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

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

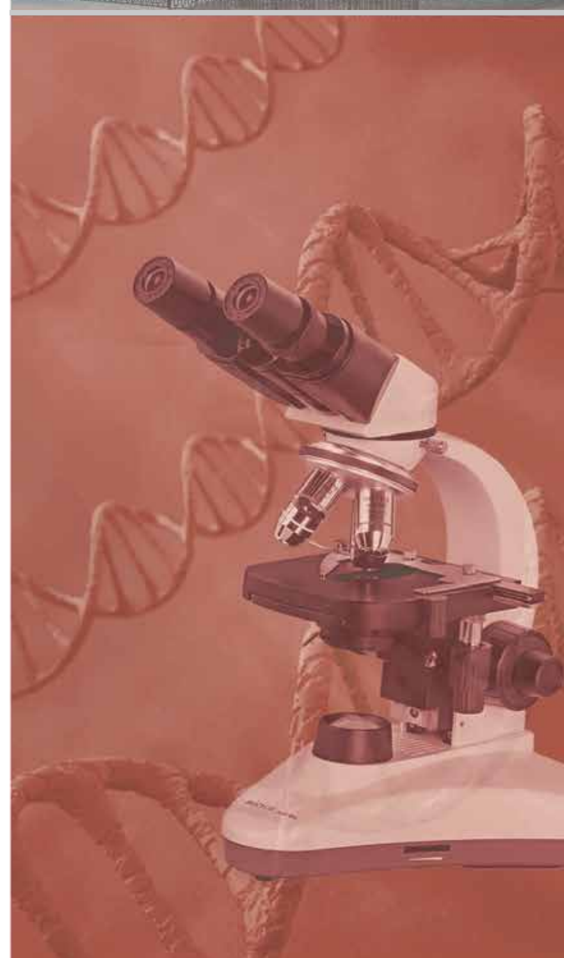
Реаранжировка сигнальных путей и адаптация опухолевых клеток к гипоксии

Роль сигнальных путей FGFR и VEGFR в развитии вторичной резистентности опухолей к ингибиторам тирозинкиназных рецепторов

Особенности эпителиально-мезенхимального перехода клеток серозного рака яичников

Регуляторные Т-клетки в первичном очаге опухолевого роста при колоректальном раке

Варианты экспрессии EpCAM в циркулирующих и диссеминированных опухолевых клетках



4
ТОМ 12
VOL. 12
2025

ADVANCES IN MOLECULAR ONCOLOGY

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

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

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

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

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

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

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

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

ОСНОВАН В 2014 Г.

4 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 **Е.С. Самойлова**

Дизайн: **Е.В. Степанова**

Верстка: **Е.В. Степанова**

Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, base@abvpress.ru

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (ПИ № ФС77-57560 от 08.04.2014)

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

Успехи молекулярной онкологии. 2025. Том 12. № 4. 1–164.

Подписной индекс в каталоге «Пресса России» – 93562.

Отпечатано в типографии «Лайдер принт». 105082 Москва, Переведеновский пер., 13, стр. 16.

Тираж 1000 экз. Бесплатно.

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ / ADVANCES IN MOLECULAR ONCOLOGY 4 ' 2025

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.*

4 VOL. 12 '25

FOUNDED IN 2014

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

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

Editorial Office:
Research Institute of Carcinogenesis, Floor 3, 24 Kashirskoye Shosse, Bld. 15, Moscow 115478.
Tel.: +7 (499) 929-96-19

E-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

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

Managing editor **I.N. Puchkova**
Proofreader **E.S. Samoylova**

Designer **E.V. Stepanova**
Maker-up **E.V. Stepanova**

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

The journal was registered at the Federal Service for Surveillance of Communications, Information Technologies, and Mass Media (ПИ No. ФС77-57560 dated 08 April 2014).

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

Uspekhi molekulyarnoy onkologii. 2025. Vol. 12 No. 4. 1–164.

Pressa Rossii catalogue index: 93562.

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

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 (бóльший 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, выполнеными 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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

REVIEWS

EXPERIMENTAL REPORTS

BRIEF COMMUNICATION

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-8-23

Реаранжировка сигнальных путей и адаптация опухолевых клеток к гипоксии

О.Е. Андреева, Е.И. Михаевич, 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*

Злокачественные опухоли, