*	0,808	0,00000000000513
<i>MAGEA6</i>	Член семейства генов <i>MAGE A6</i> <i>MAGE family member A6</i>	1,765*	0,819	0,00000000000316
<i>MAGEH1</i>	Член семейства генов <i>MAGE H1</i> <i>MAGE family member H1</i>	0,794 (1,259)*	−0,332	0,00000000000000
<i>MAGEE1</i>	Член семейства генов <i>MAGE E1</i> <i>MAGE family member E1</i>	0,838 (1,193)** ($x = 0,838$)	−0,255	0,00000000000000
<i>BAGE2</i>	Член семейства антигенов меланомы B2 B melanoma antigen family member 2	0,935 (1,069)**	−0,096	0,00001050000000
<i>CTAGE5</i>	Член семейства генов <i>CTAGE 5</i> <i>CTAGE family member 5</i>	0,946 (1,057)**	−0,080	0,00068700000000
<i>MAGED2</i>	Член семейства генов <i>MAGE D2</i> <i>MAGE family member D2</i>	0,954 (1,048)**	−0,068	0,00007640000000
<i>MAGEL2</i>	Член семейства генов <i>MAGE L2</i> <i>MAGE family member L2</i>	0,977 (1,023)**	−0,033	0,01590000000000

*Изменение экспрессии более чем в 1,25 раза. **Отношение $1/x$, где x — значение перед скобками.

Примечание. FC — кратность изменений; logFC — логарифмическое значение FC.

*Expression change more than 1.25 times fold change. **Ratio $1/x$, where x is the value before the parentheses.

Note. FC — fold change; logFC — logarithmic value of FC.

AC005034.3 (в 2,24 раза) и *AL691447.2* (в 3,18 раза) ($p < 0,001$), а также статистически значимое снижение уровней экспрессии *SNHG14* (в 1,85 раза), *AC002101.1* (в 3,70 раза), *SLC9A3-AS1* (в 2,04 раза) и *AL118506.1* (в 9,09 раза) ($p < 0,001$) относительно нормальной ткани (см. рис. 6).

На основании полученных данных построена модель регуляторной сети для РТ-генов при РЖ (рис. 7).

Согласно модели увеличение уровня экспрессии lncRNAs отрицательно коррелирует со снижением уровня экспрессии miRNAs ($r = -0,678...-0,851$), что в свою очередь отрицательно коррелирует с увеличением экспрессии РТ-генов ($r = -0,584...-0,912$). Важно отметить, что снижение уровня экспрессии lncRNAs *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1* и *AL118506.1* отрицательно коррелирует с повышением уровня экспрессии hsa-miR-7113-3p и hsa-miR-874-3p ($r = -0,678...-0,851$), а их экспрессия положительно коррелирует ($r = 0,590-0,916$) с увеличением экспрессии РТ-генов *MAGEA3*

и *MAGEA6*. Экспрессия *MAGEH1* в опухолевой ткани была такой же, как и в нормальной ткани, экспрессия таргетирующей *MAGEH1* hsa-miR-874-3p повышена ($r = -0,087$), экспрессия hsa-miR-1296-5p не изменена ($r = 0,119$) (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментальной части проведенного исследования проанализирована экспрессия 6 РТ-генов в опухолевой и нормальной тканях у 100 пациентов с аденокарциномой желудка. Однако статистически значимые различия в уровнях экспрессии в опухолевой и нормальной тканях выявлены только для 3 генов — *MAGEA10*, *MAGEA3* и *MAGEA6*: наблюдалось значительное повышение их экспрессии.

Семейство генов *MAGE* человека (хромосома Xq28, 12 генов) кодирует ядерные белки, большинство которых экспрессируются в опухолевых клетках. В нормальных клетках они либо не экспрессируются, либо

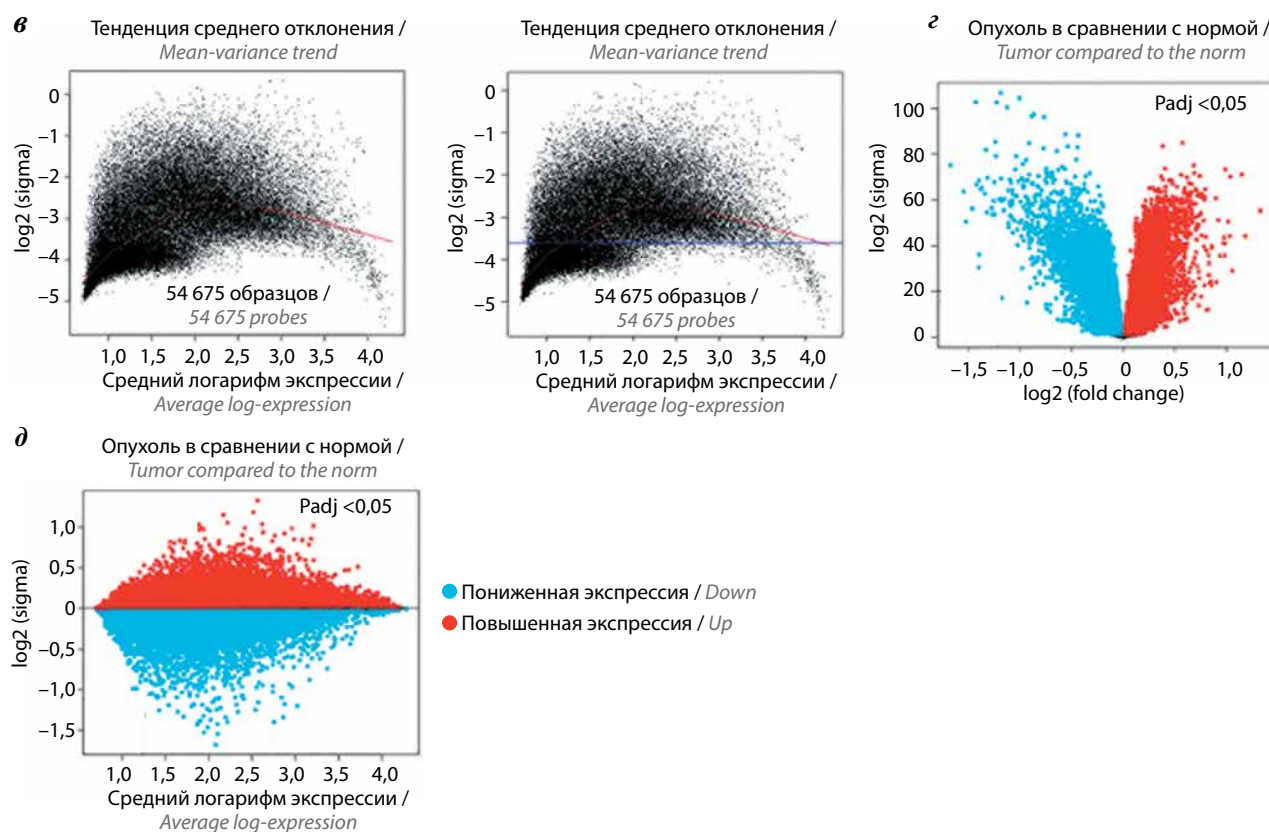


Рис. 1. (Окончание). в – тенденция среднего отклонения (сгенерировано с использованием R limma (plotSA, vooma)); з – вулканограмма (сгенерировано с использованием limma), отображающая статистическую значимость (значение $-\log_{10}P$) в зависимости от величины логарифмического кратного изменения; д – график средней разности (MD), отображающий логарифмическое изменение по сравнению со средними значениями экспрессии $\log_2$ (сгенерировано с использованием limma (plotMD))

Fig. 1. (End). в – mean variance trend (generated using R limma (plotSA, vooma)); з – volcano plot (generated using limma) showing statistical significance (value $-\log_{10}P$) depending on the value of logarithmic fold change; д – mean difference (MD) plot showing logarithmic change compared to mean values of $\log_2$ expression (generated using limma (plotMD))

	MAGEA12 (n = 27)	MAGEA2 (n = 20)	MAGEA3 (n = 31)	MAGEA6 (n = 33)	MAGEH1 (n = 17)
MAGEA10 (n = 73)	5 (0,0526)	2 (0,0220)	3 (0,0297)	5 (0,0495)	2 (0,0227)
MAGEA12 (n = 27)		11 (0,3056)	8 (0,1600)	9 (0,1765)	0 (0,0000)
MAGEA2 (n = 20)			7 (0,1591)	6 (0,1277)	0 (0,0000)
MAGEA3 (n = 31)				15 (0,3061)	1 (0,0213)
MAGEA6 (n = 33)					2 (0,0417)

0 Индекс Жаккара/Jaccard index 1

Рис. 2. Парные пересечения по микроРНК разных генов-мишеней раково-тестикулярных антигенов. Приведены число совпадений и индекс Жаккара (в скобках)

Fig. 2. Paired intersections of microRNAs of different cancer-testicular antigen target genes. Number of matches and Jaccard index (in brackets) are presented

экспрессируются в минимальной степени, за исключением зародышевых клеток яичек и плаценты [24, 25]. Поскольку зародышевые клетки лишены поверхностных молекул HLA класса I, предполагается, что ответы специфических цитотоксических Т-лимфоцитов CD8⁺ (CTL) на антигены, кодируемые генами MAGE, строго опухолеспецифичны при разных видах рака, иными словами, они являются раковыми антигенами [26]. Молекулы MAGE в раковых клетках могут подвергаться протеасомно-опосредованному протеолизу, а раз-

рушенные пептиды – транспортироваться на поверхность клетки с помощью белка, связывающего антиген. Эти эпитопы могут быть представлены HLA-аллелями цитотоксических Т-лимфоцитов (клетки CD8⁺-CTL), а активированные CTL затем способны высвободить гранзимы и перфорины, чтобы убить соответствующие опухолевые клетки посредством апоптоза или действия гранулина [27]. Благодаря своим характеристикам это семейство генов в последние годы представляет большой интерес для разработки противо-

Таблица 6. Общие микроРНК для разных генов-мишеней раково-тестикулярных антигенов

Table 6. Common microRNAs for different cancer-testicular antigen target genes

МикроРНК miRNA	Количество таргетируемых локусов Number of target loci	Гены, с матричными РНК которых взаимодействуют микроРНК Genes whose mRNAs interact with miRNAs
hsa-miR-1207-5p	4	MAGEA10, MAGEA12, MAGEA2, MAGEA6
hsa-miR-5006-3p	4	MAGEA12, MAGEA2, MAGEA3, MAGEA6
hsa-miR-6848-5p	4	MAGEA12, MAGEA2, MAGEA3, MAGEA6
hsa-miR-6858-5p	4	MAGEA10, MAGEA12, MAGEA3, MAGEA6
hsa-miR-3127-3p	3	MAGEA2, MAGEA3, MAGEA6
hsa-miR-3940-3p	3	MAGEA12, MAGEA3, MAGEA6
hsa-miR-4463	3	MAGEA10, MAGEA12, MAGEA6
hsa-miR-4687-3p	3	MAGEA2, MAGEA3, MAGEA6
hsa-miR-4726-3p	3	MAGEA2, MAGEA3, MAGEA6
hsa-miR-6741-3p	3	MAGEA12, MAGEA2, MAGEA3
hsa-miR-6807-3p	3	MAGEA10, MAGEA12, MAGEA3
hsa-miR-6846-5p	3	MAGEA10, MAGEA12, MAGEA2
hsa-miR-1296-5p	2	MAGEA6, MAGEH1
hsa-miR-1914-5p	2	MAGEA12, MAGEA3
hsa-miR-3085-3p	2	MAGEA12, MAGEA6
hsa-miR-3180-5p	2	MAGEA12, MAGEA2
hsa-miR-3934-5p	2	MAGEA3, MAGEA6
hsa-miR-4253	2	MAGEA3, MAGEA6
hsa-miR-4313	2	MAGEA10, MAGEA6
hsa-miR-4488	2	MAGEA3, MAGEA6
hsa-miR-4530	2	MAGEA3, MAGEA6
hsa-miR-4687-5p	2	MAGEA12, MAGEA2
hsa-miR-4695-5p	2	MAGEA10, MAGEA6
hsa-miR-5787	2	MAGEA12, MAGEA2
hsa-miR-6735-3p	2	MAGEA6, MAGEH1
hsa-miR-6749-3p	2	MAGEA10, MAGEH1
hsa-miR-6756-5p	2	MAGEA12, MAGEA2
hsa-miR-6757-3p	2	MAGEA12, MAGEA3
hsa-miR-6763-3p	2	MAGEA10, MAGEH1
hsa-miR-6777-3p	2	MAGEA10, MAGEA3
hsa-miR-6778-5p	2	MAGEA3, MAGEA6
hsa-miR-6786-5p	2	MAGEA12, MAGEA2
hsa-miR-6829-3p	2	MAGEA12, MAGEA2
hsa-miR-6836-5p	2	MAGEA12, MAGEA6
hsa-miR-6851-5p	2	MAGEA3, MAGEA6
hsa-miR-7110-3p	2	MAGEA12, MAGEA6
hsa-miR-7113-3p	2	MAGEA3, MAGEA6
hsa-miR-7160-3p	2	MAGEA2, MAGEA3
hsa-miR-874-3p	2	MAGEA3, MAGEH1
hsa-miR-99a-3p	2	MAGEA3, MAGEA6

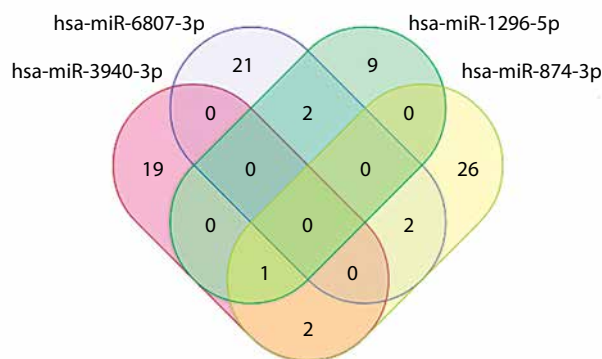


Рис. 3. Общие длинные некодирующие РНК для 4 микроРНК

Fig. 3. Common long non-coding RNAs for 4 microRNAs

раковых препаратов и иммунотерапии [28]. В настоящее время механизмы участия генов семейства *MAGE* при многих заболеваниях, таких как меланома, рак пищевода, РЖ, неясны [29].

MAGEA10 (CT1.10, *MAGE10*, *MGC10599*) является членом семейства генов *MAGEA*. Этот РТ-ген представляет собой привлекательную мишень для иммунотерапии рака [30]. Высокий уровень экспрессии *MAGEA10* наблюдается у больных немелкоклеточным раком легкого [27]. Информация о молекулярной структуре белка и его взаимодействиях, экспрессии гена *MAGEA10* в различных опухолях, визуализация и локализация его экспрессии представлены на рис. 8, созданном на основе данных The Human Protein Atlas [31]. Продemonстрировано, что *MAGEA10* значительно

экспрессирован в опухолевой ткани желудка (что соответствует нашим данным), легкого, кожи, мозга, мочевого пузыря, предстательной железы и др. Высокий уровень экспрессии этого РТ-гена в различных опухолях может свидетельствовать как о схожих молекулярных механизмах, регулирующих его экспрессию, так и о том, что этот показатель можно использовать в качестве маркера онкологического процесса и универсальной мишени для иммунотерапии.

Еще одним членом семейства *MAGE* является меланома-ассоциированный антиген 3 (*MAGEA3*). Функция *MAGEA3* в нормальных клетках неизвестна. Присутствие антигена на опухолевых клетках связано с худшим прогнозом. Так, высокий уровень экспрессии *MAGEA3* при аденокарциноме ассоциирован с более низкими показателями выживаемости пациентов [32]. *MAGEA3* – опухолеспецифический белок, который обнаружен во многих опухолях, включая меланому, немелкоклеточный рак легкого, гематологические злокачественные новообразования и рак молочной железы [7]. Пептиды *MAGEA3* рассматриваются как наиболее привлекательные эпитопы; вакцины, содержащие эти пептиды, находятся на стадии разработки [33]. С 2008 г. GlaxoSmithKline создает вакцину против рака, нацеленную на *MAGEA3* [34].

Результаты исследования X. Gao и соавт., посвященного определению роли *MAGEA3* при раке шейки матки, показали, что его сверхэкспрессия значительно способствует пролиферации клеток *in vitro* и *in vivo*, увеличивает долю клеток в S-фазе клеточного цикла и подавляет апоптоз. Кроме того, обнаружено,

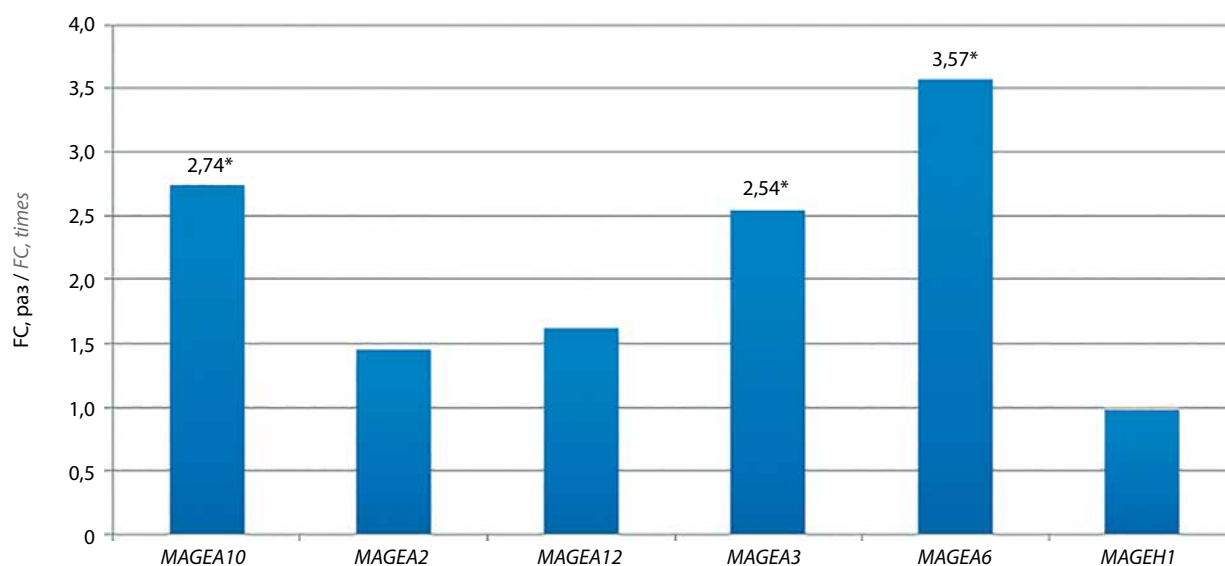


Рис. 4. Изменение уровней экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6* и *MAGEH1* в опухолевой ткани желудка относительно нормальной ткани (представлены отношение уровня экспрессии в опухолевой ткани к уровню экспрессии в нормальной ткани, кратность изменений (FC)). *Различия между опухолевыми и нормальными образцами ткани статистически значимы ($p < 0.0001$)

Fig. 4. Changes in expression levels of cancer/testis antigen genes *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6* and *MAGEH1* in gastric tumor tissue compared to normal tissue (ratio between expression in tumor tissue and expression in normal tissue, fold change (FC) are presented). *Differences between tumor and normal samples are statistically significant ($p < 0.0001$)

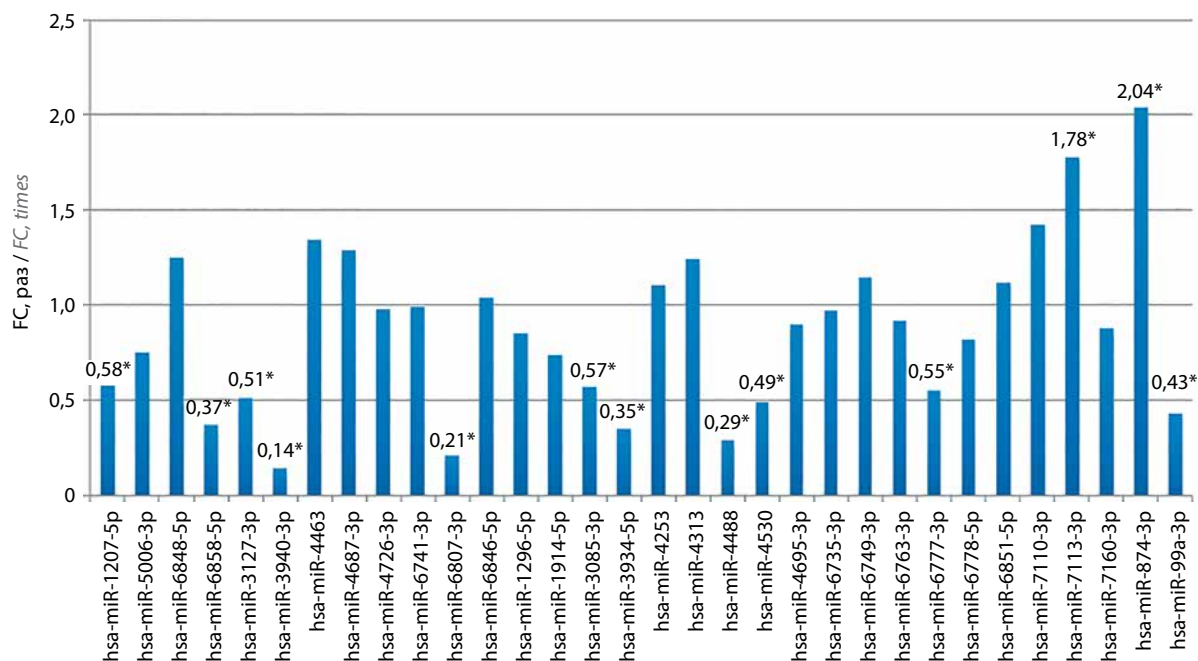


Рис. 5. Изменение уровней экспрессии 32 микроРНК, таргетирующих гены раково-тестикулярных антигенов MAGEA10, MAGEA3 и MAGEA6, в опухолевой ткани желудка относительно нормальной ткани (представлены отношение уровня экспрессии в опухолевой ткани к уровню экспрессии в нормальной ткани, кратность изменений (FC)). *Различия между опухолевыми и нормальными образцами ткани статистически значимы ($p < 0,0001$)

Fig. 5. Changes in expression of 32 microRNAs targeting genes of cancer/testis antigens MAGEA10, MAGEA3 and MAGEA6 in gastric tumor tissue compared to normal tissue (ratio between expression in tumor tissue and expression in normal tissue, fold change (FC) are presented). *Differences between tumor and normal samples are statistically significant ($p < 0.0001$)

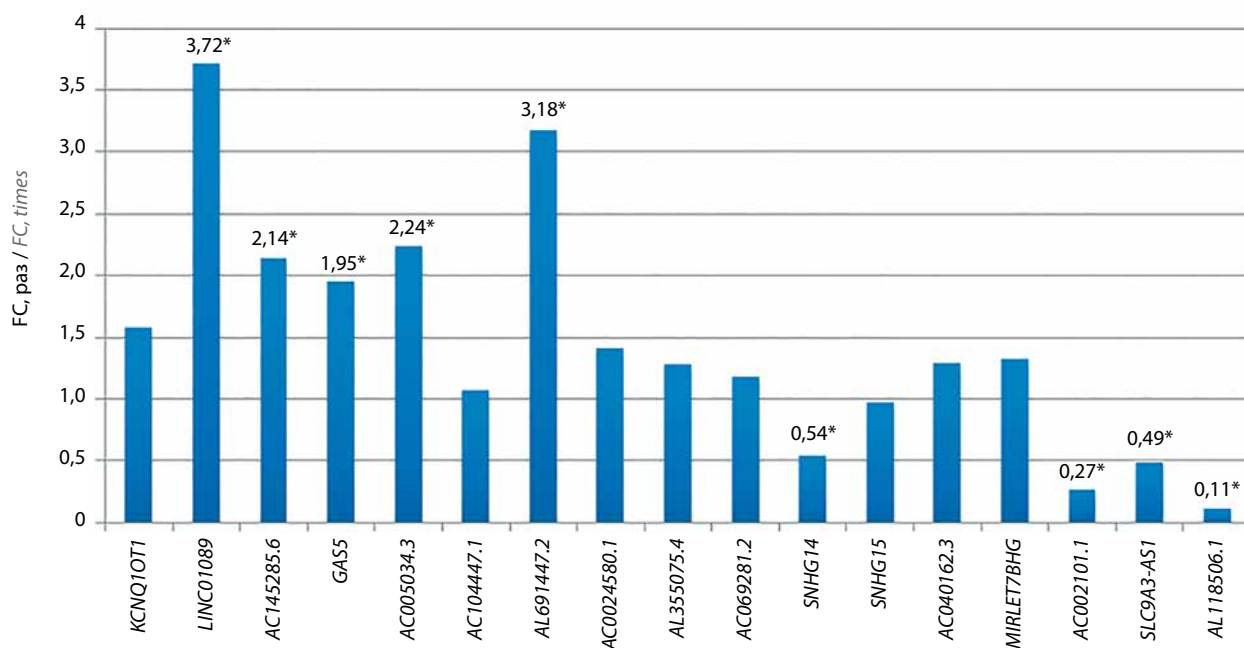


Рис. 6. Изменение уровней экспрессии 17 длинных некодирующих РНК, взаимодействующих с микроРНК hsa-miR-3940-3p, -6807-3p, -1296-5p и -874-3p, в опухолевой ткани желудка относительно нормальной ткани (представлены отношение уровня экспрессии в опухолевой ткани к уровню экспрессии нормальной ткани, кратность изменений (FC)). *Различия между опухолевыми и нормальными образцами ткани статистически значимы ($p < 0,0001$)

Fig. 6. Changes in expression of 17 long non-coding RNAs interacting with microRNAs hsa-miR-3940-3p, -6807-3p, -1296-5p and -874-3p in gastric tumor tissue compared to normal tissue (ratio between expression in tumor tissue and expression in normal tissue, fold change (FC) are presented). *Differences between tumor and normal samples are statistically significant ($p < 0.0001$)

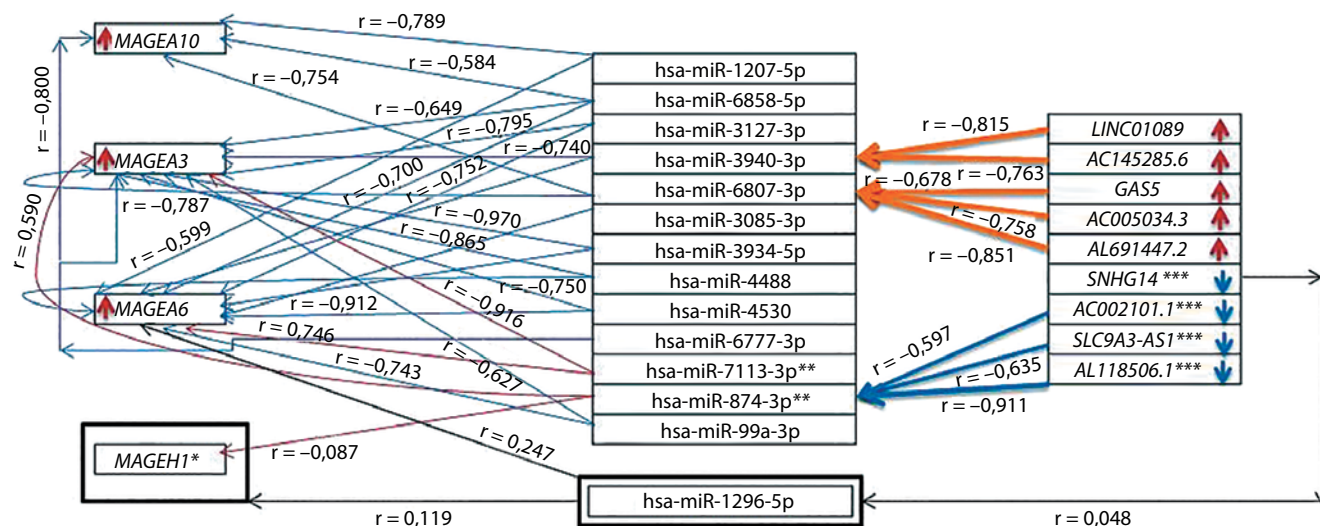


Рис. 7. Модель регуляторной сети для генов раково-тестикулярных антигенов при раке желудка. *Экспрессия такая же, как в нормальной ткани. **Экспрессия микроРНК выше, чем в нормальной ткани. ***Экспрессия длинной некодирующей РНК ниже, чем в нормальной ткани
Fig. 7. Model of cancer-testicular antigen genes regulatory network in gastric cancer. *Same expression as in normal tissue. **microRNA expression is higher than in normal tissue. ***Expression of long non-coding RNA is lower than in normal tissue

что снижение уровня экспрессии *MAGEA3* подавляет пролиферацию клеток HeLa, блокирует прогрессирование клеточного цикла в фазе G1 и вызывает апоптоз клеток. Результаты исследования механизма действия *MAGEA3* на клеточный цикл продемонстрировали, что *MAGEA3* взаимодействует с белком, связанным с доменом KRAB (KAP1), для ингибирования транскрипционной активности p53, что ингибирует экспрессию генов, ассоциированных с клеточным циклом, который опосредован p53 (p21 и Cyclin D1) и апоптозом (Bax, Bcl-2 и компонентом связывания Bcl-2).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что *MAGEA3* способствует пролиферации опухолевых клеток шейки матки и росту новообразования, играет онкогенную роль и регулирует сигнальный путь KAP1/p53 [35].

На рис. 9 представлена информация об экспрессии *MAGEA3* в различных опухолях (по данным проекта «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA)). Так же, как и в случае с *MAGEA10*, экспрессия *MAGEA3* повышается в различных опухолях.

Меланома-ассоциированный антиген A6 (*MAGEA6*) обладает онкогенной активностью, но механизмы, с помощью которых он регулирует прогрессию опухоли и химиорезистентность, неизвестны [36]. Все члены семейства *MAGE* кодируют белки, которые имеют сильное сходство друг с другом. Например, *MAGEA6* и *MAGEA3* характеризуются самой высокой гомологией (98 %). При этом в тканях рака шейки матки наблюдается отрицательная корреляция экспрессии *MAGEA6* и *MAGEA3* с клинической стадией [35]. Но эти 2 представителя семейства *MAGE*, тем не менее, могут служить биомаркерами для прогнозирования *in situ* ранних предраковых поражений [29]. В нашем исследовании

уровень экспрессии гена *MAGEA6* был в 1,4 раза выше уровня экспрессии *MAGEA3*; различия статистически незначимы.

MAGEA6 экспрессируется и в ряде других опухолей человека, таких как глиома и рак пищевода. Показано, что этот ген гиперэкспрессирован при раке молочной железы и связан с устойчивостью к терапии, поскольку подавление его экспрессии повышает химиочувствительность к доксорубину *in vitro* и *in vivo*. Нокдаун *MAGEA6* снижает убиквитинирование AMPK α 1, что повышает концентрацию AMPK α 1 и p-AMPK α в клетках рака молочной железы. Данные, полученные Н. Zhu и соавт., свидетельствуют о том, что воздействие на *MAGEA6* может повысить химиочувствительность при раке молочной железы посредством активации аутофагии и ферроптоза (AMPK α 1-зависимая аутофагия и AMPK α 1/SLC7A11-индуцированный ферроптоз) [37].

Очевидно, что влияние *MAGEA6* на аутофагию обеспечивает потенциальный механизм его онкогенных эффектов. Так, в исследовании Y.H. Tsang и G.B. Mills впервые изучена роль *MAGEA6* в регуляции аутофагии при аденокарциноме протоков поджелудочной железы. В соответствии со способностью этого гена ингибировать аутофагию при других типах рака экспрессия дикого типа *MAGEA6* в моделях клеток рака поджелудочной железы уменьшает базальную сигнализацию аутофагии, на что указывает снижение фосфорилирования AMPK и повышение фосфорилирования RPS6KB/S6K [38].

Сверхэкспрессия *MAGEA6* достаточна для трансформации незлокачественных эпителиальных клеток поджелудочной железы человека и индуцирует рост ксенотрансплантированной опухоли *in vivo*, вероятно,

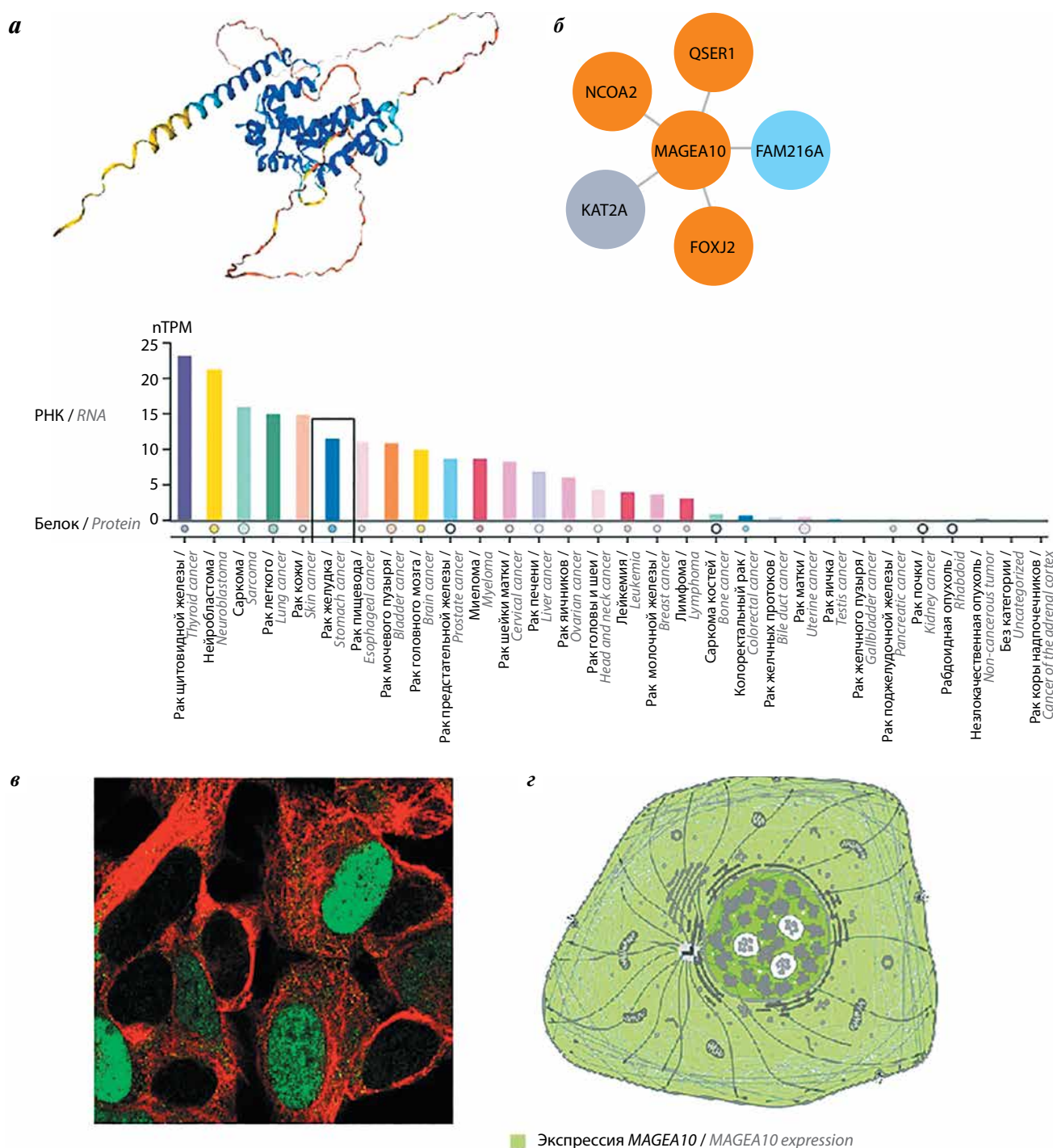


Рис. 8. Молекулярная структура белка MAGEA10 и его взаимодействия (а), экспрессия гена MAGEA10 в различных опухолях (б), визуализация (в) и локализация его экспрессии (г) (по данным Human Protein Atlas; <https://www.proteinatlas.org/>). nTPM – количество транскриптов на миллион
Fig. 8. Molecular structure of MAGEA10 protein and its interactions (a), expression of MAGEA10 gene in different tumors (б), visualization (в) and location of its expression (г) (per Human Protein Atlas; <https://www.proteinatlas.org/>). nTPM – transcripts per million

вызванный способностью MAGEA6 ограничивать аутофагию. Данные, полученные Y.H. Tsang и G.B. Mills, свидетельствуют о том, что MAGEA6 действует как координатор аутофагии, обеспечивая переход от низкого уровня активности аутофагии к высокому во время инициации и прогрессии опухоли. Высокая экспрессия MAGEA6 играет большую роль в инициации забо-

левания, когда низкая активность аутофагии является допустимой, тогда как во время прогрессирования заболевания MAGEA6 деградирует из-за спонтанных мутаций в гене и метаболического стресса, что приводит к высокой активности аутофагии. В соответствии с этой концепцией высокий уровень экспрессии MAGEA6 ассоциируется только с худшими показателя-

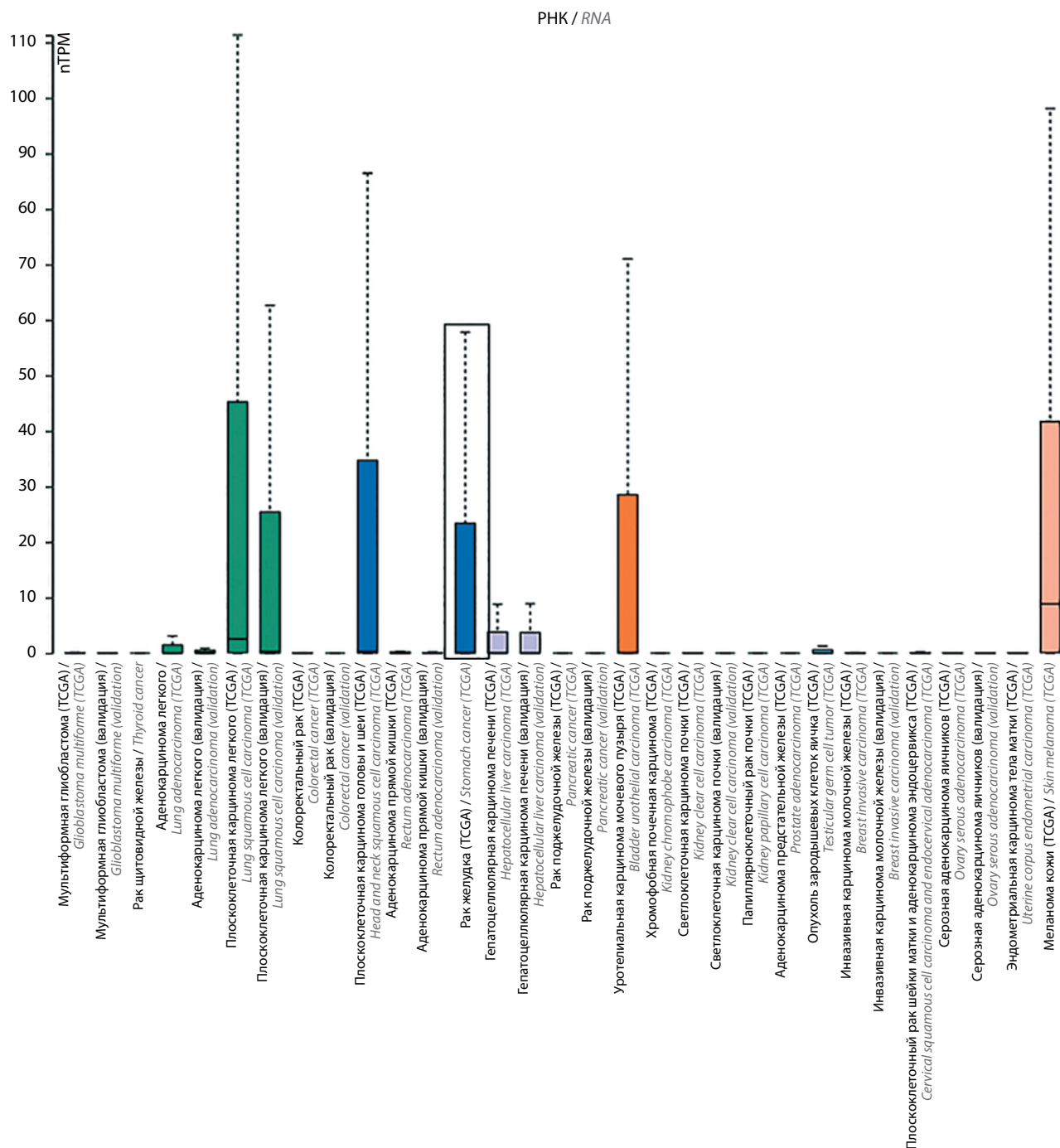


Рис. 9. Экспрессия *MAGEA3* в различных опухолях (по данным проекта «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA)). nTPM — количество транскриптов на миллион

Fig. 9. *MAGEA3* expression in different tumors (according to the project The Cancer Genome Atlas, TCGA). nTPM — transcripts per million

ми выживаемости [38]. Эти результаты могут помочь в разработке иммунотерапевтических стратегий воздействия на антигены *MAGEA* при злокачественных новообразованиях и позволяют понять роль *MAGEA6* в процессе возникновения и прогрессирования рака поджелудочной железы [39].

S.A. Shukla и соавт. выявили отрицательную связь между активаторами аутофагии и экспрессией белков *MAGEA* при меланоме [40]. *MAGEA3* и *MAGEA6* по-

давливали аутофагию в моделях рака легкого и колоректального рака [41].

Также *MAGEA6* опосредует выживание клеток глиомы человека, воздействуя на 5'AMP-активируемую протеинкиназу (AMPK) $\alpha 1$. Результаты исследования С.Т. Pineda и Р.Р. Potts показали, что комплекс *MAGEA6*/KAP1 представляет собой раковоспецифическую убиквитинлигазу, которая разрушает AMPK $\alpha 1$ в клетках глиомы человека и раковых клетках желудка.

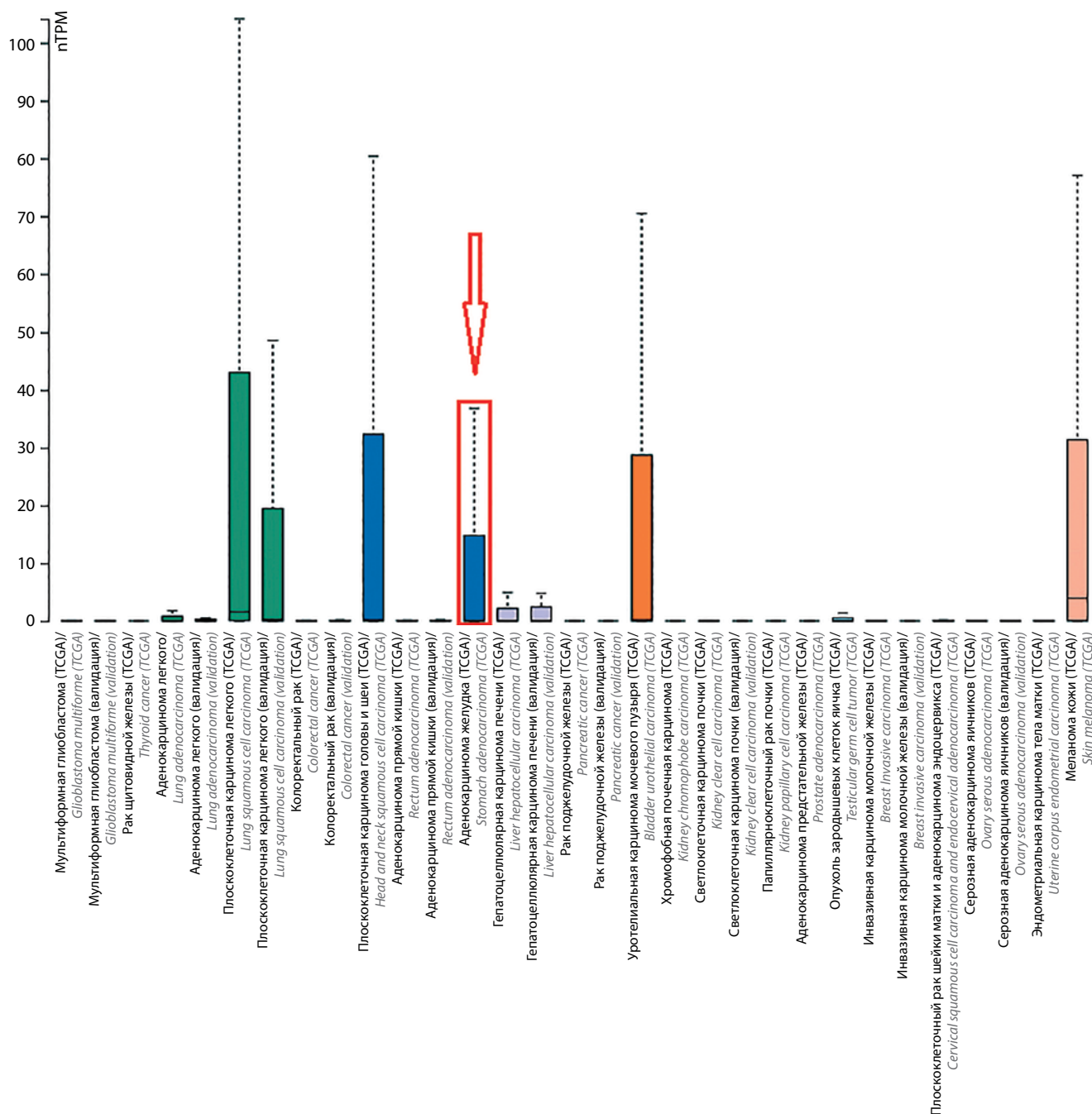


Рис. 10. Экспрессия *MAGEA6* в различных опухолях (по данным проекта «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA)). nTPM — количество транскриптов на миллион

Fig. 10. *MAGEA6* expression in different tumors (according to the project The Cancer Genome Atlas, TCGA). nTPM — transcripts per million

Кроме того, подавление экспрессии *MAGEA6* останавливало рост опухолей, трансплантированных мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом, и пролиферацию первичных клеток глиомы человека *in vivo* [42].

В исследовании S.A. Shukla и соавт. оценивался уровень экспрессии *MAGEA6* в клетках плоскоклеточного рака пищевода и тканях аденокарциномы пищевода. Полученные данные показали, что *MAGEA6* высоко экспрессируется при развитии плоскоклеточного

рака пищевода и, следовательно, может служить новым биомаркером для диагностики или лечения данной патологии [40]. По данным других авторов, совместная экспрессия РТ-антигенов *MAGE-A6* и *MAGE-A11* при раке мочевого пузыря связана с агрессивностью опухоли [43].

Хотя повышенные уровни экспрессии *MAGEA6* обнаружены в различных типах опухолей, по-прежнему недостаточно информации о функции этого гена и связанных с ним сигнальных путях регуляции генов.

Так, изучено влияние *MAGEA6* на инвазию, миграцию и пролиферацию клеток. Секвенирование транскриптома было проведено на клеточной линии Hsa109, которая обычно экспрессировала *MAGEA6*. Выявлено, что высокая экспрессия данного гена оказывает значительное стимулирующее влияние на пролиферацию клеток, а также существенно усиливает инвазию и миграцию клеток. Результаты транскриптомного анализа показали, что 14 ДЭГ и 13 основных регуляторных генов тесно связаны с экспрессией *MAGEA6*, например ген метилстеролмонооксигеназы 1 (*MSMO1*). При этом *MAGEA6* положительно регулировал экспрессию *MSMO1*, которая играет большую онкогенную роль в клетках [28].

Особенности экспрессии *MAGEA6* в различных опухолях на основании данных проекта TCGA представлены на рис. 10.

Согласно данным литературы и результатам нашего исследования, важным механизмом регуляции экспрессии РТ-генов может быть изменение экспрессии miRNAs и lncRNAs. С помощью биоинформатических подходов выявлена сложная сеть потенциальных взаимодействий РТ-генов *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6* и *MAGEH1* с 789 уникальными miRNAs.

МикроРНК — это короткие некодирующие РНК, эпигенетически регулирующие экспрессию генов путем взаимодействия с комплементарными нуклеотидными последовательностями мРНК-мишеней, приводящего к их деградации и ингибированию трансляции в белки [44]. Они вносят значительный вклад в инициацию и развитие различных молекулярных событий, включая инициацию онкогенеза, прогрессирование и метастазирование [45].

Экспериментально нами подтверждено изменение экспрессии в опухолевой ткани желудка 13 miRNAs, таргетирующих мРНК *MAGEA10*, *MAGEA3* и *MAGEA6*: уровни транскриптов hsa-miR-1207-5p, -6858-5p, -3127-3p, -3940-3p, -6807-3p, -3085-3p, -3934-5p, -4488, -4530, -6777-3p, -99a-3p были понижены, а hsa-miR-7113-3p и hsa-miR-874-3p — повышены. Снижение уровней экспрессии hsa-miR-1207-5p, -6858-5p, -3127-3p, -3940-3p, -6807-3p, -3085-3p, -3934-5p, -4488, -4530, -6777-3p и hsa-miR-99a-3p, очевидно, препятствует деградации мРНК РТ-генов, обеспечивая высокий уровень их экспрессии.

Схожий механизм регуляции показан Д.С. Кутиным для колоректального рака: регуляция экспрессии РТ-генов в опухолях толстой кишки реализуется с помощью разных молекулярных механизмов, включающих изменения в экспрессии hsa-miR-143-3p, -26a-5p, -25-3p, -92a-3p, -21-5p и hsa-let-7i-5p [20].

МикроРНК могут взаимодействовать с lncRNAs, что, в свою очередь, также обеспечивает регуляцию экспрессии генов-мишеней. Длинные некодирующие РНК (lncRNAs) — это РНК размером более 200 нуклеотидов, регулирующие биологическую активность

клеток различными способами, включая транскрипционную, посттранскрипционную регуляцию и регуляцию трансляции. Они могут контролировать посттранскрипционную регуляцию, являясь компонентом сети ceRNAs и выступая в качестве молекулярной губки (сорбента) miRNAs [44, 46].

Так, в нашем исследовании с помощью методов биоинформатики выявлено взаимодействие hsa-miR-3940-3p с *KCNQ1OT1*, *LINC01089* и *AC145285.6*, hsa-miR-6807-3p — с *GAS5*, *AC005034.3*, *AC104447.1*, *AL691447.2* и *AC024580.1*, hsa-miR-1296-5p — с *AL355075.4*, *AC069281.2*, *SNHG14* и *SNHG15*, hsa-miR-874-3p — с *AC040162.3*, *MIRLET7BHG*, *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1* и *AL118506.1*. Экспериментально подтверждено увеличение экспрессии *LINC01089*, *AC145285.6*, *GAS5*, *AC005034.3* и *AL691447.2*, а также снижение экспрессии *SNHG14*, *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1* и *AL118506.1* в опухолевой ткани относительно нормальной.

Таким образом, собрана необходимая информация по всем компонентам регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих эндогенных РНК, включая lncRNAs, miRNAs и мРНК.

Комплексный анализ представленных выше данных позволил нам разработать модель регуляторной сети для РТ-генов при РЖ (см. рис. 7). Увеличение представленности транскриптов lncRNAs *LINC01089*, *AC145285.6*, *GAS5*, *AC005034.3* и *AL691447.2* приводит к повышению эффективности взаимодействия lncRNAs и miRNAs (hsa-miR-3940-3p и hsa-miR-6807-3p). Образование комплекса lncRNA—miRNA приводит к уменьшению количества свободных miRNAs и к снижению их взаимодействия с генами-мишенями (*MAGEA3*, *MAGEA6*, *MAGEA10*). Противоположный эффект наблюдается при снижении представленности транскриптов lncRNAs *SNHG14*, *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1* и *AL118506.1*, что вызывает снижение эффективности взаимодействия lncRNAs и таргетирующих их miRNAs (hsa-miR-1296-5p и hsa-miR-874-3p). Нарушение образования комплекса lncRNA—miRNA приводит к увеличению количества свободной miRNA hsa-miR-874-3p и ее эффективному взаимодействию с генами-мишенями (*MAGEH1* и *MAGEA3*). При этом представленность транскриптов *MAGEH1* не изменяется, а *MAGEA3*, вероятно, в большей степени регулируется другими miRNAs.

Представленная модель включает лишь фрагмент регуляторной системы РТ-генов при РЖ, а именно сети конкурентно-взаимодействующих РНК. Необходимо учитывать и другие механизмы регуляции, такие как изменение копийности генов и их метилирование, которые уже описаны в наших работах [17, 20] и которым будут посвящены дальнейшие исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования выявлено нарушение в сети конкурентно-взаимодействующих РНК РТ-генов при аденокарциноме желудка, выражающееся в измене-

нии транскрипционной активности генов *MAGEA10*, *MAGEA3* и *MAGEA6*, miRNAs hsa-miR-1207-5p, -6858-5p, -3127-3p, -3940-3p, -6807-3p, -3085-3p, -3934-5p, -4488, -4530, -6777-3p, -99a-3p, -7113-3p и -874-3p, а также lncRNAs *LINC01089*, *AC145285.6*, *GAS5*, *AC005034.3*, *AL691447.2* *SNHG14*, *AC002101.1* и *SLC9A3-AS1* в опухо-

левой ткани. Полученные данные имеют большое значение для понимания фундаментальных механизмов регуляции РТ-генов и совершенствования подходов к иммунотерапии (новые мишени и регуляторные молекулы) и диагностике (новые молекулярные маркеры) РЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ilic M., Ilic I. Epidemiology of stomach cancer. *World J Gastroenterol* 2022;28(12):1187–203. DOI: 10.3748/wjg.v28.i12.1187
- Sun H., Wang Y., Wang S. et al. The involvement of collagen family genes in tumor enlargement of gastric cancer. *Sci Rep* 2023;13(1):100. DOI: 10.1038/s41598-022-25061-0
- Oue N., Hamai Y., Mitani Y. et al. Gene expression profile of gastric carcinoma: identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis, and carcinogenesis by serial analysis of gene expression. *Cancer Res* 2004;64(7):2397–405. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-3514
- Li L., Zhu Z., Zhao Y. et al. FN1, SPARC, and SERPINE1 are highly expressed and significantly related to a poor prognosis of gastric adenocarcinoma revealed by microarray and bioinformatics. *Sci Rep* 2019;9(1):7827. DOI: 10.1038/s41598-019-43924-x
- Takahashi Y., Fukuyama T., Futawatari N. et al. Expression of kita-kyushu lung cancer antigen-1 as detected by a novel monoclonal antibody in gastric cancer. *Anticancer Res* 2019;39(11):6259–63. DOI: 10.21873/anticancer.13835
- Кутилин Д.С., Могушкова Х.А. Влияние противоопухолевых антибиотиков антрациклинового ряда на транскрипционную активность раково-тестикулярных антигенов в модельном эксперименте на клеточной линии HeLa. *Медицинская иммунология* 2019;21(3):539–46. Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A. Effect of anthracycline antitumor antibiotics upon transcription activity of cancer-testis antigens in model experiments with HeLa cells. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology* 2019;21(3):539–46. (In Russ.).
- Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Могушкова Х.А., Кит О.И. Транскрипционный профиль раковотестикулярных антигенов у больных раком молочной железы. *Медицинская иммунология* 2018;20(3):383–90. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-383-390 Vodolazhskiy D.I., Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A., Kit O.I. Transcriptional profile of cancer-testicular antigens in patients with breast cancer. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology* 2018;20(3):383–90. (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-383-390
- Кутилин Д.С., Кит О.И. Зависимость выживаемости и метастазирования у больных колоректальным раком от транскрипционной активности РТ-генов. *Сибирский онкологический журнал* 2022;21(1):37–46. DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-1-37-46 Kutilin D.S., Kit O.I. Relationship between the transcriptional activity of CT-genes and survival in colorectal cancer patients. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2022;21(1):37–46. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-1-37-46
- Futawatari N., Fukuyama T., Yamamura R. et al. Early gastric cancer frequently has high expression of KK-LC-1, a cancer-testis antigen. *World J Gastroenterol* 2017;23(46):8200–6. DOI: 10.3748/wjg.v23.i46.8200
- Chen Y., Panarelli N., Piotti K., Yantiss R. Cancer-testis antigen expression in digestive tract carcinomas: frequent expression in esophageal squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Cancer Immunol Res* 2013;2(5):480–6. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0124
- Guo L., Song C., Wang P. et al. Competing endogenous RNA networks and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2015;21(41):11680–7. DOI: 10.3748/wjg.v21.i41.11680
- Wu H.J., Dai W.-W., Wang L.-B. et al. Comprehensive analysis of the molecular mechanism for gastric cancer based on competitive endogenous RNA network. *World J Traditional Chinese Med* 2023;9(1):29–42. DOI: 10.4103/2311-8571.355010
- Кит О.И., Енгибарян М.А., Гварамия А.К. и др. Генетические и эпигенетические предикторы чувствительности плоскоклеточного рака языка к препаратам платины. *Вестник Российской академии медицинских наук* 2024;79(6):490–506. DOI: 10.15690/vramn2337 Kit O.I., Engibaryan M.A., Gvaramiya A.K. et al. Genetic and epigenetic predictors of tongue squamous cell carcinoma sensitivity to platinum drugs. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences* 2024;79(6):490–506. (In Russ.). DOI: 10.15690/vramn2337
- Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15(12):550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Davis S., Meltzer P.S. GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics* 2007;23(14):1846–7. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm254
- Kutilin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G., Kit O.I. Regulatory network of competitively interacting RNAs and effectiveness of rectal tumors radiotherapy. *Klin Onkol* 2022;35(4):297–306. DOI: 10.48095/ccko2022297
- Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Гудуева Е.Н. Изменение копийности генетических локусов при раке желудка. *Молекулярная биология* 2015;49(4):658–66. DOI: 10.7868/S0026898415040096 Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S., Gudueva E.N. Changes in the number of copies of genetic loci in gastric cancer. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2015;49(4):658–66. (In Russ.). DOI: 10.7868/S0026898415040096
- Кутилин Д.С., Димитриади С.Н., Водолажский Д.И. и др. Влияние тепловой ишемии-реперфузии на экспрессию апоптоз-регулирующих генов в почечной ткани больных с почечно-клеточным раком. *Нефрология* 2017;21(1):80–6. DOI: 10.24884/1561-6274-2017-21-1-80-86 Kutilin D.S., Dimitriadi S.N., Vodolazhsky D.I. et al. The effect of thermal ischemia-reperfusion on the expression of apoptosis-regulating genes in the renal tissue of patients with renal cell carcinoma. *Nefrologiya = Nephrology* 2017;21(1):80–6. (In Russ.). DOI: 10.24884/1561-6274-2017-21-1-80-86
- Кутилин Д.С., Никитин И.С., Кит О.И. Особенности экспрессии генов некоторых транскрипционных факторов при малигнизации тканей тела матки. *Успехи*

- молекулярной онкологии 2019;6(1):57–62.
DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-57-62
- Kutulin D.S., Nikitin I.S., Kit O.I. Features of some transcription factors gene expression in the malignancy tissues of the corpus uteri. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(1):57–62. (In Russ.).
DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-57-62
20. Кутилин Д.С. Регуляция экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов у больных колоректальным раком. Молекулярная биология 2020;54(4):580–95.
DOI: 10.31857/S0026898420040096
Kutulin D.S. Regulation of gene expression of testicular cancer antigens in patients with colorectal cancer. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2020;54(4):580–95 (In Russ.).
DOI: 10.31857/S0026898420040096
21. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3(7):RESEARCH0034.
DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
22. Balcells I., Cirera S., Busk P.K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnology* 2011;11:70. DOI: 10.1186/1472-6750-11-70
23. Peltier H.J., Latham G.J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 2008;14(5):844–52. DOI: 10.1261/rna.939908
24. Valmori D., Dutoit V., Rubio-Godoy V. et al. Frequent cytolytic T-cell responses to peptide MAGE-A10 (254–262) in melanoma. *Cancer Res* 2001;61(2):509–12.
25. Gevorkyan Y.A., Kutulin D.S., Kit O.I. et al. Copy number variation and expression of CT-genes in patients with colorectal cancer. Available at: <https://www.asco.org/abstracts-presentations/ABSTRACT295213>
26. Batchu R.B., Gruzdyn O., Potti R.B. et al. MAGE-A3 with cell-penetrating domain as an efficient therapeutic cancer vaccine. *Jama Surg* 2014;149(5):451–7. DOI: 10.1001/jamasurg.2013.4113
27. Wang L., Xu Y., Luo C. et al. MAGEA10 gene expression in non-small cell lung cancer and A549 cells, and the affinity of epitopes with the complex of HLA-A(*)0201 alleles. *Cell Immunol* 2015;297(1):10–8. DOI: 10.1016/j.cellimm.2015.05.004
28. Liu M., Li J., Wang Y. et al. MAGEA6 positively regulates MSMO1 and promotes the migration and invasion of oesophageal cancer cells. *Exp Ther Med* 2022;23(3):204.
DOI: 10.3892/etm.2022.11127
29. Kuldkepp A., Karakai M., Toomsoo E. et al. Cancer-testis antigens MAGEA proteins are incorporated into extracellular vesicles released by cells. *Oncotarget* 2019;10(38):3694–708.
DOI: 10.18632/oncotarget.26979
30. Kuldkepp A., Karakai M., Toomsoo E. et al. Cancer-testis antigens MAGEA proteins are incorporated into extracellular vesicles released by cells. *Oncotarget* 2019;10(38):3694–708.
DOI: 10.18632/oncotarget.26979
31. The Human Protein Atlas. Available at: <https://www.proteinatlas.org/>
32. Decoster L., Wauters I., Vansteenkiste J.F. Vaccination therapy for non-small-cell lung cancer: review of agents in phase III development. *Ann Oncol* 2011;23(6):1387–93.
DOI: 10.1093/annonc/mdr564
33. Peled N., Oton A.B., Hirsch F.R., Bunn P. MAGE A3 antigen-specific cancer immunotherapeutic. *Immunotherapy* 2009;1(1):19–251. DOI: 10.2217/1750743X.1.1.19
34. Use of MAGE A3-protein D fusion antigen in immunotherapy combined with surgery, chemotherapy or radiotherapy for the treatment of cancer. (Patent US20100008980 – 2008-01-08). Retrieved 2012-10-16.
35. Gao X., Li Q., Chen G. et al. MAGEA3 promotes proliferation and suppresses apoptosis in cervical cancer cells by inhibiting the KAP1/p53 signaling pathway. *Am J Transl Res* 2020;12(7):3596–612.
36. Pan S.J., Ren J., Jiang H. et al. MAGEA6 promotes human glioma cell survival via targeting AMPK α 1. *Cancer Lett* 2018;412:21–9. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.09.051
37. Zhu H., Jiang Cw., Zhang Wl. et al. Targeting oncogenic MAGEA6 sensitizes triple negative breast cancer to doxorubicin through its autophagy and ferroptosis by stabilizing AMPK α 1. *Cell Death Discov* 2024;10(1):430. DOI: 10.1038/s41420-024-02196-9
38. Tsang Y.H., Mills G.B. The roles of MAGEA6 variants in pancreatic cancer development and their potential impact on cancer immunotherapy. *Autophagy* 2020;16(10):1923–4.
DOI: 10.1080/15548627.2020.1802091
39. Tsang Y.H., Wang Y., Kong K. et al. Differential expression of MAGEA6 toggles autophagy to promote pancreatic cancer progression. *Elife* 2020;9:e48963. DOI: 10.7554/eLife.48963
40. Shukla S.A., Bachireddy P., Schilling B. et al. Cancer-germline antigen expression discriminates clinical outcome to CTLA-4 blockade. *Cell* 2018;173(3):624–33.e8.
DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.026
41. Pineda C.T., Ramanathan S., Fon Tacer K. et al. Degradation of AMPK by a cancer-specific ubiquitin ligase. *Cell* 2015;160(4):715–28. DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.034
42. Pineda C.T., Potts P.R. Oncogenic MAGEA-TRIM28 ubiquitin ligase downregulates autophagy by ubiquitinating and degrading AMPK in cancer. *Autophagy* 2015;11(5):844–6.
DOI: 10.1080/15548627.2015.1034420
43. Mohsenzadegan M., Razmi M., Vafaei S. et al. Co-expression of cancer-testis antigens of MAGE-A6 and MAGE-A11 is associated with tumor aggressiveness in patients with bladder cancer. *Sci Rep* 2022;12(1):599. DOI: 10.1038/s41598-021-04510-2
44. Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г. и др. Нарушения в регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих РНК и радиорезистентность опухолей прямой кишки. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований* 2021;11:12–29. DOI: 10.17513/mjpf.13306
Kutulin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G. et al. Disorders in the regulatory network of competitively interacting RNAs and radioresistance of rectal tumors. *Mezhdunarodny zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research* 2021;11:12–29. (In Russ.).
DOI: 10.17513/mjpf.13306
45. Abdelsattar Z.M., Wong S.L., Regenbogen S.E. et al. Colorectal cancer outcomes and treatment patterns in patients too young for average-risk screening. *Cancer* 2016;122(6):929–34.
DOI: 10.1002/cncr.29716
46. Cao C., Zhang T., Zhang D. et al. The long noncoding RNA, SNHG6-003, functions as a competing endogenous RNA to promote the progression of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2017;36(8):1112. DOI: 10.1038/onc.2016.278

Вклад авторов

Д.С. Кутилин: разработка концепции и дизайна исследования, написание текста статьи, биоинформатический анализ данных, выполнение ключевых этапов молекулярных исследований;

О.И. Кит: анализ клинических данных, написание текста статьи;

А.Ю. Максимов: анализ клинических и экспериментальных данных, редактирование;

Л.Х. Чалхакян: сбор клинических данных, получение биологического материала и его первичная обработка, статистический анализ экспериментальных данных;

А.В. Дашков: анализ клинических, экспериментальных данных и данных литературы, получение биологического материала и его первичная обработка;

С.А. Малинин, Г.В. Каминский: получение биологического материала, ведение базы данных пациентов, выделение нуклеиновых кислот из биологического материала;

Т.П. Шкурят: разработка концепции и дизайна исследования, редактирование.

Authors' contributions

D.S. Kutilin: development of the research concept and design, article writing, bioinformatic data analysis, implementation of key stages of molecular research;

O.I. Kit: analysis of clinical data, article writing;

A.Yu. Maksimov: analysis of clinical and experimental data, editing;

L.H. Chalkhakhyan: collection of clinical data, obtaining biological material and its primary processing, statistical analysis of experimental data;

A.V. Dashkov: analysis of clinical, experimental and literature data, obtaining biological material and its primary processing;

S.A. Malinin, G.V. Kaminsky: obtaining biological material, maintaining a patient database, isolating nucleic acids from biological material;

T.P. Shkurat: development of the research concept and design, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.С. Кутилин / D.S. Kutilin: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>

О.И. Кит / O.I. Kit: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>

А.Ю. Максимов / A.Yu. Maksimov: <https://orcid.org/0000-0002-9471-3903>

А.В. Дашков / A.V. Dashkov: <https://orcid.org/0000-0002-3867-4532>

С.А. Малинин / S.A. Malinin: <https://orcid.org/0000-0002-1220-7143>

Т.П. Шкурят / T.P. Shkurat: <https://orcid.org/0000-0001-6197-7374>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки в рамках исследовательского проекта Д.С. Кутилина «Молекулярные особенности спорадических форм злокачественных новообразований: фундаментальные и прикладные аспекты».

Funding. The work was performed without external funding within the framework of D.S. Kutilin's research project "Molecular features of sporadic forms of malignant neoplasms: fundamental and applied aspects".

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский центр онкологии» Минздрава России (протокол № 5 от 14.02.2014).

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 5 dated 14.02.2014).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-100-115>

Экспериментальное тестирование химиорезистентности опухолевых клеток рака яичников

К.А. Кузин¹, Т.И. Фетисов^{1,2}, О.А. Власова¹, Р.И. Князев^{1,3}, Е.Е. Антошина¹, Л.С. Труханова¹, Т.Г. Горькова¹, Г.А. Белицкий¹, М.Г. Якубовская^{1,2}, К.И. Кирсанов^{1,2}

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

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 123995 Москва, ул. Баррикадная, 2/1

Контакты: Константин Александрович Кузин kuzin_konstantin@mail.ru

Одной из наиболее сложных проблем в лечении больных раком яичников является высокий уровень химиорезистентности опухолевых клеток, что обуславливает раннее развитие рецидива заболевания и низкие показатели общей выживаемости. В случае химиорезистентности терапия оказывается неэффективной, вызывает неоправданный расход лекарственных препаратов, наносит ущерб пациенту из-за развития побочных токсических эффектов и временных потерь на ее проведение. Одним из подходов к решению этой проблемы является экспериментальное предиктивное тестирование химиорезистентности опухолевых клеток *in vitro*.

Цель исследования – разработка протокола экспериментального тестирования химиорезистентности клеток рака яичников к химиотерапевтическим препаратам.

Мы проанализировали изменение количества жизнеспособных клеток линий A-1847, Ovar-3 и Ovar-4 при их культивировании в гипoadгезионных условиях и оптимизировали метод определения жизнеспособности клеток по метаболиту резазурина. Выявлено, что жизнеспособность клеток рака яичников исследуемых линий в присутствии препаратов 1-й и 2-й линий противоопухолевой терапии, измеренная в соответствии с разработанным протоколом культивирования в гипoadгезионных условиях с использованием набора ATP-tumor chemosensitivity assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия), одобренного для применения в клинической практике в Германии, находится примерно на одном уровне. Разработанная методика основана на использовании доступных и недорогих реагентов и расходных материалов, что делает ее экономически привлекательной.

Ключевые слова: рак яичников, резистентность, тест на индивидуальную резистентность к химиотерапии, линии опухолевых клеток рака яичников, резазуриновый тест на жизнеспособность клеток

Для цитирования: Кузин К.А., Фетисов Т.И., Власова О.А. и др. Экспериментальное тестирование химиорезистентности опухолевых клеток рака яичников. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(3):100–115.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-100-115>

Experimental testing of chemoresistance of ovarian cancer tumor cells

K.A. Kuzin¹, T.I. Fetisov^{1,2}, O.A. Vlasova¹, R.I. Knyazev^{1,3}, E.E. Antoshina¹, L.S. Trukhanova¹, T.G. Gor'kova¹, G.A. Belitsky¹, M.G. Yakubovskaya^{1,2}, K.I. Kirsanov^{1,2}

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

²Peoples' Friendship University of Russia; Universtiy; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

³Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; 2/1 Barricadnaya St., 123995 Moscow, Russia

Contacts: Konstantin Alexandrovich Kuzin kuzin_konstantin@mail.ru

One of the most challenging issues in the treatment of ovarian cancer is the high level of tumor cell chemoresistance, which leads to early tumor recurrence and low overall survival. In the case of tumor cell chemoresistance, the therapy is ineffective, resulting in unnecessary drug consumption and harm to the patient due to toxic side effects and time losses

during its implementation. One approach to solving this problem is experimental predictive testing of tumor cell chemoresistance *in vitro*.

Aim. To develop a protocol of experimental testing of chemoresistance of ovarian cancer cells to chemotherapy drugs. We analyzed changes in the number of viable cells of A-1847, Ovar-3 and Ovar-4 cell lines cultured in hypo-adhesive conditions and optimized a method of cell viability determination based on resazurin metabolism. It was shown that viability of ovarian cancer cells of the studied cell lines is approximately the same in the presence of 1st and 2nd line antitumor drugs measured in accordance with the developed culture protocol in hypo-adhesive conditions and using ATP-tumor chemosensitivity assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Germany) approved for use in clinical practice. The developed method is based on readily available and inexpensive reagents and expendables which makes it economically attractive.

Keywords: ovarian cancer, resistance, individual resistance to chemotherapy test, ovarian cancer cell lines, resazurin cell viability assay

For citation: Kuzin K.A., Fetisov T.I., Vlasova O.A. et al. Experimental testing of chemoresistance of ovarian cancer tumor cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(3):100–15. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-100-115>

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные эпителиальные опухоли яичников — гетерогенная группа новообразований, занимающая одно из ведущих мест в структуре онкологической заболеваемости и смертности [1]. Общая 5-летняя выживаемость при данной патологии составляет около 50 % [2].

Современные подходы к лечению больных с вновь выявленным раком яичников (РЯ) включают циторедуктивное хирургическое вмешательство, как правило в сочетании с платиносодержащей химиотерапией (ХТ) [3, 4]. Рецидив заболевания после первичного лечения развивается у 70–80 % пациенток [5]. Тактика лечения больных с рецидивами зависит от времени, прошедшего от момента окончания курса ХТ 1-й линии до возникновения рецидива. Как правило, повторно назначают ХТ. При этом у 10–40 % пациенток с вновь выявленным РЯ платиносодержащая ХТ изначально неэффективна [6, 7]. В случае развития рецидива РЯ эффективность терапии не превышает 66 % [8].

В соответствии с современными клиническими рекомендациями эффективность лекарственного лечения злокачественных опухолей оценивают по результатам объективного обследования пациента после проведения ХТ [9]. На сегодняшний день предложен ряд методик, позволяющих предсказывать результаты лечения до его начала на основании данных молекулярно-генетических анализов или экспериментального тестирования резистентности/чувствительности клеток опухоли к лекарственному препарату [10–12].

Первоначально экспериментальные предиктивные тесты были направлены на определение индивидуальной чувствительности опухолевых клеток к цитостатикам с целью выбора наиболее эффективного препарата для ХТ, однако оказалось, что выявление резистентности опухоли имеет более высокую прогностическую значимость, чем чувствительности [13]. Это связывают с гетерогенностью опухоли и возможностью существования резистентного клона опухолевых

клеток вне взятого для анализа образца опухолевой ткани, а также с влиянием на метаболизм противоопухолевого препарата микроокружения и в целом организма.

Возможность использования экспериментального тестирования при выборе препаратов для проведения 2-й и 3-й линий ХТ при РЯ в настоящее время остается предметом активных научных изысканий [14]. Целесообразность подобных исследований обусловлена неэффективным расходом дорогостоящих противоопухолевых препаратов в случае химиорезистентности опухолевых клеток и неоправданным ущербом, наносимым организму пациента высокотоксичными цитостатиками при наличии изначальной резистентности опухоли к ним.

Наиболее распространенный подход к экспериментальному определению резистентности клеток опухоли пациента к химиотерапевтическому препарату основан на использовании так называемых CSR-тестов (Chemotherapy Sensitivity and Resistance assays). Существует множество различных видов CSR-тестов, и в ряде стран некоторые из них используют в клинической практике для предиктивного определения резистентности опухолевых клеток к препарату [8, 15, 16]. В частности, в Германии для определения химиорезистентности клеток РЯ в клинической практике используют набор ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия) [17]. В Российской Федерации в настоящее время наборы для экспериментального определения резистентности опухолевых клеток конкретного пациента к химиопрепаратам не зарегистрированы.

С учетом вышеизложенного разработка новых экспериментальных методик определения резистентности клеток опухоли у пациентов с РЯ является актуальной задачей.

Цель исследования — разработка экспериментальной методики определения резистентности опухолевых клеток РЯ к химиотерапевтическим препаратам.

Для решения этой цели поставлены следующие задачи:

- 1) выбрать гипoadгезионные условия культивирования клеток РЯ, способствующих формированию сфероидов;
- 2) определить изменение количества жизнеспособных клеток РЯ в течение первых 6 дней культивирования в гипoadгезионных условиях;
- 3) определить оптимальные условия выполнения теста на жизнеспособность клеток по метаболизму резазурина;
- 4) сравнить результаты определения резистентности клеток линий РЯ, получаемых с использованием разработанной методики и набора АТР-ТСА;
- 5) проанализировать дозовые зависимости к химиопрепаратам при использовании разработанного протокола тестирования в отношении опухолевых клеток пациенток с РЯ, получавших лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опухолевые клетки. В исследовании использовали линии клеток РЯ А-1847, Оvsar-3 и Оvsar-4, предоставленные профессором Р.Г. Киямовой (Казанский (Приволжский) федеральный университет), а также первичные культуры клеток, полученные из образцов опухолевой ткани и асцитической жидкости пациенток с серозной аденокарциномой яичников III–IV стадии, получавших лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина.

Культивирование клеток в стандартных условиях. Клетки культивировали во флаконах 75 см² (Eppendorf, Германия) в среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л («ПанЭко», Россия), добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (10 %) (Biosera, Франция), смеси антибиотиков пенициллина (50 ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) («ПанЭко», Россия), L-глутамина (2 мМ) («ПанЭко», Россия) в стандартных условиях (37 °С, 5 % СО₂). Пассирование клеток проводили по достижении ими уровня конfluence 80–90 %.

Культивирование клеток в гипoadгезионных условиях. Культивирование в гипoadгезионных условиях осуществляли в количестве 20 000 клеток на образец следующими способами: 1) в 200 мкл бессывороточной среды, приготовленной на основе DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л с 25 мМ HEPES и без него («ПанЭко», Россия), альбумина человеческого (0,4 %) (Baxter AG, Австрия), инсулин-трансферрин-селенита (инсулин — 0–10 мкг/мл, трансферрин — 0–5,5 мкг/мл, селенит натрия — 0–6,7 нг/мл) («ПанЭко», Россия), смеси антибиотиков пенициллина (50 ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) («ПанЭко», Россия), L-глутамина (2 мМ) («ПанЭко», Россия) в 96-луночных полипропиленовых планшетах (Corning, США); 2) в 200 мкл бессывороточной среды Complete Assay Medium (CAM)

(DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия) в низкоадгезионных 96-луночных полипропиленовых планшетах, входящих в состав набора АТР-ТСА.

Получение сфероидов и их гистологический анализ.

Для гистологического исследования опухолевые клетки культивировали в гипoadгезионных условиях с использованием бессывороточной среды на основе DMEM с содержанием 4,5 г/л глюкозы с HEPES, 0,4 % альбумина человеческого (Baxter AG, Австрия), инсулин-трансферрин-селенита (инсулин — 10 мкг/мл, трансферрин — 5,5 мкг/мл, селенит натрия — 6,7 нг/мл) («ПанЭко», Россия), смеси антибиотиков пенициллина (50 ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) («ПанЭко», Россия), L-глутамина (2 мМ) («ПанЭко», Россия), которая далее указана как бессывороточная среда для тестирования резистентности 3 (БСТР3), в 96-луночных полипропиленовых планшетах (Corning, США). Сформировавшиеся при культивировании 3D-структуры (сфероиды) после осаждения центрифугированием при 150 g в течение 5 мин, фиксировали в 70 % этиловом спирте и помещали в агарозный гель, используя агарозу с низкой температурой плавления (Bio-Rad, США). Фрагменты агарозного геля, содержащие клеточные структуры, обезжизняли в течение 3 сут с применением серии спиртов восходящей концентрации (70°, 96°, 100°), а затем хлороформа. Парафиновые блоки получали с использованием среды Histomix (BioVitrum, Россия). Серийные срезы (5 мкм) депарафинизировали, окрашивали гематоксилином Майера (BioVitrum, Россия) и водно-спиртовым эозином (BioVitrum, Россия) и заключали в монтирующую среду (Bio-Optica, Италия) для выполнения гистологического и цитологического исследований. Анализ гистологических препаратов и фотографирование изображений проводили с использованием микроскопа Olympus CX31 (Olympus, Япония) (x40), оснащенного цифровой камерой Olympus SC50 (Olympus, Япония).

Определение количества жизнеспособных клеток.

Количество жизнеспособных клеток определяли с использованием 3 подходов: 1) выявляли нарушения целостности клеточной мембраны с помощью окрашивания трипановым синим; 2) оценивали активность метаболизма клетками резазурина; 3) определяли внутриклеточный уровень аденозинтрифосфата (АТФ).

Определение количества жизнеспособных клеток с использованием окрашивания трипановым синим. Суспензию клеток и сфероидов переносили в пробирки объемом 1,5 мл и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 50 мкл раствора Версена («ПанЭко», Россия), после повторного центрифугирования ресуспендировали осадок в 50 мкл 0,05 % раствора трипсина-ЭДТА (ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота) («ПанЭко», Россия) и инкубировали при 37 °С в течение 5 мин. После 3-го центрифугирования осадок ресуспендировали в 200 мкл среды DMEM с содержанием 4,5 г/л глюкозы («ПанЭко», Россия). Суспензию клеток смешивали

в соотношении 10:1 с 0,4 % раствором трипанового синего (Gibco, США) и помещали в камеру Горяева.

Прямой подсчет клеток и расчет их концентрации, а также процентного содержания жизнеспособных (неокрашенных) и погибших (окрашенных) клеток проводили с использованием микроскопа Nikon Eclipse TS 100 (Nikon, Япония) ($\times 40$).

Оценка жизнеспособности клеток по метаболизму резазурина. К 200 мкл среды культивирования клеток добавляли 20 мкл раствора резазурина (Sigma-Aldrich, США) с концентрацией 180 мкг/мл. После инкубации с резазурином в течение 4–16 ч переносили 150 мкл культуральной среды каждого из образцов в черный 96-луночный планшет (SPL Life Sciences, Корея) и измеряли уровень флуоресценции резорурфина (продукт метаболизма резазурина с длиной волны возбуждения — 560 нм, эмиссии — 590 нм) с помощью планшетного флуориметра SpectraMax M3 (Molecular Devices, США).

Оценка жизнеспособности клеток по уровню АТФ. Для определения внутриклеточного уровня АТФ к 200 мкл среды культивирования добавляли 50 мкл реагента для лизиса опухолевых клеток (Tumor Cell Extraction Reagent, DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем 50 мкл лизата переносили в белый 96-луночный планшет (Costar, США) и после добавления 50 мкл люциферин-люциферазного реагента (Luciferin-Luciferase Reagent, DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия), предварительно разведенного согласно инструкции производителя в буфере для разведения (Dilution Buffer, DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия), измеряли уровень люминесценции с использованием люцинометра Berthold Orion II (Berthold, Германия).

Получение первичных культур опухолевых клеток злокачественных новообразований яичников. Первичные культуры опухолевых клеток от пациенток с РЯ получали из образцов асцитической жидкости и опухолевой ткани. Клетки асцитической жидкости осаждали с использованием центрифуги Hettich Universal 320R (Hettich Zentrifugen, Германия) при 150 g в течение 5 мин. Для удаления эритроцитов клеточный осадок инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре в 5 мл лизис-буфера ACK (Gibco, США), содержащего 155 мМ NH_4Cl , 10 мМ KHCO_3 и 0,1 мМ ЭДТА. Клетки дважды осаждали центрифугированием и ресуспендировали в среде DMEM с содержанием 4,5 г/л глюкозы. Образец опухолевой ткани измельчали механически до кусочков размером в 1 мм³, помещали в 10 мл раствора коллагеназы А (1 мг/мл) в бессывороточной среде и инкубировали на шейкере-инкубаторе Heidolph Unimax 1010 (Heidolph Instruments, Германия) при температуре 37 °C в течение 2,5–6 ч. Для удаления эритроцитов из образца использовали методику, описанную выше. Клетки дважды осаждали центрифугированием с последующим ресуспендированием в среде DMEM с содержанием 4,5 г/л глюкозы.

Обработка клеток цитостатиками. Обработку клеток цитостатиками проводили в гипoadгезионных условиях, добавляя в среду культивирования противоопухолевые препараты: цисплатин (Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Россия), паклитаксел (Teva, Израиль), доксорубин (Pfizer, Италия). Клетки культивировали в присутствии 6 концентраций цитостатиков, составляющих 200; 100; 50; 25; 12,5 и 6,25 % тестовой концентрации препарата (test drug concentration, TDC). В качестве TDC использовали следующие концентрации препаратов: для цисплатина — 3,8 мкг/мл, для паклитаксела — 13,6 мкг/мл, для доксорубина — 0,5 мкг/мл.

Определение резистентности клеток линий рака яичников и первичных культур. Клетки линий РЯ и первичных культур злокачественных новообразований яичников после обработки цитостатиками культивировали в гипoadгезионных условиях. На 5-й день в бессывороточную среду культивирования БСТРЗ добавляли раствор резазурина в концентрации 180 мкг/мл и определяли жизнеспособность клеток через 16 ч по уровню флуоресценции резорурфина, или на 6-й день в среду культивирования САМ добавляли 50 мкл реагента для лизиса опухолевых клеток и определяли жизнеспособность клеток по уровню АТФ.

В качестве показателя подавления роста опухоли (tumor growth inhibition, TGI) использовали соотношение уровней жизнеспособности клеток в присутствии 1 из 6 концентраций цитостатика и без добавления цитостатика, рассчитываемое по формуле:

$$\text{TGI}_{\% \text{TDC}} = [1 - (I_{\% \text{TDC}} - I_0) / (I_{\text{TDC0}} - I_0)] \times 100 \%,$$

где $\text{TGI}_{\% \text{TDC}}$ — подавление роста опухоли при культивировании клеток в концентрации цитостатика, соответствующей указанному проценту от TDC; $I_{\% \text{TDC}}$ — средний показатель интенсивности флуоресценции/люминесценции в образце при культивировании клеток в соответствующей концентрации цитостатика; I_{TDC0} — средний показатель интенсивности флуоресценции/люминесценции в образце при культивировании клеток без препаратов; I_0 — средний показатель интенсивности флуоресценции/люминесценции в образце культуральной среды.

Индекс резистентности/чувствительности (RSI) рассчитывали по формуле:

$$\text{RSI} = 600 - \Sigma (\text{TGI}_{6,25 \% \text{TDC}} + \text{TGI}_{12,5 \% \text{TDC}} + \text{TGI}_{25 \% \text{TDC}} + \text{TGI}_{50 \% \text{TDC}} + \text{TGI}_{100 \% \text{TDC}} + \text{TGI}_{200 \% \text{TDC}}),$$

где RSI — индекс резистентности/чувствительности; $\text{TGI}_{6,25 \% \text{TDC}}$ — подавление роста опухоли при культивировании клеток в концентрации цитостатика, соответствующей 6,25 % TDC; $\text{TGI}_{12,5 \% \text{TDC}}$ — подавление роста опухоли при культивировании клеток в концентрации

цитостатика, соответствующей 12,5 % TDC; $TGI_{25\%TDC}$ — подавление роста опухоли при культивировании клеток в концентрации цитостатика, соответствующей 25 % TDC; $TGI_{50\%TDC}$ — подавление роста опухоли при культивировании клеток в концентрации цитостатика, соответствующей 50 % TDC; $TGI_{100\%TDC}$ — подавление роста опухоли при культивировании клеток в концентрации цитостатика, соответствующей 100 % TDC; $TGI_{200\%TDC}$ — подавление роста опухоли при культивировании клеток в концентрации цитостатика, соответствующей 200 % TDC.

Статистическая обработка полученных данных. Статистический анализ данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.4.3. Статистическую значимость различий интенсивности флуоресценции между образцами с различным количеством жизнеспособных клеток оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с пост-тестом Тьюки. Статистическую значимость различий RSI рассчитывали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия для всех методов считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Формирование 3D-структур клетками рака яичников при культивировании в гипoadгезионных условиях. Прототипом разрабатываемой методики экспериментального определения индивидуальной резистентности опухолей пациенток со злокачественными новообразованиями яичников к противоопухолевым препаратам послужил используемый в настоящее время в клинической практике набор реагентов и расходных материалов АТР-ТСА (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия). Методика, используемая в АТР-ТСА, предполагает культивирование опухолевых клеток, полученных из биологических образцов больных в количестве 15 000–25 000 в лунке в течение 6 дней в 6 последова-

тельно понижающихся концентрациях цитостатического агента (200; 100; 50; 25; 12,5 и 6,25 % TDC). TDC, применяемые в этом тесте, воспроизводят максимальные концентрации препаратов, определяемые в плазме пациенток при проведении курсов ХТ [18]. Культивирование клеток в ходе теста АТР-ТСА осуществляют в гипoadгезионных условиях с применением бессывороточной среды САМ и низкоадгезионных 96-луночных полипропиленовых планшетов (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия), что, благодаря неспособности ряда нормальных клеток выживать в подобных условиях, обеспечивает увеличение доли опухолевых клеток и, соответственно, возможность более объективно оценивать резистентность/чувствительность именно злокачественных клеток [19]. Использование гипoadгезионных условий при культивировании способствует образованию из злокачественных эпителиальных клеток 3D-структур, в частности сфероидов, резистентность/чувствительность которых более объективно отражает резистентность/чувствительность опухоли в организме, чем при использовании 2D-многослойных культур злокачественных клеток [20].

Результаты анализа данных литературы позволили выяснить, что в качестве необходимых добавок в бессывороточной среде используют альбумин, инсулин, трансферрин, селенит, L-глутамин и смесь антибиотиков пенициллина и стрептомицина [21]. На основании этих сведений на начальном этапе разработки методики составлены несколько вариантов БСТР, которые были использованы для оценки способности опухолевых клеток РЯ формировать 3D-структуры (сфероиды).

Клетки линий A-1847, Ovcар-3 и Ovcар-4 культивировали в бессывороточных средах в 96-луночных полипропиленовых планшетах (Corning, США) в количестве 20 000 клеток на образец. На 6-й день сформировавшиеся 3D-структуры осаждали центри-



Рис. 1. Микроскопия сфероидов, образовавшихся после культивирования суспензии клеток линий рака яичников: а — A-1847; б — Ovcар-3; в — Ovcар-4. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 50$ мкм

Fig. 1. Microscopy of spheroids formed after culturing a suspension of ovarian cancer cell lines: а — A-1847; б — Ovcар-3; в — Ovcар-4. Hematoxylin and eosin staining, $\times 50$ μ m

фугированием и проводили гистологический анализ сфероидов. По данным микроскопического анализа наилучшие результаты по формированию сфероидов получены для БСТР3, которая и была использована в дальнейшем исследовании (рис. 1).

Определение динамики количества жизнеспособных клеток рака яичников при культивировании в гипoadгезионных условиях. Клетки линий РЯ А-1847, Ovcар-3 и Ovcар-4 культивировали в гипoadгезионных условиях в БСТР3 в 96-луночных полипропиленовых планшетах (Corning, США). Количество живых клеток в образце оценивали ежедневно до 6-го дня культивирования с использованием трипанового синего.

Установлено, что на 2-й и 3-й дни культивирования количество жизнеспособных клеток рака яичника линии А-1847 увеличивается в 2,1 и 2,4 раза по сравнению с 1-м днем соответственно, а затем начинает снижаться и составляет 177, 99 и 73 % на 4-, 5- и 6-й дни соответственно. Клетки Ovcар-3 продемонстрировали меньшую способность к пролиферации в гипoadгезионных условиях. На 2-й и 3-й дни культивирования количество жизнеспособных клеток составило 85 и 87 % соответственно по отношению к 1-му дню, но на 4-, 5- и 6-й дни увеличилось до 117, 137 и 141 % соответственно. При культивировании клеток линии Ovcар-4 на 2-й день их жизнеспособность снизилась до 94 %, а затем, в течение последующих 3–6 дней культивирования количество живых клеток в образце составило 127–148 % от исходного (рис. 2).

Таким образом, при использовании указанного протокола культивирования клеток РЯ в гипoadгезионных условиях к 5–6-му дням культивирования сохраняется высокая доля жизнеспособных клеток, что позволяет использовать данные условия при проведении теста на химиорезистентность опухолевых клеток *in vitro*.

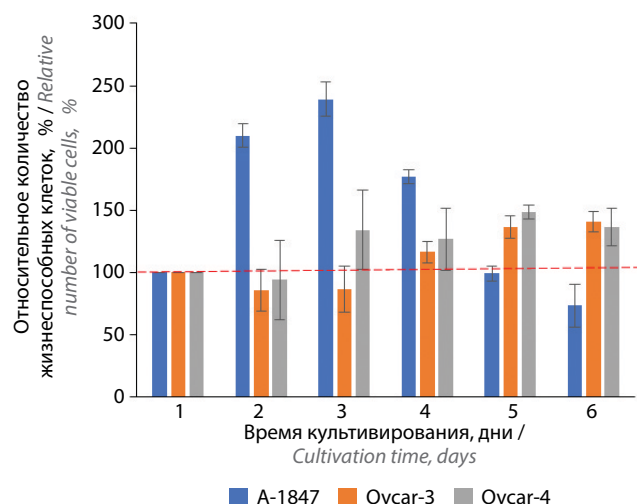


Рис. 2. Динамика относительного количества жизнеспособных клеток рака яичников, культивируемых в гипoadгезионных условиях в бессывороточной среде для тестирования резистентности 3

Fig. 2. Dynamics of the relative number of viable ovarian cancer cells cultured under hypoadhesive conditions in serum-free medium for resistance testing 3

Определение оптимального количества клеток и времени инкубации при выполнении теста на жизнеспособность по метаболизму резазурина. В качестве метода определения жизнеспособности в тесте АТР-ТСА используется люминометрия, позволяющая оценить уровень АТФ, хорошо коррелирующий с количеством живых клеток. В ходе разработки методики мы решили определить возможность использования флуориметрии после добавления резазурина вместо люминометрии в качестве метода количественной оценки жизнеспособности клеток. Выбор флуориметрии обусловлен довольно высокой чувствительностью этого метода, а также его доступностью, воспроизводимостью и удобством в использовании. Также его преимуществом является наличие флуориметров (в отличие от люминометров), которые зарегистрированы в Российской Федерации.

Определение влияния цитостатиков на жизнеспособность клеток после добавления резазурина основано на зависимости интенсивности сигнала флуоресценции резорурфина — продукта метаболизма резазурина, образующегося в определенный интервал времени, — от количества клеток в образце. Поскольку минимальное количество клеток, которое должно быть в образце, ограничено чувствительностью метода детекции сигнала, а максимальное — полным истощением субстрата реакции, необходимо определить оптимальное количество клеток для добавления в образец для проведения теста на химиорезистентность. Кроме того, из-за отсутствия единого протокола регистрации жизнеспособности клеток методом флуориметрии после добавления резазурина важно выяснить оптимальное время культивирования клеток с этим соединением до проведения флуориметрии. Для решения вышеуказанных задач определен уровень значимости различий интенсивности флуоресценции резорурфина между образцами с разным количеством клеток РЯ, культивируемых с данным соединением в течение различных временных интервалов.

Образцы с различным количеством клеток РЯ линий А-1847, Ovcар-3 и Ovcар-4, полученные путем серий двукратного разведения от 80 000 до 156 клеток/образец, культивировали в БСТР3 в полипропиленовых планшетах в течение 4, 8, 12 и 16 ч после добавления резазурина. Затем оценивали жизнеспособность клеток по метаболизму резазурина методом флуориметрии. Полученные данные использовали для определения статистической значимости различий интенсивности флуоресценции между образцами с различным количеством жизнеспособных клеток, оцениваемой с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с пост-тестом Тьюки (табл. 1–3).

Согласно полученным данным при определении жизнеспособности клеток по метаболизму резазурина оптимальным является 10 000–30 000 клеток в образце. Поскольку к 5–6-му дням количество клеток всех используемых линий РЯ составило от 73 до 148 % от изначально добавленных в образец (см. рис. 2), в качестве оптимальной для постановки теста была выбрана

Таблица 1. Уровень статистической значимости различий интенсивности флуоресценции резорурфина в образцах с разным количеством клеток A-1847

Table 1. Statistical significance level of differences in resorufin fluorescence intensity in samples with different numbers of A-1847 cells

Время инкубации, ч Incubation duration, h	Количество живых клеток в экспериментальном образце Number of living cells in the experimental sample	Количество живых клеток в контрольном образце Number of living cells in the control sample									
		80 000	40 000	20 000	10 000	5000	2500	1250	625	312	156
4	40 000	<0,0001		—	—	—	—	—	—	—	—
	20 000			—	—	—	—	—	—	—	—
	10 000				—	—	—	—	—	—	—
	5000				>0,05	—	—	—	—	—	—
	2500					>0,05	—	—	—	—	—
	1250		<0,0001	<0,0001				—	—	—	—
	625				<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	—
	312										—
	156										—
	0									>0,05	>0,05
8	40 000	<0,0001	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	20 000			—	—	—	—	—	—	—	—
	10 000				—	—	—	—	—	—	—
	5000				<0,005	—	—	—	—	—	—
	2500					>0,05	—	—	—	—	—
	1250		<0,0001	<0,0001				—	—	—	—
	625				<0,0001	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	—
	312					>0,05					—
	156					<0,01					—
	0									>0,05	>0,05
12	40 000	<0,0001	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	20 000			—	—	—	—	—	—	—	—
	10 000				—	—	—	—	—	—	—
	5000					—	—	—	—	—	—
	2500					>0,05	—	—	—	—	—
	1250		<0,0001	<0,0001		<0,001		—	—	—	—
	625				<0,0001		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	—
	312										—
	156					<0,0005					—
	0									>0,05	>0,05
16	40 000	<0,0005	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	20 000			—	—	—	—	—	—	—	—
	10 000				—	—	—	—	—	—	—
	5000					—	—	—	—	—	—
	2500					<0,01	—	—	—	—	—
	1250	<0,0001	<0,0001	<0,0001			>0,05	—	—	—	—
	625				<0,0001				—	—	—
	312					<0,0001				—	—
	156						>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	—
	0									>0,05	>0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: зеленым цветом отмечены статистически значимые различия, розовым — незначимые. ANOVA с пост-тестом Тьюки, приведены значения *p*.

Note. Here and in Tables 2, 3: statistically significant differences are shown in green, not significant in pink. ANOVA with Tukey's post-test, *p* values are presented.

Таблица 2. Уровень статистической значимости различий интенсивности флуоресценции резорурфина в образцах с разным количеством клеток Ovar-3

Table 2. Statistical significance Level of differences in resorufin fluorescence intensity in samples with different numbers of Ovar-3 cells

Время инкубации, ч Incubation duration, h	Количество живых клеток в экспериментальном образце Number of living cells in the experimental sample	Количество живых клеток в контрольном образце Number of living cells in the control sample									
		80 000	40 000	20 000	10 000	5000	2500	1250	625	312	156
4	40 000		—	—	—	—	—	—	—	—	—
	20 000			—	—	—	—	—	—	—	—
	10 000				—	—	—	—	—	—	—
	5000				>0,05	—	—	—	—	—	—
	2500	<0,0001	<0,0001			—	—	—	—	—	—
	1250			<0,0001			—	—	—	—	—
	625				<0,05	>0,05		—	—	—	—
	312						>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	—
	156										—
	0									>0,05	>0,05
8	40 000		—	—	—	—	—	—	—	—	—
	20 000			—	—	—	—	—	—	—	—
	10 000			<0,05	—	—	—	—	—	—	—
	5000					—	—	—	—	—	—
	2500	<0,0001	<0,0001				—	—	—	—	—
	1250				>0,05	>0,05		—	—	—	—
	625			<0,0001			>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	—
	312										—
	156										—
	0									>0,05	>0,05
12	40 000		—	—	—	—	—	—	—	—	—
	20 000			—	—	—	—	—	—	—	—
	10 000			<0,05	—	—	—	—	—	—	—
	5000				>0,05	—	—	—	—	—	—
	2500	<0,0001	<0,0001				—	—	—	—	—
	1250							—	—	—	—
	625			<0,0001					—	—	—
	312				<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	—
	156										—
	0									>0,05	>0,05
16	40 000		—	—	—	—	—	—	—	—	—
	20 000			—	—	—	—	—	—	—	—
	10 000				—	—	—	—	—	—	—
	5000				<0,05	—	—	—	—	—	—
	2500	<0,0001	<0,0001				—	—	—	—	—
	1250			<0,0001				—	—	—	—
	625				<0,0001	>0,05		—	—	—	—
	312						>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	—
	156										—
	0									>0,05	>0,05

Таблица 3. Уровень статистической значимости различий интенсивности флуоресценции резорурфина в образцах с разным количеством клеток Ovar-4

Table 3. Level of statistical significance of differences in resorufin fluorescence intensity in samples with different numbers of Ovcar-4 cells

Время инкубации, ч Incubation duration, h	Количество живых клеток в экспери- ментальном образце Number of living cells in the experimental sample	Количество живых клеток в контрольном образце Number of living cells in the control sample										
		80 000	40 000	20 000	10 000	5000	2500	1250	625	312	156	
4	40 000	<0,0001	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	20 000		—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	10 000		—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	5000		<0,0001	<0,05	—	—	—	—	—	—	—	
	2500			>0,05	—	—	—	—	—	—		
	1250			—	—	—	—	—	—	—		
	625			>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05			
	312			>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05			
	156			>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05			
	0			>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05			
8	40 000	>0,05		—	—	—	—	—	—	—	—	—
	20 000	<0,0001		—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10 000		—	—	—	—	—	—	—	—		
	5000		—	—	—	—	—	—	—	—		
	2500		>0,05	—	—	—	—	—	—			
	1250		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05		
	625		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05		
	312		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05		
	156		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05		
	0		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05		
12	40 000	>0,05	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	20 000	<0,0001	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	10 000		—	—	—	—	—	—	—	—		
	5000		—	—	—	—	—	—	—	—		
	2500		<0,05	—	—	—	—	—	—	—		
	1250		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001		
	625		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001		
	312		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001		
	156		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001		
	0		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001		
16	40 000	>0,05	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	20 000	<0,0001	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	10 000		—	—	—	—	—	—	—	—		
	5000		—	—	—	—	—	—	—	—		
	2500		—	—	—	—	—	—	—	—		
	1250		>0,05	—	—	—	—	—	—			
	625		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05				
	312		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05				
	156		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05				
	0		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05				

концентрация 20 000 клеток в образце. Дополнительно установлено, что увеличение времени инкубации с резазурином с 4 до 16 ч приводит к увеличению статистически значимых различий в интенсивности флуоресценции образцов, содержащих более низкие концентрации клеток. Это можно рассматривать в качестве аргумента в пользу выбора 16 ч в качестве требуемого интервала обработки клеток, поскольку обработка цитостатиком должна приводить к уменьшению количества клеток. В то же время увеличение продолжительности инкубации клеток с резазурином для линии Ovar-4 с 4 до 16 ч приводит к исчезновению различий в интенсивности флуоресценции в образцах, содержащих изначально 80 000 и 40 000 клеток. В связи с этим определение интенсивности флуоресценции при инкубации с резазурином в течение 16 ч свидетельствует о необходимости контроля над количеством клеток в образце.

Таким образом, при анализе образцов, изначально содержащих 10 000–30 000 клеток, инкубация с резазурином продолжительностью 12–16 ч была признана в качестве оптимальной.

Сравнительный анализ определения резистентности опухолевых клеток линий рака яичников и первичных культур с использованием теста АТФ-ТСА и разработанного протокола тестирования. Для оценки результатов тестирования с использованием набора реактивов АТФ-ТСА проводят расчет RSI, отражающего дозозависимый эффект гибели клеток при их культивировании в разных концентрациях цитостатика. Результаты ряда исследований показали корреляцию значения RSI с клиническим ответом на терапию цитостатиком, включая показатели безрецидивной и общей выживаемости [18, 22].

В ходе сравнительного анализа результатов тестирования на резистентность, полученных с использованием набора АТФ-ТСА и разработанного нами протокола, включающего культивирование клеток в БСТРЗ в полипропиленовых планшетах и оценку жизнеспособности по метаболизму резазурина (протокол БСТРЗ-РЕЗ), для всех клеточных культур РЯ при применении обоих методов получена дозовая зависимость гибели клеток от концентрации цисплатина, паклитаксела и доксорубина. Кривые доза–эффект

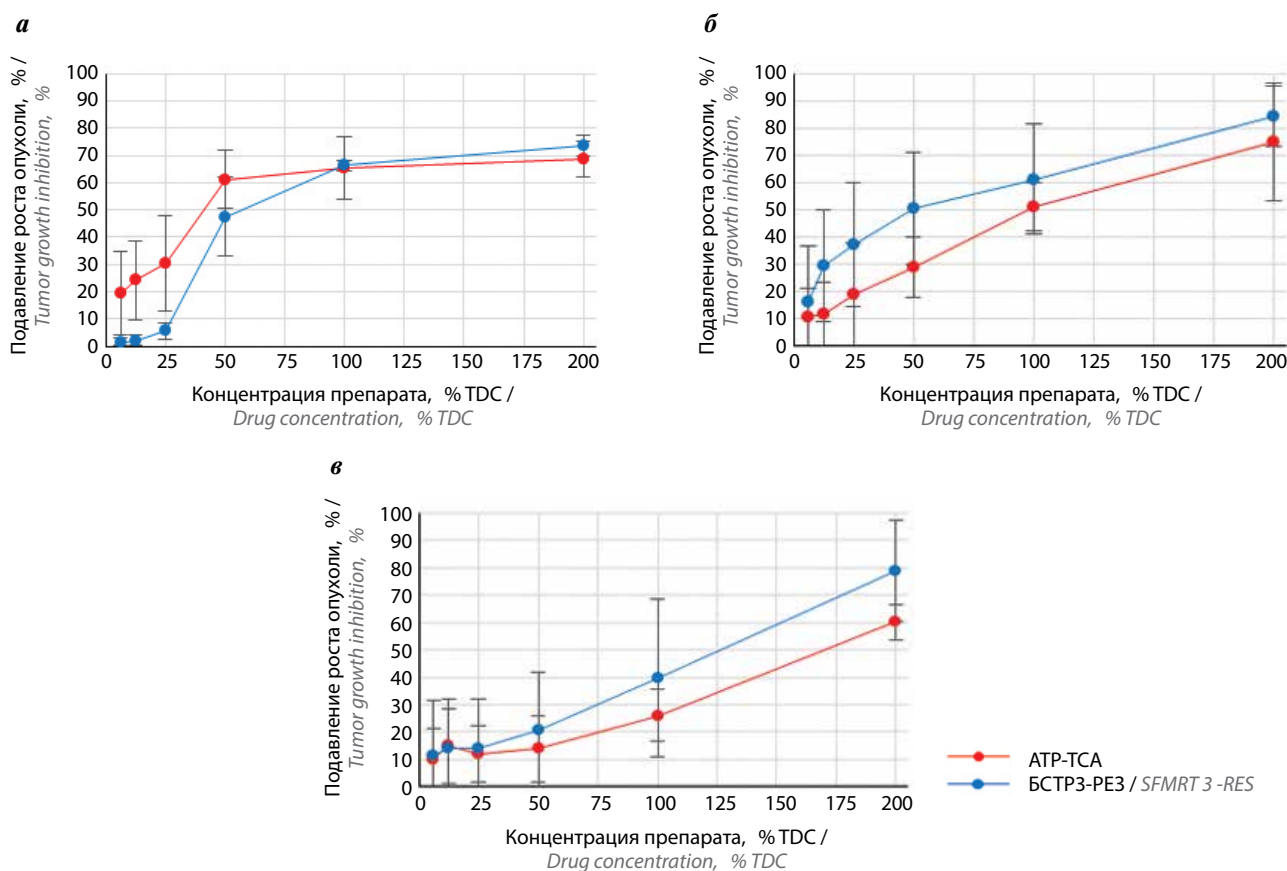


Рис. 3. Дозозависимые эффекты гибели клеток линий рака яичников A-1847 (а), Ovar-3 (б) и Ovar-4 (в) в присутствии цисплатина. Данные получены с использованием протокола, включающего культивирование клеток в бессывороточной среде для тестирования резистентности 3 (БСТРЗ) в полипропиленовых планшетах и оценку жизнеспособности по метаболизму резазурина (БСТРЗ-РЕЗ), и с применением набора АТФ-Tumor Chemosensitivity Assay (АТФ-ТСА) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия). Показатель подавления роста опухоли представлен как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. TDC — тестовая концентрация препарата

Fig. 3. Dose-dependent effects of cell death of ovarian cancer cell lines A-1847 (a), Ovar-3 (б) and Ovar-4 (в) in the presence of cisplatin. Data obtained using a protocol which includes cell culture in serum-free medium for resistance testing 3 (SFMRT 3) in polypropylene plates and viability determination based on resazurin metabolism (SFMRT3-RES) and using ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Germany). Tumor growth suppression index is presented as mean $\pm$ standard deviation. TDC — tested drug concentration

для линий клеток РЯ А-1847, Оvсар-3 и Оvсар-4 для цисплатина представлены на рис. 3. Использование набора АТР-ТСА основано на наличии дозозависимого эффекта. Его получение в протоколе БСТР3-РЕЗ позволило рассчитать и сравнить RSI для обоих методов (рис. 4). Следует отметить, что статистически значимых различий в RSI (t -критерий Стьюдента), рассчитанных в соответствии с результатами тестов при использовании АТР-ТСА и БСТР3-РЕЗ, при воздействии цисплатина, паклитаксела и доксорубина для всех линий РЯ выявлено не было (см. рис. 4).

Результаты исследования культур клеток РЯ позволили перейти к тестированию химиорезистентности с использованием протокола БСТР3-РЕЗ на первичных культурах клеток, полученных из образцов опухолевой ткани и асцитической жидкости пациентов с РЯ (пациентки 1–3). Выявлена возможность регистрации дозозависимого эффекта гибели клеток от концентрации цитостатика (рис. 5–7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально для прогноза резистентности к ХТ при РЯ использовали монослойные первичные культуры и ксенографты. Стабильные двумерные культуры

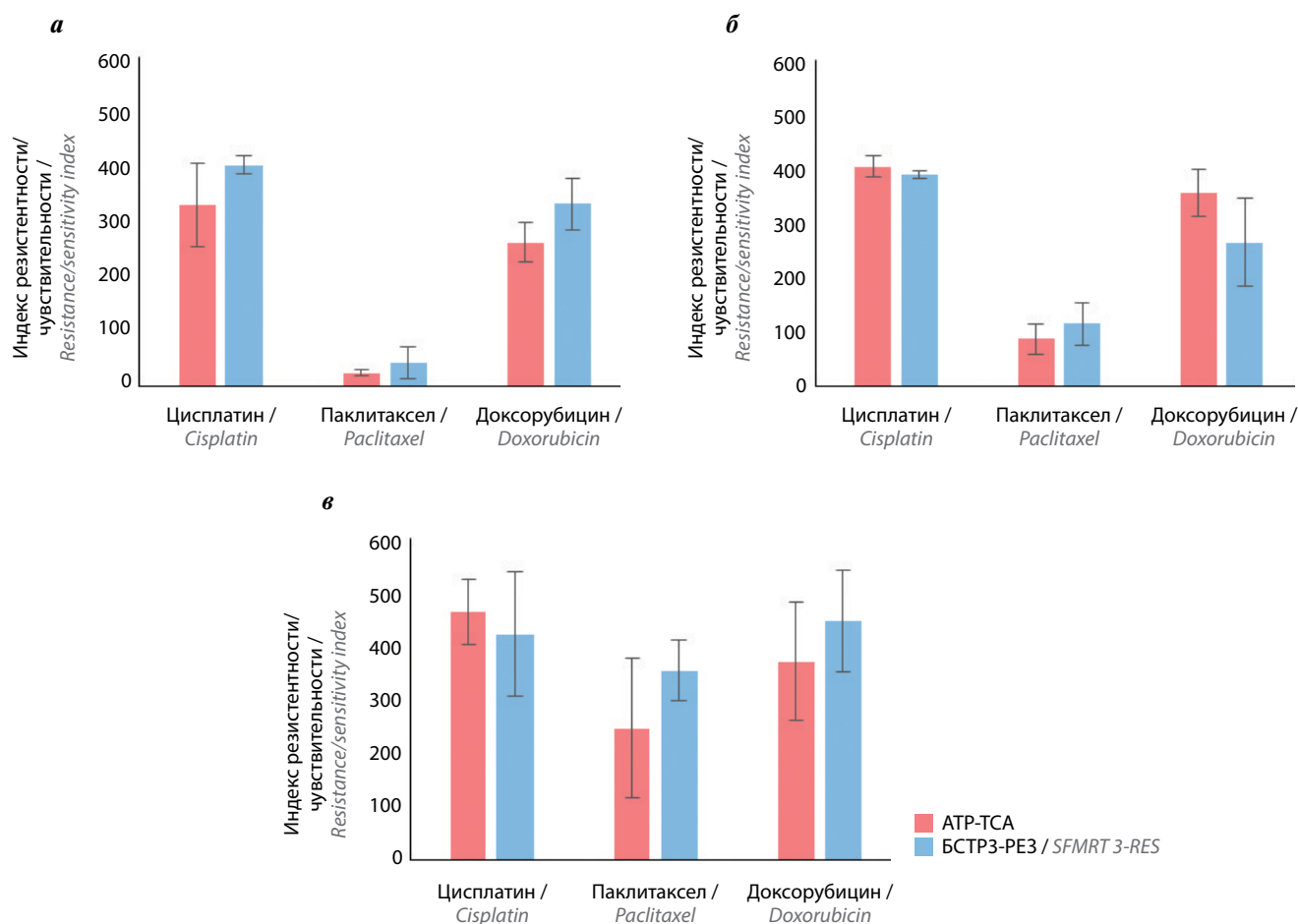


Рис. 4. Индексы резистентности/чувствительности клеток линий рака яичников А-1847 (а), Оvсар-3 (б) и Оvсар-4 (в) для цисплатина, паклитаксела и доксорубина (t -критерий Стьюдента). Данные получены с использованием протокола, включающего культивирование клеток в бес-сывороточной среде для тестирования резистентности 3 (БСТР3) в полипропиленовых планшетах и оценку жизнеспособности по метаболизму резазурина (БСТР3-РЕЗ), и с применением набора АТР-Tumor Chemosensitivity Assay (АТР-ТСА) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия) и представлены как среднее значение + стандартное отклонение

Fig. 4. Cell resistance/sensitivity indices of ovarian cancer cell lines A-1847 (a), Ovar-3 (b) and Ovar-4 (v) for cisplatin, paclitaxel and doxorubicin (Student's t -test). Data obtained using a protocol which includes cell culture in serum-free medium for resistance testing 3 (SFMRT3) in polypropylene plates and viability determination based on resazurin metabolism (SFMRT3-RES) and using ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Germany) and presented as mean + standard deviation

просты и легки в использовании. Однако в процессе пассирования ткань опухоли утрачивает гетерогенность, поскольку выживают только клетки, способные адаптироваться к существованию *in vitro*. Кроме того, в этих культурах не только отсутствуют стромальные клетки, но и изменены условия формирования внеклеточного матрикса. В результате этого профили экспрессии генов опухолевых клеток и клеток, существующих *in vivo*, различаются, что отражается на результатах тестирования, снижает прогностическую значимость таких тестов [14]. Использование ксенографтов РЯ в тестах на химиорезистентность не получило широкого применения в силу ограниченности успеха имплантации опухоли, трудоемкости процедуры, большой продолжительности роста имплантата и высокой стоимости метода.

Шагом вперед в развитии экспериментального тестирования опухолей на химиорезистентность стало использование переживающих 3D-культур, которые в большей степени сохраняют свойства исходной опухоли, такие как гетерогенность, клеточная/ядерная атипия и экспрессия биомаркеров. Создание 3D-культур РЯ с жизнеспособностью, достаточной для оценки их резистентности к химиопрепаратам, является непростой задачей, поскольку опухолевые клетки существуют в определенных условиях микроокружения, включающих внеклеточный матрикс и растворимые молекулы пара-, аутокринной и гуморальной регуляции. Одним из перспективных подходов является использование матрикеля при культивировании опухолевых клеток в питательной среде, содержащей такие нишевые факторы, как ламинин, коллаген IV типа, нидоген, гепаринсульфат гликопротеин, факторы ро-

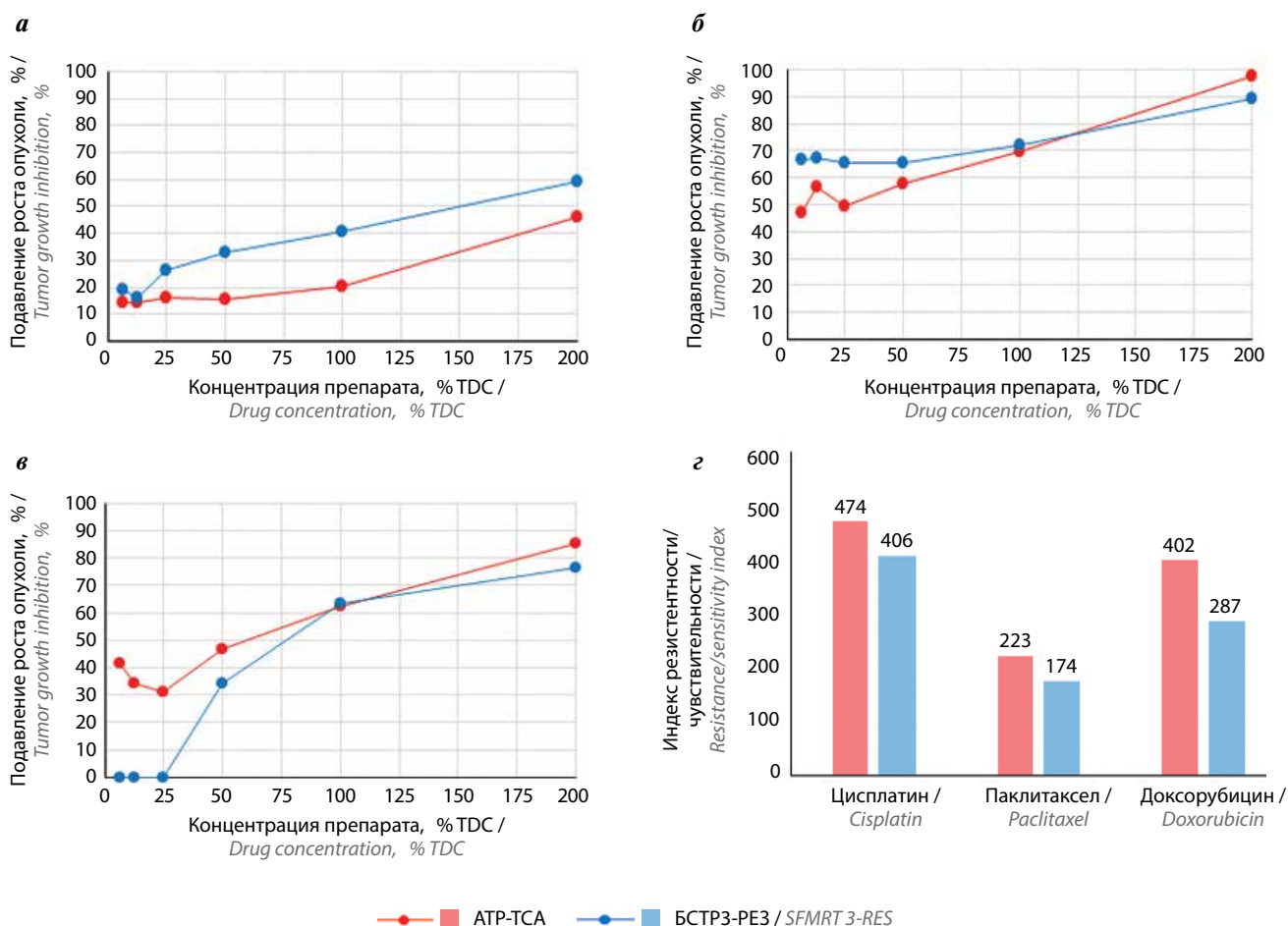


Рис. 5. Дозозависимые эффекты гибели опухолевых клеток в присутствии цисплатина (а), паклитаксела (б) и доксорубицина (в). Индексы резистентности для цисплатина, паклитаксела и доксорубицина (г). Данные получены с использованием протокола, включающего культивирование клеток в бессывороточной среде для тестирования резистентности 3 (БСТР3) в полипропиленовых планшетах и оценку жизнеспособности по метаболизму резазурина (БСТР3-РЕЗ), и с применением набора АТР-Tumor Chemosensitivity Assay (АТР-ТКА) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия) для первичной культуры рака яичников из образца опухолевой ткани пациентки 1

Fig. 5. Dose-dependent effects of tumor cell death in the presence of cisplatin (a), paclitaxel (б) and doxorubicin (в). Resistance indices for cisplatin, paclitaxel and doxorubicin (г). Data obtained using a protocol which includes cell culture in serum-free medium for resistance testing 3 (SFMRT 3) in polypropylene plates and viability determination based on resazurin metabolism (SFMRT 3-RES) and using ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Germany) for primary ovarian cancer cell culture from the tumor of patient 1

ста и матриксные металлопротеиназы. В данных условиях трехмерные структуры могут существовать в течение месяца и формировать стабильные 3D-культуры, сохраняющие профиль резистентности к химиопрепаратам, характерный для исходной опухоли [23].

Для экспресс-анализа резистентности конкретной опухоли к химиопрепаратам могут быть использованы 3D-культуры с упрощенными условиями культивирования и более кратким временем их использования — от 5 до 10 дней [22]. Путем варьирования состава бесывороточной среды мы подобрали вариант среды БСТР3. В ней клетки стабильных линий РЯ формировали жизнеспособные сфероиды, что подтверждено с помощью их гистологического анализа. Результаты оценки динамики роста клеток линий РЯ при культивировании в БСТР3 в полипропиленовых планшетах показали, что количество жизнеспособных клеток линий РЯ на 6-й день составило от 73 до 148 % от исходного. Это позволило сделать вывод о возможности

использования данных условий при экспериментальном тестировании опухолевых клеток на химиорезистентность. Жизнеспособность клеток определяли по уровню флуоресценции резорфина — продукта метаболизма резазурина. Оценка жизнеспособности клеток по их метаболической активности является стандартным, распространенным подходом при работе с культивируемыми клетками [11]. Ранее в качестве метаболизируемого соединения чаще всего использовали 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, известный под названием МТТ, однако применение вместо него резазурина, метаболизируемого более широким спектром ферментов по сравнению с МТТ до флуоресцирующего резорфина, повысило чувствительность и надежность метода.

Еще более чувствительным и надежным методом, разработанным для использования вместо МТТ-теста, является метод CellTiter-Glo®, основанный на измерении количества АТФ. Однако для детекции АТФ

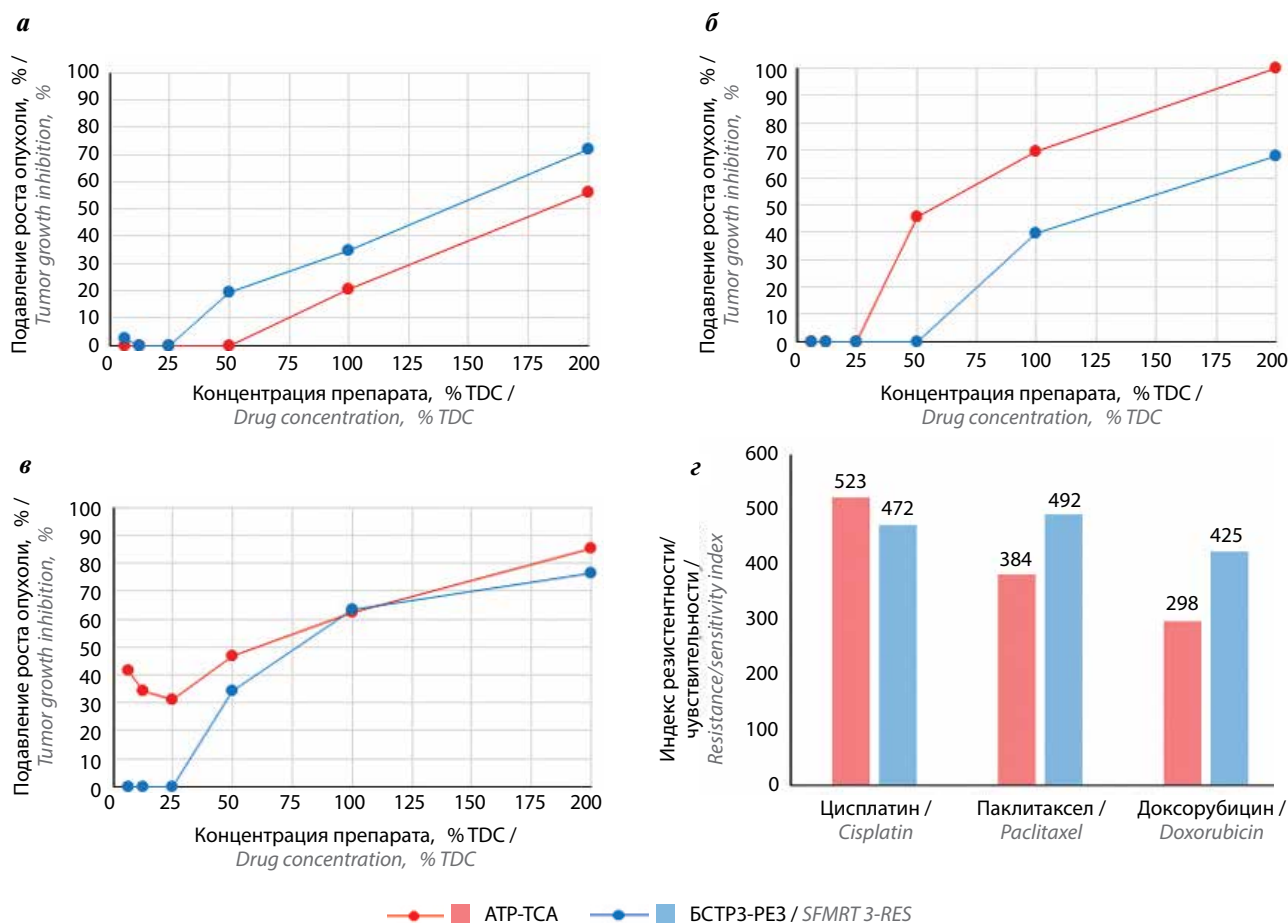


Рис. 6. Дозозависимые эффекты гибели опухолевых клеток в присутствии цисплатина (а), паклитаксела (б) и доксорубицина (в). Индексы резистентности для цисплатина, паклитаксела и доксорубицина (з). Данные получены с использованием протокола, включающего культивирование клеток в бесывороточной среде для тестирования резистентности 3 (БСТР3) в полипропиленовых планшетах и оценку жизнеспособности по метаболизму резазурина (БСТР3-РЕЗ), и с применением набора ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия) для первичной культуры рака яичников из образца опухолевой ткани пациентки 2

Fig. 6. Dose-dependent effects of tumor cell death in the presence of cisplatin (a), paclitaxel (б) and doxorubicin (в). Resistance indices for cisplatin, paclitaxel and doxorubicin (z). Data obtained using a protocol which includes cell culture in serum-free medium for resistance testing 3 (SFMRT 3) in polypropylene plates and viability determination based on resazurin metabolism (SFMRT3-RES) and using ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Germany) for primary ovarian cancer cell culture from the tumor of patient 2

требуются люминометры, которые не используются в медицинских учреждениях нашей страны. В связи с этим в настоящем исследовании использован резазуриновый метод. В то же время интегральный уровень флуоресценции резазурина в образце зависит от множества факторов: условий культивирования клеток, уровня метаболической активности ферментов, количества клеток, продолжительности инкубации с детектирующим агентом и некоторых других параметров [24]. В связи с этим получение релевантных воспроизводимых результатов резазуринового теста, направленного на определение жизнеспособности клеток конкретного нозологического типа опухолей требует валидации условий его проведения. Для валидации метода определения жизнеспособности клеток по уровню метаболизма резазурина проанализированы различия в интенсивности флуоресценции

резазурина в образцах с разным количеством клеток РЯ и в продолжительности инкубации (см. табл. 1–3). Показано, что оптимальным для данного способа определения жизнеспособности клеток является их количество в образце от 10 000 до 30 000. Принимая во внимание показатели динамики количества жизнеспособных клеток на 6-й день инкубации (73–148 %), сделан вывод, что использование 20 000 клеток в исходном экспериментальном образце является оптимальным. Также установлено, что 12–16 ч – это оптимальная продолжительность инкубации с резазурином опухолевых клеток РЯ 3 рассматриваемых линий, если количество клеток в образце не превышает 40 000. Такая продолжительность инкубации является допустимой из-за низкой цитотоксичности резазурина [25]. Таким образом, мы разработали протокол культивирования опухолевых клеток РЯ в гипoadгезионных

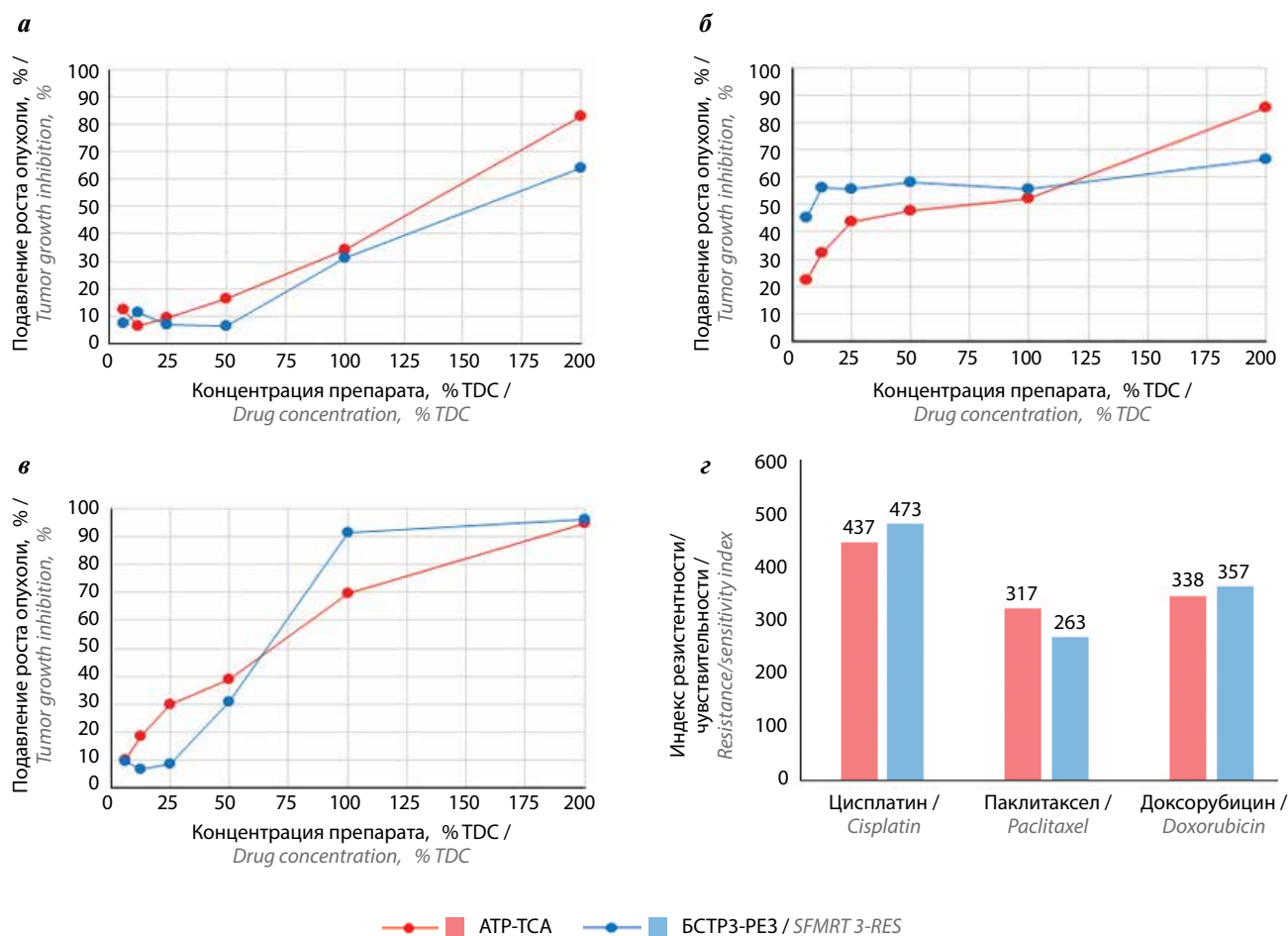


Рис. 7. Дозозависимые эффекты гибели опухолевых клеток в присутствии: цисплатина (а), паклитаксела (б) и доксорубицина (в). Индексы резистентности для цисплатина, паклитаксела и доксорубицина (з). Данные получены с использованием протокола, включающего культивирование клеток в бессывороточной среде для тестирования резистентности 3 (БСТР3) в полипропиленовых планшетах и оценку жизнеспособности по метаболизму резазурина (БСТР3-РЕЗ), и с применением набора ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия) для первичной культуры рака яичников из образца опухолевой ткани пациентки 3

Fig. 7. Dose-dependent effects of tumor cell death in the presence of cisplatin (a), paclitaxel (б) and doxorubicin (в). Resistance indices for cisplatin, paclitaxel and doxorubicin (z). Data obtained using a protocol which includes cell culture in serum-free medium for resistance testing 3 (SFMRT 3) in polypropylene plates and viability determination based on resazurin metabolism (SFMRT3-RES) and using ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Germany) for primary ovarian cancer cell culture from the tumor of patient 3

условиях, позволяющий протестировать химиорезистентность.

В качестве прототипа разрабатываемого протокола определения химиорезистентности *in vitro* рассматривается созданный рядом исследователей метод выявления химиорезистентности опухолевых клеток РЯ с использованием набора АТР-ТСА. Его преимуществами являются простота, межлабораторная воспроизводимость и то, что он применяется в клинической практике в Германии. На 3 стабильных линиях и первичных культурах РЯ с использованием созданного нами протокола тестирования химиорезистентности продемонстрирована возможность регистрации дозозависимого эффекта гибели клеток в присутствии цитостатиков. Дополнительно в ходе сравнительного анализа результатов определения химиорезистентности опухолевых клеток, полученных с использованием протокола БСТРЗ-РЕЗ и набора АТР-ТСА, выявлено отсутствие значимых различий в значениях RSI. Результаты пилотного исследования пригодности разработанных нами упрощенных условий анализа резистентности/чувствительности первичных 3D-культур солидных и асцитических вариантов РЯ (образцы

операционного материала пациенток) показали, что данные тестирования по разработанному протоколу практически не отличаются от данных, полученных с использованием стандартного метода, принятого за рубежом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тестирование химиорезистентности опухолевых клеток в первичных 3D-культурах основано на взаимосвязи уровня их жизнеспособности в присутствии цитостатика в концентрациях, сопоставимых с содержанием в организме пациента, и клиническими результатами терапии этим агентом. Выявленное нами дозозависимое влияние цитостатиков на жизнеспособность опухолевых клеток в 3D-культурах пациенток с РЯ свидетельствует о перспективности дальнейших исследований, направленных на определение корреляции между результатами экспериментального тестирования и клиническими данными. Для этой цели может быть использован разработанный нами упрощенный метод получения первичных 3D-культур, который соответствует стандарту, принятому за рубежом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. Москва. МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. 276 с.
Malignant neoplasms in Russia in 2023 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2024. 276 p. (In Russ.).
2. Siegel R.L., Kratzer T.B., Giaquinto A.N. et al. Cancer statistics, 2025. *CA Cancer J Clin* 2025;75(1):10–45. DOI: 10.3322/caac.21871
3. Покатаев И.А., Дудина И.А., Коломиец Л.А. и др. Рак яичников, первичный рак брюшины и рак маточных труб. Злокачественные опухоли 2024;14(3s2–2):82–101. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-02
Pokataev I.A., Dudina I.A., Kolomiets L.A. et al. Ovarian cancer, primary peritoneal cancer, and fallopian tube cancer. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors* 2024;14(3s2–2):82–101. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-02
4. Ledermann J.A., Matias-Guiu X., Amant F. et al. ESGO–ESMO–ESP consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology and early, advanced and recurrent disease. *Ann Oncol* 2024;35(3):248–66. DOI: 10.1016/j.annonc.2023.11.015
5. Pignata S., Cecere S.C., Du Bois A. et al. Treatment of recurrent ovarian cancer. *Ann Oncol* 2017;28(suppl_8):viii51–6. DOI: 10.1093/annonc/mdx441
6. Miras I., Estévez-García P., Muñoz-Galván S. Clinical and molecular features of platinum resistance in ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2024;201:104434. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2024.104434
7. Havasi A., Cainap S.S., Havasi A.T., Cainap C. Ovarian cancer – insights into platinum resistance and overcoming it. *Medicina (Kaunas)* 2023;59(3):544. DOI: 10.3390/medicina59030544
8. Baert T., Ferrero A., Sehouli J. et al. The systemic treatment of recurrent ovarian cancer revisited. *Ann Oncol* 2021;32(6):710–25. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.02.015
9. Monk B.J., Herzog T.J., Tewari K.S. Evolution of chemosensitivity and resistance assays as predictors of clinical outcomes in epithelial ovarian cancer patients. *Curr Pharm Des* 2016;22(30):4717–28. DOI: 10.2174/1381612822666160505114326
10. Имянитов Е.Н. Принципы индивидуализации противоопухолевой терапии. Практическая онкология 2013;14(4):187–94. Imyanitov E.N. Principles of individualization of antitumor therapy. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology* 2013;14(4):187–94.
11. Кирсанов К.И., Кузин К.А., Фетисов Т.И. и др. Методические подходы к экспериментальному тестированию резистентности клеток опухоли человека к химиотерапии. Сибирский онкологический журнал 2020;19(3):122–36. DOI: 10.21294/1814-4861-2020-19-3-122-136
Kirsanov K.I., Kuzin K.A., Fetisov T.I. et al. Methodological approaches to the determination of chemoresistance of human cancer cells to anti-cancer drugs. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2020;19(3):122–36. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2020-19-3-122-136
12. Singh T., Neal A.S., Moatamed N.A., Memarzadeh S. Exploring the potential of drug response assays for precision medicine in ovarian cancer. *Int J Mol Sci* 2021; 22(1):305. DOI: 10.3390/ijms22010305
13. Blom K., Nygren P., Larsson R., Andersson C.R. Predictive value of *ex vivo* chemosensitivity assays for individualized cancer chemotherapy: a meta-analysis. *SLAS Technol* 2017;22(3):306–14. DOI: 10.1177/2472630316686297

14. Maru Y., Hippo Y. Current status of patient-derived ovarian cancer models. *Cells* May 2019;8(5):505. DOI: 10.3390/cells8050505
15. Blumenthal R.D. An overview of chemosensitivity testing. *Methods Mol Med* 2005;110:3–18. DOI: 10.1385/1-59259-869-2:003
16. Grendys E.C., Florica J.V., Orr J.W. et al. Overview of a chemoresponse assay in ovarian cancer. *Clin Transl Oncol* 2014;16(9):761–9. DOI: 10.1007/s12094-014-1192-8
17. Konecny G., Crohns C., Pegram M. et al. Correlation of drug response with the ATP tumorchemosensitivity assay in primary FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000;77(2):258–63. DOI: 10.1006/gyno.2000.5728
18. Kurbacher C.M., Cree I.A. Chemosensitivity testing using microplate adenosine triphosphate-based luminescence measurements. *Methods Mol Med* 2005;2005;110:101–20. DOI: 10.1385/1-59259-869-2:101
19. Andreotti P.E., Cree I.A., Kurbacher C.M. et al. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1995;55(22):5276–82.
20. Cortesi M., Warton K., Ford C.E. Beyond 2D cell cultures: how 3D models are changing the in vitro study of ovarian cancer and how to make the most of them. *Peer J* 29;12:e17603. DOI: 10.7717/peerj.17603
21. Denry Sato J., Kan M. Media for culture of mammalian cells. *Curr Protoc Cell Biol*. 2001;Chapter 1:Unit 1.2. DOI: 10.1002/0471143030.cb0102s00
22. Neubauer H., Stefanova M., Solomyer E. et al. Predicting resistance to platinum-containing chemotherapy with the ATP tumor chemosensitivity assay in primary ovarian cancer. *Anticancer Res* 2008;28(2A):949–56.
23. Nanki Y., Chiyoda T., Hirasawa A. et al. Patient-derived ovarian cancer organoids capture the genomic profiles of primary tumours applicable for drug sensitivity and resistance testing. *Sci Rep* 2020;10(1):12581. DOI: 10.1038/s41598-020-69488-9
24. Rodríguez-Corralles J., Josán J.S. Resazurin live cell assay: Setup and fine-tuning for reliable cytotoxicity results. *Methods Mol Biol* 2017;1647:207–219. DOI: 10.1007/978-1-4939-7201-2_14
25. Gong X., Liang Z., Yang Y. et al. A resazurin-based, nondestructive assay for monitoring cell proliferation during a scaffold-based 3D culture process. *Regen Biomater* 2020;7(3):271–81. DOI: 10.1093/rb/rbaa002

Вклад авторов

К.А. Кузин: разработка дизайна исследования, проведение экспериментов, анализ данных, написание текста статьи;
 Т.И. Фетисов, О.А. Власова: проведение экспериментов;
 Р.И. Князев: получение и характеристика клинических образцов, редактирование;
 Е.Е. Антошина, Л.С. Труханова, Т.Г. Горькова: получение и характеристика клинических образцов, проведение экспериментов;
 Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов: разработка дизайна исследования, руководство проектом, редактирование.

Authors' contributions

K.A. Kuzin: research design development, conducting experiments, data analysis, article writing;
 T.I. Fetisov, O.A. Vlasova: conducting experiments;
 R.I. Knyazev: obtaining and characterization of clinical samples, editing;
 E.E. Antoshina, L.S. Trukhanova, T.G. Gor'kova: obtaining and characterization of clinical samples, conducting experiments;
 G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov: research design development, project management, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.А. Кузин / K.A. Kuzin: <https://orcid.org/0000-0001-8474-8195>
 Т.И. Фетисов / T.I. Fetisov: <https://orcid.org/0000-0002-5082-9883>
 О.А. Власова / O.A. Vlasova: <https://orcid.org/0000-0002-1498-849X>
 Р.И. Князев / R.I. Knyazev: <https://orcid.org/0000-0002-6341-0897>
 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>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (протокол от 30.05.2019).

Compliance with 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 (protocol dated 30.05.2019).

Статья поступила: 29.04.2025. **Принята к публикации:** 11.08.2025. **Опубликована онлайн:** 06.10.2025.

Article submitted: 29.04.2025. **Accepted for publication:** 11.08.2025. **Published online:** 06.10.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-116-131>

Молекулярные эффекты пестицидов карбарила, хлорпирифоса, манкоцеба, тирама и пендиметалина в условно-нормальных клетках *in vitro*: генотоксичность, клоногенность и влияние на экспрессию генов, ассоциированных с канцерогенезом

Е.С. Лылова¹, В.Г. Попова¹, К.А. Зимин^{1,2}, А.Ю. Букина¹, В.А. Нуртдинова¹, С.С. Шмаков³, М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,4}, В.П. Максимова¹

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

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117513 Москва, ул. Островитянова, 1;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12;

⁴ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Контакты: Варвара Павловна Максимова lavarvar@gmail.com

Введение. Злокачественные новообразования остаются одной из основных причин смертности в мире. В развитии данной патологии большую роль играет воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды, в том числе пестицидов. Несмотря на широкий спектр используемых в сельском хозяйстве пестицидов, их молекулярные эффекты и канцерогенный потенциал изучены лишь в отношении небольшого числа моделей, включая нормальные клетки человека.

Цель исследования – изучить молекулярные эффекты пестицидов карбарила, хлорпирифоса, манкоцеба, тирама и пендиметалина в условно-нормальных клетках HaCaT и MCF10A.

Материалы и методы. Нетоксичные концентрации пестицидов определяли с помощью МТТ-теста. Генотоксичность анализировали методом ДНК-комет. Проллиферативный потенциал оценивали с помощью клоногенного анализа, изменение экспрессии генов, ассоциированных с канцерогенезом, – с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Карбарил вызывал повреждение ДНК в клетках MCF10A, способствовал пролиферации клеток обеих линий в клоногенном тесте, а также приводил к активации генов биотрансформации (*AHR*, *GSTA4*) в клетках MCF10A, репрессии (*CYP1B1*, *GSTA4*) в клетках HaCaT и снижению экспрессии генов воспаления (*IL1a*, *IL1b*, *PTGES*, *IFNGR1*). Хлорпирифос не показал генотоксического эффекта и не влиял на клоногенность, но вызывал индукцию генов биотрансформации (*CYP1A1*, *CYP1B1*), воспаления (*IL1b*, *PTGES*) и генов *BCL2* и *DNMTs*. Манкоцеб и тирам не проявляли генотоксичности в клетках HaCaT и MCF10A, но активировали отдельные гены репарации (*ATR/ATM*). Тирам стимулировал пролиферацию клеток HaCaT в клоногенном тесте, а манкоцеб активировал экспрессию генов – регуляторов пролиферации (*CCND2*, *CCNE1*, *Ki-67*), но не влиял на рост колоний; оба фунгицида снижали экспрессию генов воспаления (*COX2*, *IL1a*, *IL1b*). Пендиметалин вызывал повреждение ДНК и активацию экспрессии генов репарации (*ATR*, *GADD45a*, *PCNA*) в клетках обеих линий, а также снижал экспрессию *GLUT3* в клетках HaCaT и индуцировал экспрессию генов *CYP1A1* в клетках HaCaT и *CYP1B1* – в клетках MCF10A.

Заключение. В ходе комплексной оценки влияния пестицидов на нормальные человеческие клетки выявлено, что пендиметалин, хлорпирифос и карбарил оказывают наибольшее проканцерогенное действие.

Ключевые слова: пестицид, канцерогенез, карбарил, хлорпирифос, манкоцеб, тирам, пендиметалин

Для цитирования: Лылова Е.С., Попова В.Г., Зимин К.А. и др. Молекулярные эффекты пестицидов карбарила, хлорпирифоса, манкоцеба, тирама и пендиметалина в условно-нормальных клетках *in vitro*: генотоксичность, клоногенность и влияние на экспрессию генов, ассоциированных с канцерогенезом. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(3):116–31.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-116-131>

Molecular effects of the pesticides carbaryl, chlorpyrifos, mancozeb, thiram, and pendimethalin in conditionally normal cells *in vitro*: genotoxicity, clonogenicity and effects on the expression of genes associated with carcinogenesis

E.S. Lylova¹, V.G. Popova¹, K.A. Zimin^{1,2}, A. Yu. Bukina¹, V.A. Nurtdinova¹, S.S. Shmakov³, M.G. Yakubovskaya¹, K.I. Kirsanov^{1,4}, V.P. Maksimova¹

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

²Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 6, 1 Ostrovityanova St., Moscow 117513, Russia;

³Lomonosov Moscow State University, 27/1 Lomonosovsky Prospekt, Moscow 119192, Russia;

⁴Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

Contacts: Varvara Pavlovna Maksimova lavarvar@gmail.com

Introduction. Cancer remains a major cause of mortality worldwide, with adverse environmental factors such as pesticides contributing significantly to its development. Despite the widespread use of various pesticides, the molecular mechanisms underlying their actions and carcinogenic potential have been studied for only a limited number of models, especially in normal human cells.

Aim. To study the molecular effects of pesticides carbaryl, chlorpyrifos, mancozeb, thiram, and pendimethalin in non-malignant HaCaT and MCF10A cells.

Materials and methods. Non-toxic concentrations of pesticides were determined using the MTT assay. Genotoxicity was analyzed by the comet assay. Proliferative potential was assessed by clonogenic assay. Changes in the expression of genes associated with carcinogenesis were evaluated by real-time polymerase chain reaction.

Results. Carbaryl caused DNA damage in MCF10A cells, promoted proliferation in both cell lines during clonogenic assay, as well as caused activation of biotransformation genes (*AHR*, *GSTA4*) in MCF10A cells, repression (*CYP1B1*, *GSTA4*) genes in HaCaT cells and lowered expression of inflammation genes (*IL1a*, *IL1b*, *PTGES*, *IFNGR1*). Chlorpyrifos did not have genotoxic effect and did not affect clonogenicity but caused induction of biotransformation (*CYP1A1*, *CYP1B1*), inflammation (*IL1b*, *PTGES*) genes, and genes *BCL2* and *DNMTs*. Mancozeb and thiram did not show genotoxicity in HaCaT and MCF10A cells but activated individual repair genes (*ATR/ATM*). Thiram stimulated HaCaT cell proliferation in clonogenic assay, and mancozeb activated expression of proliferation regulation genes (*CCND2*, *CCNE1*, *Ki-67*) but did not affect colony growth; both fungicides decreased expression of inflammation genes (*COX2*, *IL1a*, *IL1b*). Pendimethalin caused DNA damage and activation of repair genes (*ATR*, *GADD45a*, *PCNA*) in both cell lines, as well as decreased expression of *GLUT3* in HaCaT cells and induced expression of *CYP1A1* in HaCaT cells and *CYP1B1* in MCF10A cells.

Conclusion. In this study, we performed a comprehensive assessment of the effects of pesticides on normal human cells. Our results indicate that pendimethalin, chlorpyrifos, and carbaryl exert the most procarcinogenic effect.

Keywords: pesticide, carcinogenesis, carbaryl, chlorpyrifos, mancozeb, thiram, pendimethalin

For citation: Lylova E.S., Popova V.G., Zimin K.A. et al. Molecular effects of the pesticides carbaryl, chlorpyrifos, mancozeb, thiram, and pendimethalin in conditionally normal cells *in vitro*: genotoxicity, clonogenicity and effects on the expression of genes associated with carcinogenesis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = Advances in Molecular Oncology 2025;12(3):116–31. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-116-131>

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные новообразования (ЗНО) и ассоциированная с ними смертность представляют значительную проблему в современном обществе. В настоящее время в мире наблюдается повышение заболеваемости ЗНО, связанное как с совершенствованием диагностики и увеличением продолжительности жизни, так и с воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды, а также курением, ожирением и употреблением алкоголя [1]. По прогнозам Международного агентства по изучению рака (МАИР), к 2045 г. заболеваемость ЗНО может вырасти в 1,5 раза — до 35 млн случаев в год [2].

В начале XXI века глобальной проблемой стало воздействие стойких органических загрязнителей на природные экосистемы [3]. Высокая степень био-

аккумуляции, способность распространяться на большие расстояния, а также негативное влияние на биоразнообразие стали причиной подписания в 2001 г. Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях, ограничивающей производство и применение ряда промышленных химикатов и нескольких пестицидов (таких как дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ), токсафен, гептахлор, альдрин и др.) [4]. С 2001 г. МАИР классифицировало как вероятные канцерогены (группа 2a) пестициды глифосат, малатион, тетрахлорвинфос, ДДТ, паратион и как возможные канцерогены (группа 2b) соединения паракват, перметрин, бифентрин и 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту [5].

В настоящее время в мире зарегистрированы более 800 активных соединений, используемых в составе

коммерческих пестицидов [6]. При этом классификация МАИР включает всего около 20 пестицидов, что составляет менее 2 % от общего количества используемых агентов. Это свидетельствует об ограниченности имеющихся данных по канцерогенности пестицидов.

С 2015 г. МАИР начало активно включать пестициды в списки приоритетных соединений для исследования канцерогенных эффектов. Актуальный перечень пестицидов с наиболее высоким приоритетом для исследований включает такие агенты, как карбарил, перметрин, циперметрин, малатион, фонофос, метилтетрапрол, проквиназид, манкоцеб, тирам, винклозолин, хлорпирифос, тебуконазол, тербуфос, хлордекон, алахлор, пендиметалин, бифенил, бифентрин, атразин и другие триазиновые пестициды, пиретрины и пиретроиды, этилендитиокарбаматы и неоникотиноидные пестициды [7]. Многие из перечисленных соединений относятся к группе 3 (агенты, не классифицируемые в отношении канцерогенности для человека из-за ограниченности данных), канцерогенность остальных соединений МАИР не оценивало.

В 2017 г. для адекватного анализа и интерпретации механистических данных при классификации ксенобиотиков по канцерогенности МАИР сформулированы 10 ключевых характеристик канцерогенного агента, включающих: 1) электрофильность соединения или его метаболитов; 2) генотоксичность; 3) способность изменять репарацию или вызывать геномную нестабильность; 4) способность вызывать изменения в эпигенетической регуляции транскрипции; 5) способность к индукции окислительного стресса; 6) способность вызывать хроническое воспаление; 7) способность оказывать иммуносупрессивную активность; 8) способность модулировать рецептор-опосредованные эффекты; 9) способность вызывать иммортализацию; 10) способность влиять на активность пролиферации клеток, их гибели и питания [8].

Для некоторых пестицидов из списка приоритетов МАИР на отдельных моделях *in vivo* и *in vitro* исследована их способность повреждать ДНК, вызывать оксидативный стресс, нарушая баланс между образованием активных форм кислорода (АФК) и антиоксидантной защитой, влиять на пролиферацию, а также на различные рецепторы [9–11]. Однако в опубликованных исследованиях представлены ограниченные данные о воздействии перечисленных пестицидов на нормальные клетки человека, что затрудняет понимание молекулярных эффектов и оценку риска развития ЗНО.

В этом исследовании основное внимание уделено 5 пестицидам, которые широко используются на территории России и стран Содружества Независимых Государств: карбарилу (Car), хлорпирифосу (CPF), манкоцебу (MZ), тираму (Thir) и пендиметалину (PM).

Карбарил — карбаматный инсектицид, отнесенный МАИР к группе 3. С 2006 г. его применение ограничено в странах Европейского союза (ЕС) [12]. Эпи-

демиологические данные свидетельствуют об ассоциации воздействия Car с высоким риском развития множественной миеломы, меланомы, опухолей центральной нервной системы (ЦНС) и, возможно, неходжкинских лимфом [13–16]. В опытах *in vivo* канцерогенность этого агента выявлялась только в сочетании с промотором канцерогенеза 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетатом (ТРА) [17]. Метаболиты Car ассоциированы с повреждением ДНК в сперме человека [18].

Хлорпирифос — фосфорорганический инсектицид, относящийся к группе 3 по классификации МАИР. Его применение ограничено в США и ЕС, но широко используется в странах Азии, включая Индию [19]. Сообщалось о высоком риске развития рака легкого у работников сельского хозяйства, интенсивно применявших CPF, а также об увеличении риска возникновения рака молочной железы у женщин, подвергавшихся воздействию этого агента [20, 21]. CPF оказывал эндокринно-дестабилизирующее действие *in vivo*, которое выражалось в повышении частоты возникновения доброкачественных новообразований, усилении экспрессии прогестерона, а также уменьшении уровня корепрессоров рецептора эстрогенов (ER). Метаболиты CPF могут взаимодействовать с ER α , связываясь аналогично природным лигандам [22, 23].

Манкоцеб и Thir — контактные фунгициды из группы дитиокарбаматов, ранее не оценивавшиеся в монографиях МАИР. Их применение ограничено в ЕС. Согласно эпидемиологическим данным, связи между воздействием MZ, Thir и риском развития неходжкинских лимфом или рака мочевого пузыря не обнаружено [24, 25]. Однако отмечена ассоциация между использованием MZ и высоким риском развития меланомы, опухолей ЦНС и хронического миелоидного лейкоза у фермеров [26–28].

Пендиметалин — гербицид из группы динитроанилинов, который ранее не оценивался МАИР [29]. Согласно эпидемиологическим данным, отмечено повышение риска развития рака прямой кишки и поджелудочной железы у фермеров, использующих этот агент [30, 31].

Цель исследования — изучение молекулярных эффектов пестицидов Car, CPF, MZ, Thir и пендиметалина на модели условно-нормальных человеческих клеток HaCaT и MCF10A, способности этих соединений вызывать повреждения ДНК, их влияния на способность клеток к колониобразованию и действия на экспрессию генов, ассоциированных с канцерогенезом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. В качестве моделей для исследования выбраны условно-нормальные клеточные линии HaCaT (линия иммортализованных кератиноцитов человека) и MCF10A (клетки доброкачественной кисты молочной железы), полученные из биобанка Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина.

Клетки HaCaT культивировали в среде DMEM, содержащей 50 ед/мл стрептомицина, 50 мкг/мл пенициллина, 2 mM L-глутамина (все — «ПанЭко», Россия), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; Biosera, Франция) при 37 °C в присутствии 5 % CO₂. Клетки MCF10A культивировали в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 1 mM L-глутамина, 50 ед/мл стрептомицина и 50 мкг/мл пенициллина, 5 % лошадиной сыворотки (Biowest, Франция), 20 нг/мл эпидермального фактора роста (ProSpec, Израиль), 10 мкг/мл инсулина («ПанЭко», Россия), 0,5 мкг/мл гидрокортизона и 100 нг/мл холерного токсина (оба — Sigma-Aldrich, США).

Химические соединения. В исследовании использованы следующие соединения: Car (CAS: 63-25-2), CPF (CAS: 2921-88-2), MZ (CAS: 8018-01-7), Thir (CAS: 137-26-8), PM (CAS: 40487-42-1), 3-метилхолантрен (MCA) CAS: 56-49-5), TPA CAS: 16561-29-8) (все — Sigma-Aldrich, США). CPF, PM и MCA растворяли в ацетоне, Car и Thir — в метаноле, MZ и TPA — в диметилсульфоксиде (ДМСО). Рабочие растворы всех агентов готовили в ДМСО. Концентрация растворителей в среде составила 0,02 %, ДМСО — 0,2 %.

Определение нетоксичных концентраций с помощью МТТ-теста. Клетки высевали в 96-луночные планшеты (SPL Life Sciences, Корея) по 5×10^3 клеток в лунку, после прикрепления к подложке обрабатывали серийными разведениями пестицидов (50 мкМ — 24,4 нМ для MZ, CPF, PM и Car; 0,5 мкМ — 0,24 нМ для Thir). Через 72 ч добавляли 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (Alfa Aesar, Германия; конечная концентрация 250 мкг/мл), через 4 ч отбирали среду и растворяли кристаллы формазана в 100 мкл ДМСО («ПанЭко», Россия). Оптическую плотность раствора определяли с помощью Multiscan Sky (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 570 нм. Эксперимент проводили не менее 3 раз.

Анализ генотоксического действия пестицидов методом ДНК-комет. Клетки HaCaT высевали в 24-луночные планшеты (SPL Life Sciences, Корея) по 50×10^3 клеток в лунку, MCF10A — по 60×10^3 клеток в лунку, после прикрепления к подложке обрабатывали клетки пестицидами, а также растворителями в соответствующих концентрациях (отрицательный контроль). В качестве положительного контроля использовали H₂O₂ (0,08 %, 20 мин). Через 48 ч клетки снимали с подложки, промывали натрий-фосфатным буфером (PBS) («ПанЭко», Россия), растворяли в 0,7 % легкоплавкой агарозе (1:8 v/v; 37 °C; «ПанЭко», Россия) и наносили на слайд. После застывания агарозы осуществляли лизис клеток (1 ч, 4 °C), затем денатурирующую инкубацию в щелочном растворе (30 мин, 4 °C). Далее слайды промывали и проводили электрофорез в буфере TBE (30 мин, 1 В/см). По окончании электрофореза слайды промывали дистиллированной водой, инкубировали с охлажденным 70 % этанолом и окрашивали раствором красителя SYBR Gold (Invitrogen, США)

в буфере TE («Евроген», Россия) с конечной концентрацией 1:10 000.

Анализ проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axio Observer (Carl Zeiss, Германия) при увеличении 100x. Количество поврежденной ДНК оценивали по моменту хвоста, представляющему произведение длины хвоста и количества мигрировавшей ДНК [32]. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Comet Score. Эксперимент проводили не менее 3 раз.

Анализ влияния пестицидов на способность клеток образовывать колонии. Клетки HaCaT и MCF10A высевали в чашки Петри (диаметр — 60 мм) (SPL Life Sciences, Корея) по 3×10^3 клеток. Через 24 ч клетки обрабатывали пестицидами и ТРА. Далее каждые 72 ч проводили замену среды на свежую с обработкой исследуемыми агентами и растворителями в течение 12 дней. По завершении эксперимента колонии фиксировали метанолом и окрашивали 0,5 % раствором кристаллического фиолетового (Merck, Германия).

Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ с плагином ColonyArea [33]. Эксперимент проводили не менее 3 раз.

Анализ влияния пестицидов на экспрессию генов, ассоциированных с канцерогенезом. Клетки HaCaT и MCF10A высевали в чашки Петри (диаметр = 60 мм) по 250×10^3 и 350×10^3 клеток соответственно. Через 24 ч клетки обрабатывали пестицидами, МСА, ТРА и инкубировали 72 ч. Суммарную РНК экстрагировали с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) по протоколу производителя с последующей обработкой ДНКазой I («Синтол», Россия) и пересадкой. Далее проводили синтез комплементарной ДНК с использованием декануклеотидных праймеров Random со случайной последовательностью («Евроген», Россия) и MMLV-ревертазы («Евроген», Россия) на амплификаторе ТП4-ПЦР-01-Терцик («ДНК-технология», Россия) по следующему протоколу: 37 °C — 35 мин; 70 °C — 10 мин.

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени использовали амплификатор CFX Connect Real-Time PCR (Bio-Rad, США), в качестве регистрируемого сигнала выступала флуоресценция интеркалятора SYBR Green I («Евроген», Россия). Проводили 40 циклов ПЦР (15 с — 95 °C; 20 с — 58 °C; 25 с — 72 °C). Для анализа экспрессии генов использовали запатентованную панель праймеров, разработанную отделом химического канцерогенеза Научно-исследовательского института канцерогенеза Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина» в рамках выполнения кластерного проекта 121120100382-1.

В качестве контрольных генов сравнения использованы ген фактора элонгации 1 альфа 1 (elongation factor 1 alpha 1) *EF1A1* и ген рибосомального белка P0 (60S acidic ribosomal protein P0) *RPLP0*. Эксперимент проводили не менее 5 раз.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения MS Excel и GraphPad Prism 8.3.0. Для оценки нормальности распределения данных использовали критерий Шапиро–Уилка, для определения нетоксичных концентраций пестицидов в МТТ-тесте — метод нелинейной регрессии. В тесте ДНК-комет выбросы в наборах данных определяли с помощью правила межквартильного размаха, статистически значимые различия относительно отрицательного контроля — с использованием непараметрического критерия Краскала–Уоллиса с тестом множественного сравнения Данна. В остальных экспериментах для поиска выбросов применяли метод ROUT ($Q = 1\%$).

В ходе анализа на клоногенность значимость статистических различий относительно отрицательного контроля оценивали с помощью однофакторного теста ANOVA с использованием апостериорного теста Шидека. Изменения уровней экспрессии исследуемых генов при действии пестицидов рассчитывали с применением метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [34]. Для оценки статистической значимости различий применяли двухфакторный тест ANOVA с использованием критерия Даннетта. Во всех экспериментах различия между группами считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние пестицидов сравнивали с действием индуктора канцерогенеза МСА и промотором канцерогенеза ТРА. МСА относится к группе 1 по классификации МАИР (доказана канцерогенность для людей) и широко используется для изучения химического канцерогенеза [35, 36]. ТРА не классифицирован МАИР, однако была показана его способность вызывать развитие опухолей в двухэтапной модели канцерогенеза через активацию протеинкиназы С [37, 38].

Определение нетоксичных концентраций. С помощью МТТ-теста определены максимальные нетоксичные концентрации пестицидов в клетках HaCaT и MCF10A (рис. 1).

Анализ генотоксичности пестицидов. На данном этапе исследования проведен анализ генотоксического действия пестицидов методом ДНК-комет. После обработки клеток HaCaT исследуемыми пестицидами не было зарегистрировано статистически значимого изменения момента хвоста комет относительно действия растворителей, его медианы не превышали $1,8 \times 10^{-2}$ (рис. 2, а).

В клетках MCF10A обнаружены значимое увеличение момента хвоста при действии РМ ($p = 0,035$), а также тенденция к его увеличению для Саг ($p = 0,054$) (см. рис. 2, б). Медиана момента хвоста ($Q_1; Q_3$) для РМ составила $3,7 \times 10^{-5}$ (0; 0,019), что превысило значение для ацетона в 2 раза ($1,9 \times 10^{-5}$ (0; 0,002), по среднему значению — в 3 раза. При действии Саг медиана ($Q_1; Q_3$) момента хвоста оказалась равной $2,4 \times 10^{-5}$ (0; 0,005), что превысило значение для метанола ($7,5 \times 10^{-6}$ (0; 0,0006)) в 3 раза, по среднему значению — в 2,5 раза. Отметим, что клетки HaCaT были менее чувствительны к действию положительного контроля (H_2O_2): медиана момента хвоста была меньше более чем в 20 раз.

Анализ влияния пестицидов на способности клеток образовывать колонии. Далее с помощью клоногенного анализа была изучена способность пестицидов изменять пролиферативный потенциал клеток и оказывать трансформирующее действие. Изменение способности клеток к колониобразованию оценивали при постоянном действии пестицидов в течение 14 дней по проценту площади, взвешенному по интенсивности окрашивания колоний. Отмечено статистически значимое повышение данного показателя — в 1,4 и 2,6 раза при действии Саг в клетках HaCaT (рис. 3, а) и MCF10A (см. рис. 3, б) соответственно, а также в 1,7 раза при действии Thir в клетках HaCaT.

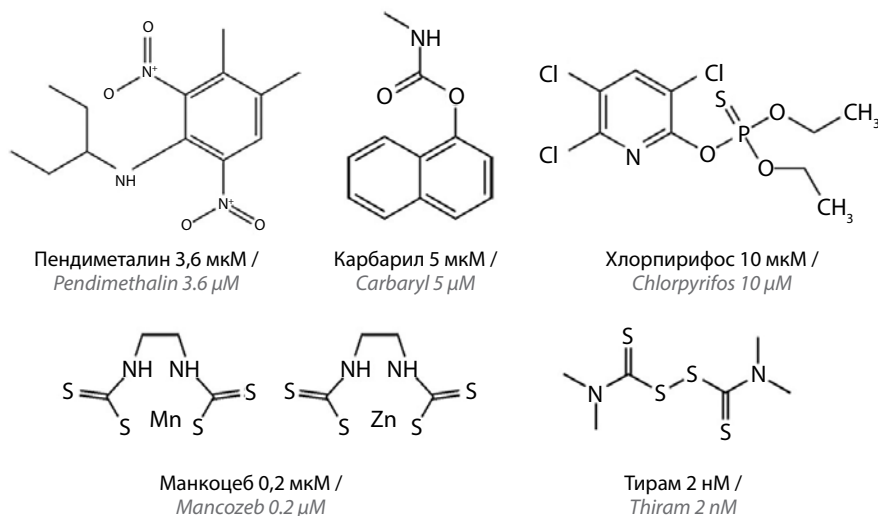


Рис. 1. Химические формулы и максимальные концентрации пестицидов, анализируемых в исследовании
Fig. 1. Chemical formulas and maximal concentrations of pesticides analyzed in the study

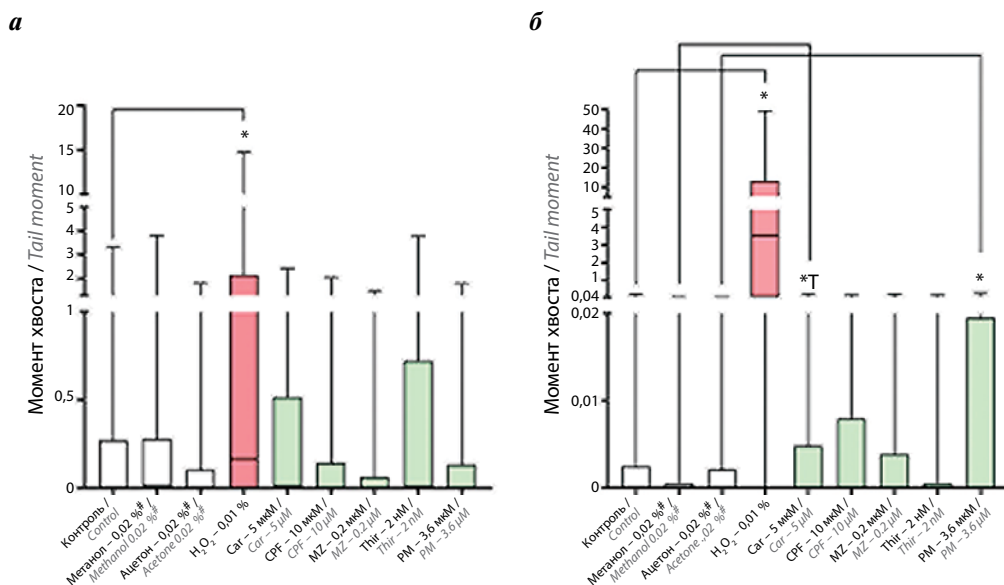


Рис. 2. Результаты анализа генотоксического действия пестицидов на клетки HaCaT (а) и MCF10A (б). Экспозиция к агентам составила 48 ч. Результаты представлены как медиана (25-й квартиль; 75-й квартиль). Контроль – интактные клетки. * – рабочие стоки пестицидов и растворителей готовили в диметилсульфоксиде, концентрация в среде составила 0,2 %; * – различия статистически значимы относительно отрицательного контроля (по растворителю) ($p < 0,05$); *T – тенденция к статистически значимому отличию от отрицательного контроля (растворителя) ($p < 0,05$). Car – карбарил; CPF – хлорпирифос; MZ – манкоцеб; Thir – тирам; PM – пендиметалин

Fig. 2. Results of analysis of genotoxic effect of pesticides on HaCaT (a) and MCF10A (b) cells. Exposition time was 48 h. Results are presented as median (25th quartile; 75th quartile). Control is intact cells. * – working solutions of pesticides and solvents were prepared in dimethyl sulfoxide, concentration in the medium was 0.2 %; * – differences are statistically significant relative to negative control (solvent) ($p < 0.05$); *T – trend towards statistically significant difference from negative control (solvent) ($p < 0.05$). Car – carbaryl; CPF – chlorpyrifos; MZ – mancozeb; Thir – thiram; PM – pendimethalin

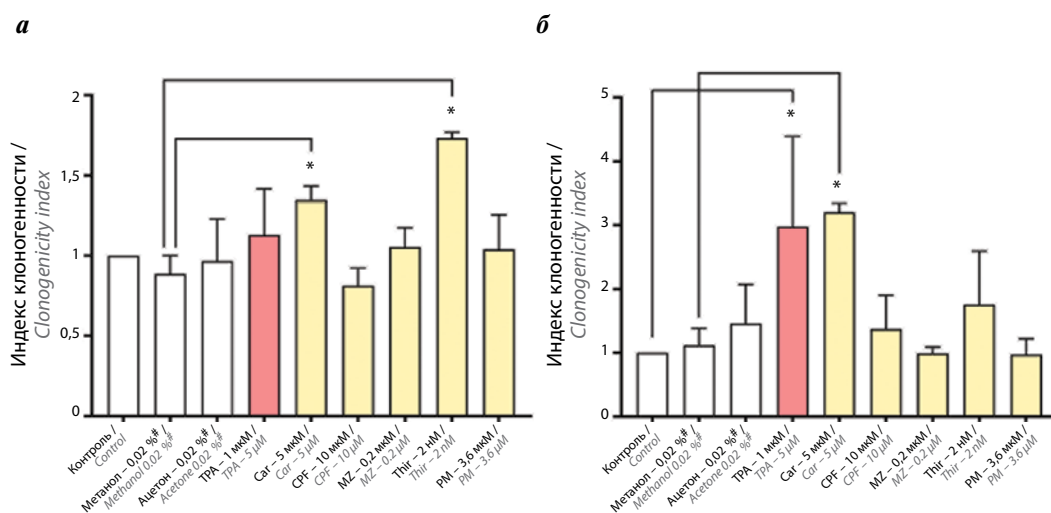


Рис. 3. Результаты анализа влияния пестицидов на способность клеток HaCaT (а) и MCF10A (б) образовывать колонии. Экспозиция к агентам составила 14 дней. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Контроль – интактные клетки. * – рабочие стоки пестицидов и растворителей готовили в диметилсульфоксиде, концентрация в среде составила 0,2 %; * – различия статистически значимы относительно отрицательного контроля (по растворителю) ($p < 0,05$). Car – карбарил; CPF – хлорпирифос; MZ – манкоцеб; Thir – тирам; PM – пендиметалин; TPA – 12-О-тетрадеканойлфторбол-13-ацетат

Fig. 3. Results of analysis of the effect of pesticides on the ability of HaCaT (a) and MCF10A (b) cells to form colonies. Exposure time was 14 days. Results are presented as mean $\pm$ standard deviation. Control is intact cells. * – working solutions of pesticides and solvents were prepared in dimethyl sulfoxide, concentration in the medium was 0.2 %; * – differences are statistically significant relative to negative control (solvent) ($p < 0.05$). Car – carbaryl; CPF – chlorpyrifos; MZ – mancozeb; Thir – thiram; PM – pendimethalin; TPA – 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

Действие агентов сравнивали с промотором канцерогенеза ТРА. Клетки HaCaT были менее чувствительны к действию ТРА, в то время как в клетках MCF10A детектировано повышение числа и интенсивности колоний (в 3 раза).

Анализ влияния пестицидов на гены, ассоциированные с канцерогенезом. Влияние пестицидов оценивали по изменению уровня экспрессии генов биотрансформации, метаболизма, пролиферации, репарации, окислительного стресса, воспаления, апоптоза, инвазии и метастазирования, а также эпигенетической регуляции. Эффекты пестицидов сравнивали с действием индуктора и промотора канцерогенеза – 3-метилхолантрена (МСА) и ТРА соответственно.

Биотрансформация и метаболизм. Канцероген МСА активировал экспрессию генов цитохрома Р450 *CYP1A1* и *CYP1B1*, промотор канцерогенеза ТРА не влиял на гены в HaCaT, но повышал уровень мРНК *CYP1B1* и *AHR* в MCF10A (рис. 4, а).

Пестициды CPF и PM действовали так же, как МСА, вызывая индукцию генов *CYP1A1* и *CYP1B1* в клетках HaCaT и MCF10A. Для Car зарегистрировано слабое понижение генов биотрансформации в клетках HaCaT и слабая активация – в клетках MCF10A. При действии MZ выявлено снижение экспрессии гена *CYP1A1* в HaCaT и повышение экспрессии гена *CYP1B1* в MCF10A. Клетки HaCaT реагировали на обработку канцерогенами снижением экспрессии генов метаболизма глюкозы *GLUT1*, *GLUT3*, *6PF2K*, *LDHA* и *MCT1* (см. рис. 4, б), в то время как в клетках MCF10A зарегистрировано повышение экспрессии генов *GLUT1* и *GLUT3*. Все исследуемые пестициды оказывали влияние на гены метаболизма глюкозы. В клетках HaCaT выявлено снижение экспрессии генов *GLUT3* и *MCT1* под действием PM и MZ соответственно, в клетках MCF10A Car ингибировал экспрессию *GLUT1*, а CPF, Thir и PM повышали уровень мРНК гена *GLUT3*.

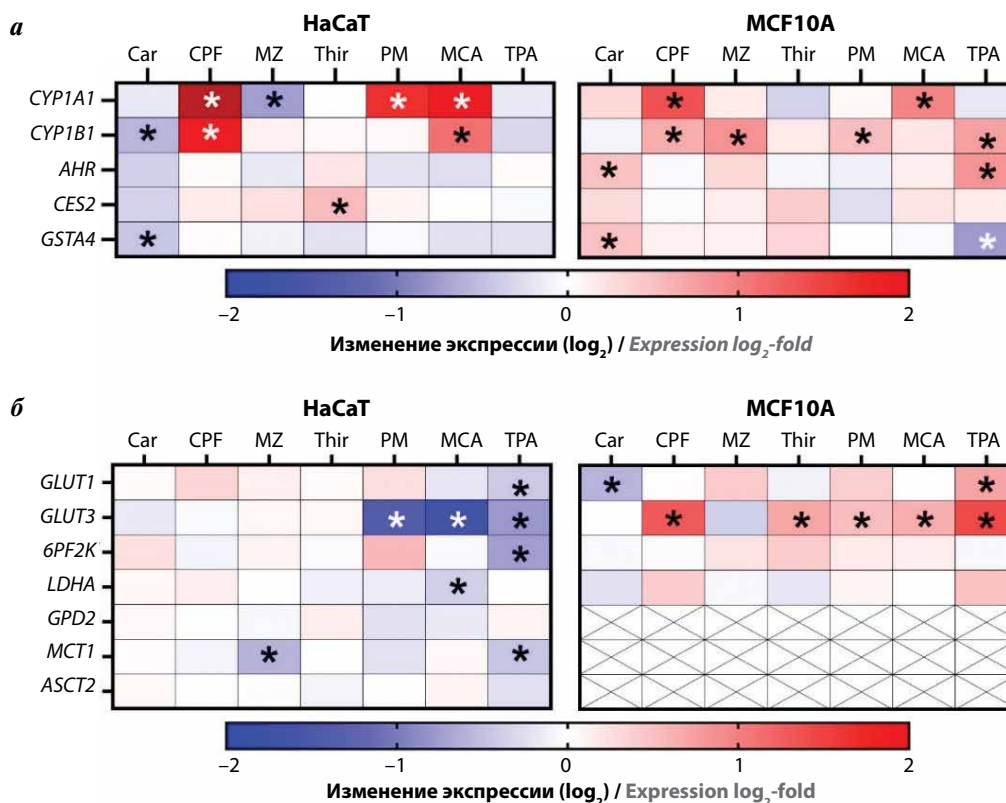


Рис. 4. Результаты анализа влияния пестицидов, 3-метилхолантрена (МСА) и 12-О-тетрадеканойлфторбол-13-ацетата (ТРА) на экспрессию генов, ассоциированных с биотрансформацией ксенобиотиков (а) и метаболизмом (б) в клетках HaCaT и MCF10A. Зачеркиванием обозначено, что экспрессию гена не оценивали. Экспозиция к агентам составила 72 ч. Результаты полимеразной цепной реакции в реальном времени выражены через $\log_2$. * – различия статистически значимы относительно отрицательного контроля ($p < 0,05$). Car – карбарил; CPF – хлорпирифос; MZ – манкоцеб; Thir – тирам; PM – пендиметалин

Fig. 4. Results of analysis of the effect of pesticides, 3-methylcholanthrene (MCA) and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) on expression of genes associated with xenobiotic biotransformation (a) and metabolism (b) in HaCaT and MCF10A cells. Crossing out denotes that gene expression was not evaluated. Exposure time was 72 h. Results of real-time polymerase chain reaction are presented as $\log_2$. * – differences are statistically significant relative to negative control ($p < 0.05$). Car – carbaryl; CPF – chlorpyrifos; MZ – mancozeb; Thir – thiram; PM – pendimethalin

Пролиферация и репарация. Канцероген МСА вызывал индукцию генов пролиферации *CCND2*, *CCNE1*, *AURKA*, *FOSL1* и *MCM5* в клетках HaCaT и не влиял на экспрессию генов в клетках MCF10A, в свою очередь, ТРА вызывал сильную индукцию генов пролиферации (*CCND1*, *CCND2*, *CCNE1*, *Ki-67*, *AURKA*, *FOSL1* и *FOXM1*) в клетках обеих линий (рис. 5, а).

Пестицид CPF вызывал слабое снижение экспрессии генов *CCND2*, *Ki-67* и индуцировал экспрессию

гена *E2F4*. Для MZ показано повышение экспрессии генов *CCND2*, *CCNE1* и *Ki-67*, PM незначительно повышал экспрессию генов *CDK6* и *CCNE1* и снижал экспрессию гена *CCND1*. В клетках MCF10A детектирована слабая активация генов *CCND2* и *Ki-67* при действии Car и Thir соответственно.

Экспрессия генов репарации при действии исследуемых агентов различалась в клетках HaCaT и MCF10A. В клетках HaCaT МСА активировал экспрессию генов

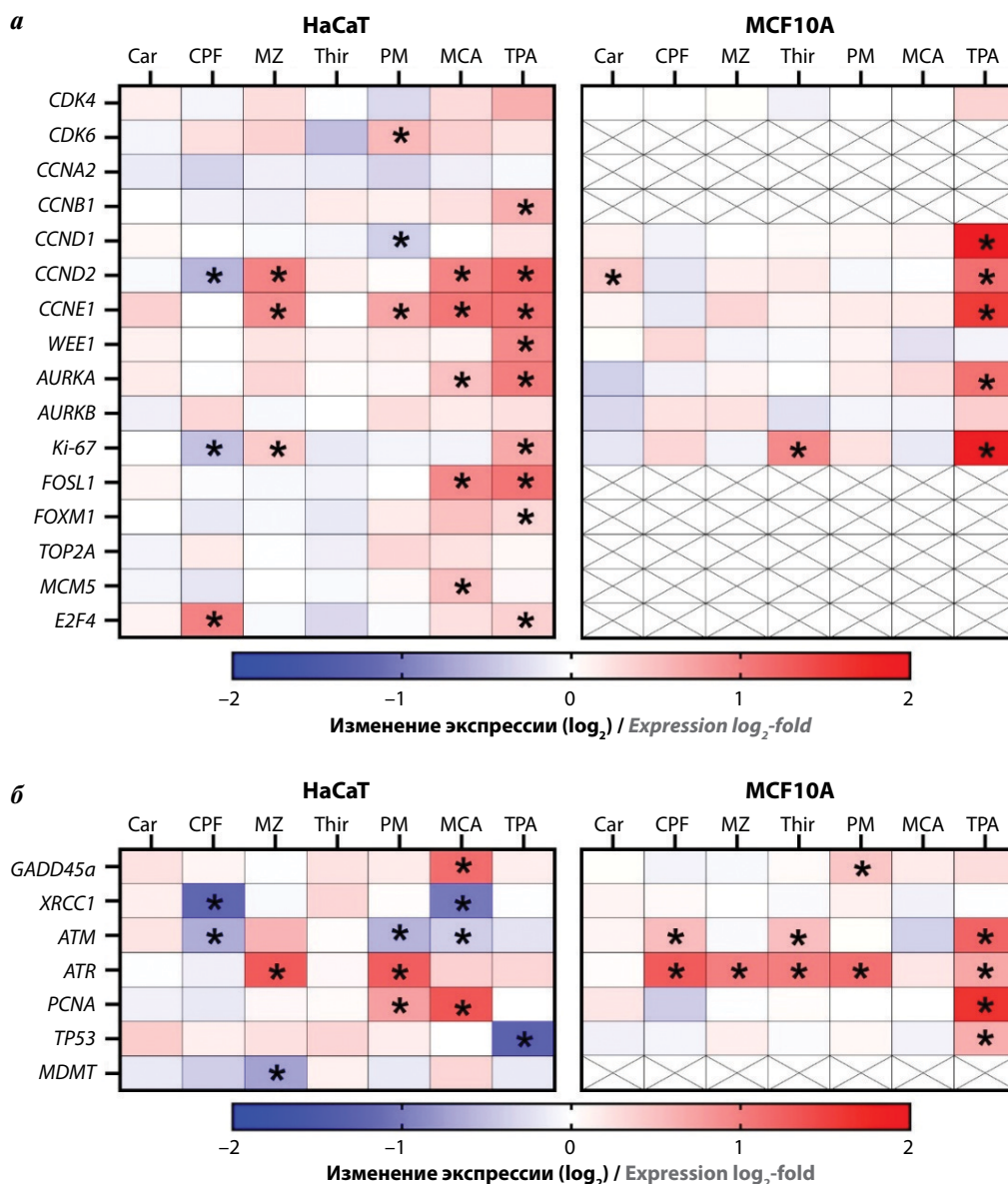


Рис. 5. Результаты анализа влияния пестицидов, 3-метилхолантрена (МСА) и 12-О-тетрадеканойлфторбол-13-ацетата (ТРА) на экспрессию генов, ассоциированных с пролиферацией (а) и репарацией (б) в клетках HaCaT и MCF10A. Зачеркиванием обозначено, что экспрессию гена не оценивали. Экспозиция к агентам составила 72 ч. Результаты полимеразной цепной реакции в реальном времени выражены через $\log_2$. * – различия статистически значимы относительно отрицательного контроля ($p < 0,05$). Car – карбарил; CPF – хлорпирифос; MZ – манкоцеб; Thir – тирам; PM – пендиметалин

Fig. 5. Results of analysis of the effect of pesticides, 3-methylcholanthrene (MCA) and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) on expression of genes associated with proliferation (a) and repair (b) in HaCaT and MCF10A cells. Crossing out denotes that gene expression was not evaluated. Exposure time was 72 h. Results of real-time polymerase chain reaction are presented as $\log_2$. * – differences are statistically significant relative to negative control ($p < 0.05$). Car – carbaryl; CPF – chlorpyrifos; MZ – mancozeb; Thir – thiram; PM – pendimethalin

GADD45a и *PCNA* и подавлял экспрессию генов *XRCC1* и *ATM*, в клетках MCF10A наблюдалось отсутствие эффектов; ТРА снижал экспрессию генов *TP53* в клетках HaCaT и активировал гены *ATM*, *ATR*, *PCNA* и *TP53* в клетках MCF10A (рис. 5, б). Пестициды CPF и PM в клетках HaCaT действовали так же, как и MCA: в первом случае происходила репрессия генов *XRCC1* и *ATM*, а во втором – подавление генов *ATM*, *ATR*

и активация гена *PCNA*. MZ активировал ген *ATR* и снижал экспрессию гена *MGMT*. В клетках MCF10A агенты CPF, MZ, Thir и PM активировали ген *ATR*, PM также слабо повышал экспрессию гена *GADD45a*, а CPF и Thir – гена *ATM*. Пестицид Car не влиял на экспрессию генов репарации.

Окислительный стресс, воспаление и апоптоз. Канцероген MCA не вызывал изменения экспрессии генов

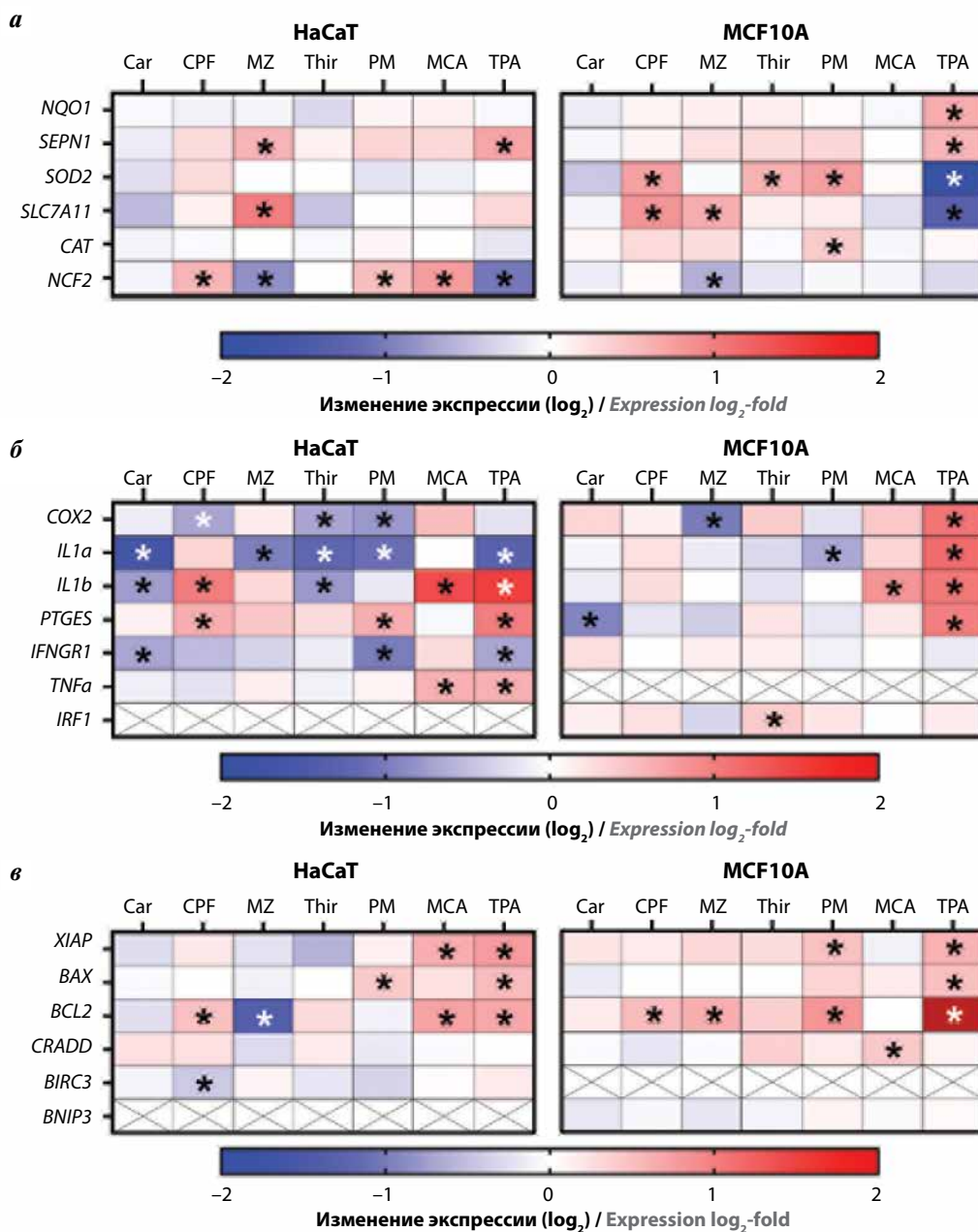


Рис. 6. Результаты анализа влияния пестицидов, 3-метилхолантрена (MCA) и 12-О-тетрадеканойлфторбол-13-ацетата (TPA) на экспрессию генов, ассоциированных с окислительным стрессом (а), воспалением (б) и апоптозом (в) в клетках HaCaT и MCF10A. Зачеркиванием обозначено, что экспрессию гена не оценивали. Экспозиция к агентам составила 72 ч. Результаты полимеразной цепной реакции в реальном времени выражены через log₂ * – различия статистически значимы относительно отрицательного контроля (p < 0,05). Car – карбарил; CPF – хлорпирифос; MZ – манкозеп; Thir – тирам; PM – пендиметалин

Fig. 6. Results of analysis of the effect of pesticides, 3-methylcholanthrene (MCA) and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) on expression of genes associated with oxidative stress (a), inflammation (b) and apoptosis (c) in HaCaT and MCF10A cells. Crossing out denotes that gene expression was not evaluated. Exposure time was 72 h. Results of real-time polymerase chain reaction are presented as log₂ * – differences are statistically significant relative to negative control (p < 0.05). Car – carbaryl; CPF – chlorpyrifos; MZ – mancozeb; Thir – thiram; PM – pendimethalin

окислительного стресса, за исключением активации гена *NCF2*, необходимого для генерации супероксид-аниона (рис. 6, а).

В клетках HaCaT ТРА вызывал подавление гена *NCF2* и активировал ген *SEPNI*, а в клетках MCF10A активировал антиоксидантные гены *NQO1* и *SEPNI* и снижал уровень экспрессии генов *SOD2* и *SLC7A11*. При действии CPF происходила активация гена *NCF2* в клетках HaCaT и *SOD2*, *SLC7A11* — в клетках MCF10A. Пестицид MZ активировал экспрессию генов *SEPNI* и *SLC7A11* и подавлял ген *NCF2* в обеих клеточных линиях. РМ вызывал повышение уровня экспрессии *NCF2* в клетках HaCaT и активацию антиоксидантных генов *SOD2* и *CAT* в MCF10A.

Все исследуемые агенты влияли на экспрессию генов воспаления. При действии MCA отмечено повышение экспрессии генов *IL1b* и *TNFA* (см. рис. 6, б). В клетках HaCaT ТРА активировал экспрессию генов *IL1b*, *PTGES* и *TNFA*, одновременно подавляя *IL1a* и *IFNGR1*, а в клетках MCF10A вызывал индукцию генов *COX2*, *IL1a*, *IL1b* и *PTGES*. Обработка Car вызывала снижение уровня экспрессии генов *IL1a*, *IL1b*, *IFNGR1* в HaCaT и гена *PTGES* в MCF10A. При действии CPF происходило повышение уровня экспрессии генов *PTGES* и *IL1b* и слабое снижение экспрессии гена *COX2* в клетках HaCaT. Пестицид MZ подавлял *IL1a* в клетках HaCaT и *COX2* в MCF10A, Thir ингибировал экспрессию генов *COX2*, *IL1a*, *IL1b* в клетках HaCaT и повышал уровень экспрессии гена *IRF1* в MCF10A. В клетках HaCaT агент РМ действовал подобно ТРА — подавлял экспрессию генов *COX2*, *IL1a* и *IFNGR1* и активировал ген *PTGES*, в клетках MCF10A — только подавлял экспрессию гена *IL1a*.

Канцероген MCA повышал уровень экспрессии антиапоптотических генов *XIAP* и *BCL2* в HaCaT и активировал проапоптотический ген *CRADD* в MCF10A

(см. рис. 6, в). В свою очередь, ТРА активировал экспрессию генов *XIAP* и *BCL2* и повышал уровень экспрессии проапоптотического гена *BAX*. Пестицид CPF активировал экспрессию *BCL2* в обеих линиях и подавлял ген ингибитора апоптоза *BIRC3* — в клетках HaCaT. Экспрессия гена *BCL2* была понижена в клетках HaCaT и повышена в MCF10A при действии MZ. Пестицид РМ активировал *BAX* в линии HaCaT и *XIAP*, *BCL2* — в MCF10A.

Инвазия и метастазирование. В линии HaCaT MCA и ТРА активировали экспрессию гена *CDH2*, а также снижали экспрессию гена *SERPINE1* (рис. 7).

В клетках MCF10A MCA вызывал снижение экспрессии гена *CDH2*, а ТРА активировал гены *CDH1*, *CDH2*, *ROCK2* и *SERPINE1* и подавлял ген *MMP2*. Пестицид Car снижал уровень экспрессии генов *MMP2* и *SERPINE1* в клетках MCF10A, уменьшал экспрессию гена *ROCK2* в клетках HaCaT и повышал экспрессию в клетках MCF10A. При действии CPF происходила репрессия гена *SERPINE1* в линии HaCaT и активация гена *ROCK2* в MCF10A. MZ в клетках MCF10A повышал уровень экспрессии гена *CDH2* и снижал экспрессию гена *MMP2*. В клетках MCF10A Thir индуцировал экспрессию гена *ROCK2*. В клетках HaCaT РМ вызывал слабую активацию гена *MMP2* и подавлял ген *SERPINE1*, в клетках MCF10A активировал *CDH2*.

Эпигенетическая регуляция транскрипции. При действии MCA на клетки HaCaT происходило слабое повышение экспрессии генов *HDAC2*, *BRD4* и *KAT5*, при этом в клетках MCF10A влияния этого агента зарегистрировано не было (рис. 8).

Промотор канцерогенеза ТРА влиял на экспрессию генов эпигенетической регуляции только в клетках MCF10A: происходило повышение уровня мРНК генов *DNMT1*, *DNMT3b* и *BRD2* и подавление экспрес-

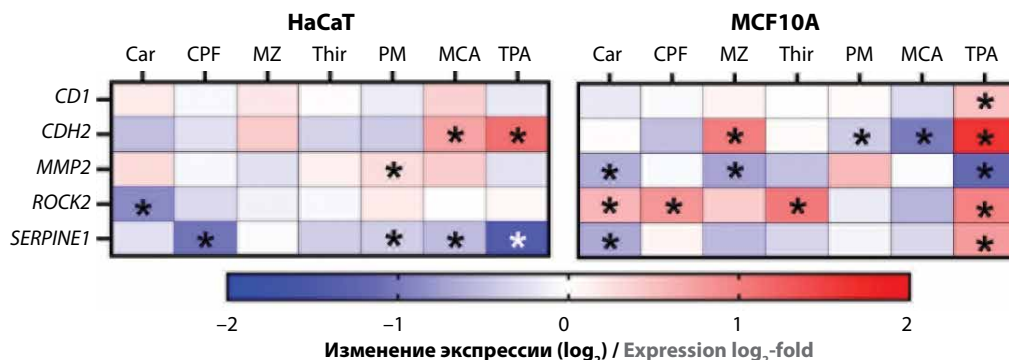


Рис. 7. Результаты анализа влияния пестицидов, 3-метилхолантрена (MCA) и 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата (TPA) на экспрессию генов, ассоциированных инвазией и метастазированием в клетках HaCaT и MCF10A. Экспозиция к агентам составила 72 ч. Результаты полимеразной цепной реакции в реальном времени, выражены через $\log_2$. * — различия статистически значимы относительно отрицательного контроля ($p < 0,05$). Car — карбарил; CPF — хлорпирифос; MZ — манкоцеб; Thir — тирам; PM — пендиметалин

Fig. 7. Results of analysis of the effect of pesticides, 3-methylcholanthrene (MCA) and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) on expression of genes associated with invasion and metastasis in HaCaT and MCF10A cells. Exposure time was 72 h. Results of real-time polymerase chain reaction are presented as $\log_2$. * — differences are statistically significant relative to negative control ($p < 0.05$). Car — carbaryl; CPF — chlorpyrifos; MZ — mancozeb; Thir — thiram; PM — pendimethalin

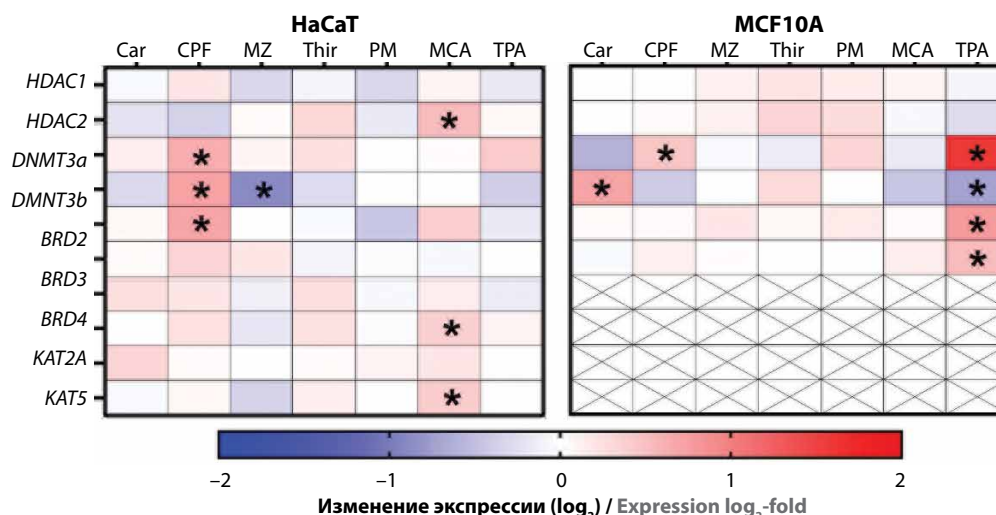


Рис. 8. Результаты анализа влияния пестицидов, метилхолантрена (MCA) и 12-О-тетрадеканойлфторбол-13-ацетата (TPA) на экспрессию генов, ассоциированных с эпигенетической регуляцией транскрипции в клетках HaCaT и MCF10A. Зачеркиванием обозначено, что экспрессию гена не оценивали. Экспозиция к агентам составила 72 ч. Результаты полимеразной цепной реакции в реальном времени выражены через log₂. * – различия статистически значимы относительно отрицательного контроля, $p < 0,05$. Car – карбарил; CPF – хлорпирифос; MZ – манкоцеб; Thir – тирам; PM – пендиметалин

Fig. 8. Results of analysis of the effect of pesticides, 3-methylcholanthrene (MCA) and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) on expression of genes associated with epigenetic transcription regulation in HaCaT and MCF10A cells. Crossing out denotes that gene expression was not evaluated. Exposure time was 72 h. Results of real-time polymerase chain reaction are presented as log₂. * – differences are statistically significant relative to negative control ($p < 0.05$). Car – carbaryl; CPF – chlorpyrifos; MZ – mancozeb; Thir – thiram; PM – pendimethalin

сии гена *DNMT3a*. Пестициды Car и CPF повышали экспрессию генов *DNMTs*: Car вызывал активацию гена *DNMT3a* в клетках MCF10A, CPF – активацию генов *DNMT1*, *DNMT3a* и *DNMT3b* в клетках HaCaT и гена *DNMT1* в клетках MCF10A. MZ приводил к репрессии гена *DNMT3a* в клетках HaCaT.

ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование посвящено анализу молекулярных эффектов пестицидов Car, CPF, Thir, MZ и PM, активно применяемых на территории России и стран СНГ.

В тесте ДНК-комет 5 мкМ Car при 48-часовой экспозиции вызывал небольшое повреждение ДНК в клетках MCF10A при отсутствии значимых эффектов на гены репарации. Будучи ароматическим углеводородом, Car активирует AhR-зависимый сигналинг [39, 40]. Мы отметили активацию генов биотрансформации *AHR* и *GSTA4* в клетках MCF10A и снижение экспрессии *CYP1B1* и *GSTA4* в HaCaT. При этом в исследовании N. Lédérac и соавт. выявили индукцию фермента CYP1A1 в клетках печени Hep2G и клетках HaCaT при действии 75 мкМ Car [41]. Низкая индукция биотрансформации в нашем исследовании связана, вероятно, с меньшей дозой инсектицида, а снижение экспрессии генов биотрансформации в клетках HaCaT – с отрицательной обратной связью [42]. В клонотическом анализе длительное воздействие Car способствовало усилению пролиферации клеток HaCaT и MCF10A, увеличению числа и размера колоний. В то же время Car не вызывал значимых измене-

ний экспрессии генов пролиферации. Q. Saquib и соавт. показали генотоксичность 1 мМ Car на HUVEC, а также повышение АФК и активацию апоптоза [43]. Однако в нашем исследовании экспрессия генов окислительного стресса и апоптоза не менялась. При этом отмечено снижение экспрессии гена – транспортера глюкозы *GLUT1*, что может свидетельствовать об окислительном стрессе [44, 45]. Также было показано снижение экспрессии генов воспаления *IL1a*, *IL1b*, *PTGES*, *IFNGR1*, что соотносится с результатами исследования S.G. Jorsaraei и соавт. [46].

В настоящем исследовании CPF (10 мкМ) не вызывал повреждения ДНК в клетках HaCaT и MCF10A, но влиял на экспрессию генов репарации *XRCC1*, *ATM* и *ATR*. В литературе описаны повреждение ДНК лимфоцитов, а также активация генов эксцизионной репарации в клетках A549 после воздействия CPF [47, 48]. В нашем исследовании CPF слабо снижал экспрессию генов пролиферации (*CCND2*, *Ki-67*) и активировал ген *E2F4* в клетках HaCaT, но не влиял на клонотическую способность. Однако, согласно данным P. Balakrishnan и соавт., воздействие 4 мкМ CPF вызывает генотоксичность, а также увеличивает пролиферативную активность в эмбриональных клетках печени WRL-68 при схожем влиянии на гены репарации и пролиферации [49]. Также сообщалось, что низкие дозы CPF (0,05 мкМ) стимулируют пролиферацию клеток MCF7 и MDA-MB-231 [50]. Отсутствие эффекта на клетках MCF10A в нашем исследовании, скорее всего, связано с меньшей дозой, особенностями метаболизма клеток HaCaT, MCF10A и WRL-68, а также с низким уровнем

ЕР в MCF10A [51]. Влияние CPF как эндокринного дизраптора зависит от активности ЕР и не проявляется в ЕР-отрицательных клетках [52–54]. В ходе настоящего исследования подтверждена индукция генов *CYP1A1*, *CYP1B1*, что согласуется с данными о метаболизме CPF через активацию AhR и CYP [50, 55]. Кроме того, впервые выявлена активация гена *GLUT3* под действием этого агента, аналогично канцерогенным агентам МСА и ТРА. Показано, что CPF вызывает оксидативный стресс и воспаление *in vitro* и *in vivo* [56, 57]. В нашем исследовании CPF активировал ген окислительного стресса *NCF2*, антиоксидантные гены *SOD2*, *SLC7A11*, а также гены воспаления *IL1b* и *PTGES*. Хроническое воздействие CPF снижает апоптоз в нормальных клетках печени [49]. В нашем исследовании также выявлено повышение экспрессии *BCL2* в клетках HaCaT и MCF10A. На моделях рака молочной железы показано усиление миграционного потенциала клеток при действии CPF [58]. В нашем исследовании детектировано влияние CPF на ген *ROCK2* в клетках MCF10A и ген *SERPINE1* в клетках HaCaT. Р. Balakrishnan и соавт. выявили снижение экспрессии генов *DNMTs* при экспозиции CPF 24 ч [49]. Напротив, мы наблюдали слабую активацию генов *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b* после 72 ч обработки, что может свидетельствовать о компенсационном механизме. При этом ранее в рамках скрининга эпигенетической активности ксенобиотиков для CPF нами не было обнаружено интегральной эпигенетической активности в тест-системе HeLa TI (данные не опубликованы).

В клетках HaCaT и MCF10A не выявлено генотоксической активности при действии MZ и Thir. При этом MZ активировал экспрессию гена *ATR*, а Thir — генов *ATR* и *ATM*. Ранее сообщалось о генотоксичных эффектах MZ и Thir *in vitro* и *in vivo* [59, 60]. В клетках HeLa TI для Thir (2 мкМ) наблюдались усиление повреждения ДНК и изменение экспрессии генов репарации *DDDB2*, *ERCC5*, *LIG4* и *ERCC3* [61]. Согласно данным литературы, MZ и Thir активируют ферменты CYP [62–65]. Результаты нашего исследования показали менее выраженные эффекты этих агентов: MZ оказывал слабое влияние на гены *CYP1A1* и *CYP1B1*, Thir — на ген *CES2*. В группе генов метаболизма фунгициды незначительно влияли на экспрессию *MCT1* (MZ) и *GLUT3* (Thir). В клетках HaCaT MZ активировал экспрессию генов пролиферации *CCND2*, *CCNE1* и *Ki-67*, однако в клоногенном анализе мы не наблюдали эффектов. В свою очередь, Thir стимулировал пролиферацию клеток HaCaT в клоногенном тесте, но в меньшей степени влиял на экспрессию генов, что может быть связано с кумулятивным эффектом. Ранее мы выявили, что Thir ингибирует рост колоний клеток HeLa TI в диапазоне концентраций 0,5–2 мкМ [61]. По данным К. Кумаг и соавт., MZ индуцирует образование АФК, дисбаланс белков BCL-2 и апоптоз в клетках рака желудка при отсутствии ток-

сичности в нормальных клетках [66]. В нашем исследовании MZ вызывал снижение экспрессии гена *NCF2* при повышении экспрессии генов *SEPNI* и *SLC7A11*, что соответствует запуску антиоксидантной защиты. Кроме того, происходило снижение уровня экспрессии генов воспаления *COX2*, *IL1a* и антиапоптотического гена *BCL2* в клетках HaCaT. При действии Thir происходила активация экспрессии антиоксидантного гена *SOD2* в MCF10A, а также снижение экспрессии генов воспаления *COX2*, *IL1a*, *IL1b*, при этом не наблюдалось влияния на экспрессию генов апоптоза. Полученные данные согласуются с результатами D. Kurpios-Pies и соавт. о противовоспалительном эффекте Thir [67]. Существенных изменений в экспрессии генов инвазии и метастазирования под действием этого агента не выявлено, однако в MCF10A наблюдалась активация генов *CDH2*, *ROCK2* и снижение экспрессии *MMP2*, аналогично эффекту ТРА. Для MZ показано снижение экспрессии гена *DNMT3a* в клетках HaCaT; Thir не оказывал влияния на гены эпигенетической регуляции транскрипции в обеих клеточных линиях. При этом ранее на тест-системе HeLa TI продемонстрирована способность Thir реактивировать экспрессию эпигенетически репрессированного гена *GFP* [61].

Результаты настоящего исследования продемонстрировали способность РМ вызывать повреждение ДНК в клетках MCF10A при отсутствии эффекта в клетках HaCaT, а также активировать гены репарации *ATR* и *PCNA*. По данным литературы, РМ вызывал разрывы ДНК, а также способствовал образованию микроядер в первичных лимфоцитах человека и клетках HUVEC [43, 68, 69]. Результаты клоногенного анализа показали отсутствие цитотоксического или пролиферативного действий при длительной экспозиции РМ, в то же время зарегистрировано слабое влияние РМ на экспрессию генов пролиферации. В данной работе впервые показана способность РМ активировать экспрессию генов *CYP1A1* и *CYP1B1* в клетках человека. Отметим также снижение уровня экспрессии гена *GLUT3* в клетках HaCaT. Для РМ показана индукция окислительного стресса на модели *in vivo* и *in vitro* [69, 70]. В нашем исследовании при действии РМ выявлена индукция экспрессии антиоксидантных генов *CAT* и *SOD2* в клетках MCF10A, в то время как в клетках HaCaT повышалась экспрессия гена *NCF2*, ассоциированного с продуцированием АФК. Также РМ значительно снижал экспрессию провоспалительных генов *COX2*, *IL1a* и *IFNGR1* в клетках HaCaT, что соотносится с данными литературы [70]. В клетках HaCaT происходила активация экспрессии проапоптотического гена *BAX*, а в клетках MCF10A — антиапоптотических генов *XIAP* и *BCL2*. Также выявлено, что РМ оказывает как про-, так и антиапоптотическое действие [71–73]. Влияние этого агента на инвазию и метастазирование ранее не изучалось. В данном исследовании показано слабое действие РМ на гены *CDH2*, *MMP2* и *SERPINE1*. РМ не изменял экспрессию генов

эпигенетических ферментов, что согласуется с полученными ранее результатами об отсутствии эпигенетической активности РМ в тест-системе HeLa TI (данные не опубликованы).

Таким образом, выявлена пропролиферативная активность Car и Thir в клоногенном тесте при долгосрочном воздействии, при кратковременном воздействии их влияние на молекулярные процессы оказалось незначительным. Следует отметить, что в других моделях *in vitro* Thir значительно воздействовал на эпигенетическую активность и пролиферацию, что обуславливает необходимость его дальнейшего исследования. Несмотря на отсутствие повреждения ДНК при действии CPF, профиль экспрессии генов биотрансформации, метаболизма, репарации, окислительного стресса и инвазии при его действии схож с эффектом индуктора и промотора канцерогенеза — МСА и ТРА соответственно, что говорит о потенциальной опасности данного пестицида и необходимости дальнейшего анализа его механизма действия. Особое внимание привлекает влияние CPF на гены *DNMTs*, указывающее на его способность модифицировать эпигенетическую регуляцию транскрипции. Гербицид РМ также проявил сходный с МСА и ТРА профиль воздействия на экспрессию генов, связанных с биотрансформацией, метаболизмом, окислительным стрессом и апоптозом. По этому агенту в литературе имеется ограниченное количество механистических и экспериментальных данных, что указывает на необходимость дальнейшего исследования его воздействий. Для МЗ показано отсутствие генотоксического эффек-

та и влияния на клоногенность клеток, однако он воздействовал на отдельные гены процессов пролиферации, репарации, воспаления, апоптоза и инвазии. Влияние МЗ на экспрессию гена *DNMT3a* демонстрирует необходимость анализа его эпигенетических свойств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данного исследования впервые изучена способность пестицидов Car, Thir, МЗ и РМ влиять на клоногенный потенциал нормальных клеток, а также проведена интегральная оценка влияния агентов на процессы канцерогенеза на транскрипционном уровне. Выявлено, что наибольшее воздействие на процессы, ассоциированные с канцерогенезом, оказывали РМ, CPF и Car.

Одним из важных аспектов является наблюдаемая вариабельность чувствительности различных клеточных моделей к воздействию пестицидов. Анализ данных литературы и результатов наших экспериментов показал, что в оценке канцерогенного потенциала необходимо использовать как нормальные, так и опухолевые клетки. Это обусловлено тем, что опухолевые клетки, по всей видимости, обладают повышенными метаболической активностью и чувствительностью к ксенобиотикам. Для полноценной и адекватной оценки канцерогенного риска требуются дальнейшие исследования с накоплением механистических данных по действию указанных пестицидов на дополнительных клеточных моделях и дальнейший комплексный анализ молекулярных механизмов их действия.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. World Health Organization. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. Available at: <https://www.who.int/ru/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>
2. Cancer Tomorrow — IARC. Estimated number of new cases from 2022 to 2050, Both sexes, age [0–85+]. Available at: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?years=2050>
3. Wan N.F., Fu L., Dainese M. et al. Pesticides have negative effects on non-target organisms. *Nat Commun* 2025;16(1):1360. DOI: 10.1038/s41467-025-56732-x
4. Stockholm Convention. The 12 initial POPs under the Stockholm Convention. Available at: <https://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/The12initialPOPs/tabid/296>
5. IARC. Agents classified by the IARC Monographs, Volumes 1–139. 2025. Available at: <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>
6. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. 2019. Available at: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/50b79369-9249-4486-ac07-9098d07df60a/content>
7. IARC. Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for the IARC Monographs during 2025–2029. 2024. Available at: <https://www.iarc.who.int/news-events/advisory-group-recommendations-on-priorities-for-the-iarc-monographs-during-2025-2029/>
8. Smith M.T., Guyton K.Z., Gibbons C.F. et al. Key Characteristics of carcinogens as a basis for organizing data on mechanisms of carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 2016;124(6):713–21. DOI: 10.1289/ehp.1509912
9. Aataei M., Abdollahi M. A systematic review of mechanistic studies on the relationship between pesticide exposure and cancer induction. *Toxicol Appl Pharmacol* 2022;456:116280. DOI: 10.1016/j.taap.2022.116280
10. Shekhar C., Khosya R., Thakur K. et al. A systematic review of pesticide exposure, associated risks, and long-term human health impacts. *Toxicol Rep* 2024;13:101840. DOI: 10.1016/j.toxrep.2024.101840
11. Sule R.O., Condon L., Gomes A.V. A Common Feature of Pesticides: Oxidative Stress-The Role of Oxidative Stress in Pesticide-Induced Toxicity. *Oxid Med Cell Longev* 2022;2022:5563759. DOI: 10.1155/2022/5563759
12. Gunasekara A.S., Rubin A.L., Goh K.S. et al. Environmental fate and toxicology of carbaryl. *Rev Environ Contam Toxicol* 2008;196:95–121. DOI: 10.1007/978-0-387-78444-1_4
13. De Roos A.J., Schinasi L.H., Miligi L. et al. Occupational insecticide exposure and risk of non-Hodgkin lymphoma: A pooled case-control study from the InterLymph Consortium. *Int J Cancer* 2021;149(10):1768–86. DOI: 10.1002/ijc.33740
14. Presutti R., Harris S.A., Kachuri L. et al. Pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in men: An analysis of the North

- American Pooled Project. *Int J Cancer* 2016;139(8):1703–14. DOI: 10.1002/ijc.30218
15. Koutros S., Harris S.A., Spinelli J.J. et al. Non-Hodgkin lymphoma risk and organophosphate and carbamate insecticide use in the north American pooled project. *Environ Int* 2019;127:199–205. DOI: 10.1016/j.envint.2019.03.018
 16. Erickson P.A., Andreotti G., Remigio R.V. et al. Carbaryl use and incident cancer in the Agricultural Health Study: an updated analysis. *Int J Hyg Environ Health* 2025;268:114615. DOI: 10.1016/j.ijheh.2025.114615
 17. Shukla Y., Antony M., Mehrotra N.K. Carcinogenic and cocarcinogenic studies with carbaryl following topical exposure in mice. *Cancer Lett* 1992;62(2):133–40. DOI: 10.1016/0304-3835(92)90183-v
 18. Meeker J.D., Singh N.P., Ryan L. et al. Urinary levels of insecticide metabolites and DNA damage in human sperm. *Hum Reprod* 2004;19(11):2573–80. DOI: 10.1093/humrep/deh444
 19. Nandi N.K., Vyas A., Akhtar M.J., Kumar B. The growing concern of chlorpyrifos exposures on human and environmental health. *Pestic Biochem Physiol* 2022;185:105138. DOI: 10.1016/j.pestbp.2022.105138
 20. Lee W.J., Blair A., Hoppin J.A. et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(23):1781–9. DOI: 10.1093/jnci/djh324
 21. Tayour C., Ritz B., Langholz B. et al. A case-control study of breast cancer risk and ambient exposure to pesticides. *Environ Epidemiol* 2019;3(5):e070. DOI: 10.1097/EE9.0000000000000070
 22. Ventura C., Nieto M.R., Bourguignon N. et al. Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016;156:1–9. DOI: 10.1016/j.jsmb.2015.10.010
 23. Hazarika J., Ganguly M., Borgohain G. et al. Endocrine disruption: molecular interactions of chlorpyrifos and its degradation products with estrogen receptor. *Structural Chemistry* 2020;31:2011–21. DOI: 10.1007/s11224-020-01562-4
 24. Leon M.E., Schinasi L.H., Lebaillly P. et al. Pesticide use and risk of non-Hodgkin lymphoid malignancies in agricultural cohorts from France, Norway and the USA: a pooled analysis from the AGRICOH consortium. *Int J Epidemiol* 2019;48(5):1519–35. DOI: 10.1093/ije/dyz017
 25. Koutros S., Silverman D.T., Alavanja M.C. et al. Occupational exposure to pesticides and bladder cancer risk. *Int J Epidemiol* 2016;45(3):792–805. DOI: 10.1093/ije/dyv195
 26. Dennis L.K., Lynch C.F., Sandler D.P., Alavanja M.C. Pesticide use and cutaneous melanoma in pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ Health Perspect* 2010;118(6):812–7. DOI: 10.1289/ehp.0901518
 27. Piel C., Pouchieu C., Carles C. et al. Agricultural exposures to carbamate herbicides and fungicides and central nervous system tumour incidence in the cohort AGRICAN. *Environ Int* 2019;130:104876. DOI: 10.1016/j.envint.2019.05.070
 28. Mills P.K., Yang R., Riordan D. Lymphohematopoietic cancers in the United Farm Workers of America (UFW), 1988–2001. *Cancer Causes Control* 2005;16(7):823–30. DOI: 10.1007/s10552-005-2703-2
 29. Vighi M., Matthies M., Solomon K.R. Critical assessment of pendimethalin in terms of persistence, bioaccumulation, toxicity, and potential for long-range transport. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2017;20(1):1–21. DOI: 10.1080/10937404.2016.1222320
 30. Hou L., Lee W.J., Rusiecki J. et al. Pendimethalin exposure and cancer incidence among pesticide applicators. *Epidemiology* 2006;17(3):302–7. DOI: 10.1097/01.ede.0000201398.82658.50
 31. Andreotti G., Freeman L.E., Hou L. et al. Agricultural pesticide use and pancreatic cancer risk in the Agricultural Health Study Cohort. *Int J Cancer* 2009;124(10):2495–500. DOI: 10.1002/ijc.24185
 32. Walsh K.D., Kato T.A. Alkaline comet assay to detect DNA damage. *Methods Mol Biol* 2023;2519:65–72. DOI: 10.1007/978-1-0716-2433-3_7
 33. Guzman C., Bagga M., Kaur A. et al. ColonyArea: an ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. *PLoS One* 2014;9(3):e92444. DOI: 10.1371/journal.pone.0092444
 34. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
 35. IARC. Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. 1973. Available at: <https://publications.iarc.who.int/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Certain-Polycyclic-Aromatic-Hydrocarbons-And-Heterocyclic-Compounds-1973>
 36. Robles H. Methylcholanthrene, 3-. Available at: https://www.researchgate.net/publication/304034151_Methylcholanthrene_3-
 37. Kawabe M., Urano K., Suguro M. et al. Tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in an ultra-short-term skin carcinogenesis bioassay using rasH2 mice. *Vet Pathol* 2013;50(5):903–8. DOI: 10.1177/0300985813486811
 38. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 1984;308(5961):693–8. DOI: 10.1038/308693a0
 39. Denison M.S., Phelan D., Winter G.M., Ziccardi M.H. Carbaryl, a carbamate insecticide, is a ligand for the hepatic Ah (dioxin) receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;152(2):406–14. DOI: 10.1006/taap.1998.9999
 40. Larigot L., Juricek L., Dairou J., Coumoul X. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim Open* 2018;7:1–9. DOI: 10.1016/j.biopen.2018.05.001
 41. Lédérac N., Delescluse C., de Sousa G. et al. Carbaryl induces CYP1A1 gene expression in HepG2 and HaCaT cells but is not a ligand of the human hepatic Ah receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;144(1):177–82. DOI: 10.1006/taap.1997.8120
 42. Honkakoski P., Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* 2000;347(Pt 2):321–37. DOI: 10.1042/0264-6021:3470321
 43. Saquib Q., Siddiqui M.A., Ansari S.M. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of methomyl, carbaryl, metalaxyl, and pendimethalin in human umbilical vein endothelial cells. *J Appl Toxicol* 2021;41(5):832–46. DOI: 10.1002/jat.4139
 44. Fernandes R., Hosoya K., Pereira P. Reactive oxygen species downregulate glucose transport system in retinal endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;300(4):C927–36. DOI: 10.1152/ajpcell.00140.2010
 45. Chen Y., Joo J., Chu J.M. et al. Downregulation of the glucose transporter GLUT 1 in the cerebral microvasculature contributes to postoperative neurocognitive disorders in aged mice. *J Neuroinflammation* 2023;20(1):237. DOI: 10.1186/s12974-023-02905-8
 46. Jorsaraei S.G., Maliji G., Azadmehr A. et al. Immunotoxicity effects of carbaryl *in vivo* and *in vitro*. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014;38(3):838–44. DOI: 10.1016/j.etap.2014.09.004
 47. Seher Karsli S.Y., Esra F. İncedere düzdağ, Türkan yurdun. Assessment of genotoxic effects of organophosphate and carbamate pesticides by comet assay. *İstanbul J Pharm* 2022;52(2):136–42. DOI: 10.26650/İstanbulJPharm.2022.1057224
 48. Thakur S., Dhiman M., Mantha A.K. APE1 modulates cellular responses to organophosphate pesticide-induced oxidative damage in non-small cell lung carcinoma A549 cells. *Mol Cell Biochem* 2018;441(1–2):201–16. DOI: 10.1007/s11010-017-3186-7
 49. Balakrishnan P., Thirunavukarasu K., Tamizhmani P. Toxicological impact of chronic chlorpyrifos exposure: DNA damage and

- epigenetic alterations induces neoplastic transformation of liver cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2025;746:151287. DOI: 10.1016/j.bbrc.2025.151287
50. Moyano P., Garcia J., Garcia J.M. et al. Chlorpyrifos-induced cell proliferation in human breast cancer cell lines differentially mediated by estrogen and aryl hydrocarbon receptors and KIAA1363 enzyme after 24 h and 14 days exposure. *Chemosphere* 2020;251:126426. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126426
 51. Hevir N., Trost N., Debeljak N., Rizner T.L. Expression of estrogen and progesterone receptors and estrogen metabolizing enzymes in different breast cancer cell lines. *Chem Biol Interact* 2011; 191(1–3):206–16. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.12.013
 52. Lasagna M., Ventura C., Hielpos M.S. et al. Endocrine disruptor chlorpyrifos promotes migration, invasion, and stemness phenotype in 3D cultures of breast cancer cells and induces a wide range of pathways involved in cancer progression. *Environ Res* 2022;204(Pt A):111989. DOI: 10.1016/j.envres.2021.111989
 53. Moyano P., Garcia J.M., Garcia J. et al. Chlorpyrifos induces cell proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, through cholinergic and Wnt/beta-catenin signaling disruption, AChE-R upregulation and oxidative stress generation after single and repeated treatment. *Food Chem Toxicol* 2021;152:112241. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112241
 54. Ventura C., Nunez M., Miret N. et al. Differential mechanisms of action are involved in chlorpyrifos effects in estrogen-dependent or -independent breast cancer cells exposed to low or high concentrations of the pesticide. *Toxicol Lett* 2012;213(2):184–93. DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.06.017
 55. Croom E.L., Wallace A.D., Hodgson E. Human variation in CYP-specific chlorpyrifos metabolism. *Toxicology* 2010;276(3):184–91. DOI: 10.1016/j.tox.2010.08.005
 56. Montanari C., Franco-Campos F., Taroncher M. et al. Chlorpyrifos induces cytotoxicity via oxidative stress and mitochondrial dysfunction in HepG2 cells. *Food Chem Toxicol* 2024;192:114933. DOI: 10.1016/j.fct.2024.114933
 57. Radhey S. Verma A.M., Nalini Srivastava. *In vivo* chlorpyrifos induced oxidative stress: Attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2007;88(2):191–6. DOI: 10.1016/j.pestbp.2006.11.002
 58. Lasagna M., Hielpos M.S., Ventura C. et al. Chlorpyrifos subthreshold exposure induces epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Ecotoxicol Environ Saf* 2020;205:111312. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111312
 59. Yahia D., El-Amir Y.O., Rushdi M. Mancozeb fungicide-induced genotoxic effects, metabolic alterations, and histological changes in the colon and liver of Sprague Dawley rats. *Toxicol Ind Health* 2019;35(4):265–76. DOI: 10.1177/0748233719834150
 60. Pienkowska M., Zielenska M. Genotoxic effects of thiram evaluated by sister-chromatid exchanges in human lymphocytes. *Mutat Res* 1990;245(2):119–23. DOI: 10.1016/0165-7992(90)90010-h
 61. Maksimova V., Bukina A., Khayrieva G. et al. Thiram effects on HeLa TI cells. *Proceedings* 2024;102(1):35. DOI: 10.3390/proceedings2024102035
 62. Lori G., Tassinari R., Narciso L. et al. Toxicological Comparison of mancozeb and zoxamide fungicides at environmentally relevant concentrations by an *in vitro* approach. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18(16):8591. DOI: 10.3390/ijerph18168591
 63. Bhaskar R., Mishra A., Mohanty B. Effects of mancozeb and imidacloprid pesticides on activities of steroid biosynthetic enzymes cytochromes P450. *J Kalash Sci* 2014;2:1–6.
 64. Dalvi P.S., Wilder-Ofie T., Mares B. et al. Toxicologic implications of the metabolism of thiram, dimethyldithiocarbamate and carbon disulfide mediated by hepatic cytochrome P450 isozymes in rats. *Pesticide Biochemi Physiol* 2002;74(2):85–90.
 65. Dalvi P.S., Wilder-Ofie T., Mares B. et al. Effect of cytochrome P450 inducers on the metabolism and toxicity of thiram in rats. *Vet Hum Toxicol* 2002;44(6):331–3.
 66. Kumar K., Sabarwal A., Singh R.P. Mancozeb selectively induces mitochondrial-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cells through ROS generation. *Mitochondrion* 2019;48:1–10. DOI: 10.1016/j.mito.2018.06.003
 67. Kurpios-Piec D., Grosicka-Maciag E., Wozniak K. et al. Thiram activates NF-kappaB and enhances ICAM-1 expression in human microvascular endothelial HMEC-1 cells. *Pestic Biochem Physiol* 2015;118:82–9. DOI: 10.1016/j.pestbp.2014.12.003
 68. Sarigol Kilic Z., Aydin S., Undeger Bucurgat U., Basaran N. *In vitro* genotoxicity assessment of dinitroaniline herbicides pendimethalin and trifluralin. *Food Chem Toxicol* 2018;113:90–8. DOI: 10.1016/j.fct.2018.01.034
 69. Ansari S.M., Saquib Q., Attia S.M. et al. Pendimethalin induces oxidative stress, DNA damage, and mitochondrial dysfunction to trigger apoptosis in human lymphocytes and rat bone-marrow cells. *Histochem Cell Biol* 2018;149(2):127–41. DOI: 10.1007/s00418-017-1622-0
 70. Ahmad M.I., Zafeer M.F., Javed M., Ahmad M. Pendimethalin-induced oxidative stress, DNA damage and activation of anti-inflammatory and apoptotic markers in male rats. *Sci Rep* 2018;8(1):17139. DOI: 10.1038/s41598-018-35484-3
 71. Lee H.S., Amarakoon D., Tamia G. et al. Pendimethalin induces apoptotic cell death through activating ER stress-mediated mitochondrial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells. *Food Chem Toxicol* 2022;168:113370. DOI: 10.1016/j.fct.2022.113370
 72. Ham J., Lim W., Song G. Pendimethalin induces apoptosis in testicular cells via hampering ER-mitochondrial function and autophagy. *Environ Pollut* 2021;278:116835. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.116835
 73. Sarigol-Kilic Z., Undeger-Bucurgat U. The Apoptotic and Anti-apoptotic Effects of Pendimethalin and Trifluralin on A549 Cells In Vitro. *Turk J Pharm Sci* 2018;15(3):364–9. DOI: 10.4274/tjps.94695

Вклад авторов

Е.С. Лылова: получение данных для анализа, анализ данных, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала;
 В.Г. Попова: анализ данных, подготовка иллюстративного материала;
 К.А. Зимин, А.Ю. Букина, В.А. Нуртдинова, С.С. Шмаков: получение данных для анализа;
 М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов: анализ данных, редактирование;
 В.П. Максимова: разработка дизайна исследования, анализ данных, подготовка иллюстративного материала, редактирование.

Authors' contributions

E.S. Lylova: obtaining data for analysis, data analysis, article writing, preparation of illustrative material;
 V.G. Popova: data analysis, preparation of illustrative material;
 K.A. Zimin, A.Yu. Bukina, V.A. Nurtdinova, S.S. Shmakov: obtaining data for analysis;
 M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov: data analysis, editing;
 V.P. Maksimova: research design development, data analysis preparation of illustrative material, editing.

ORCID авторов / ORCID authors

Е.С. Лылова / E.S. Lylova: <https://orcid.org/0000-0001-6388-1624>

В.Г. Попова / V.G. Popova: <https://orcid.org/0000-0002-7301-605X>

К.А. Зимин / K.A. Zimin: <https://orcid.org/0009-0008-7714-114X>

А.Ю. Букина / A.Yu. Bukina: <https://orcid.org/0000-0002-0963-3432>

В.А. Нуртдинова / V.A. Nurtidinova: <https://orcid.org/0009-0001-2694-3387>

С.С. Шмаков / S.S. Shmakov: <https://orcid.org/0009-0001-7152-7083>

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).

ДЛЯ ЗАМЕТОК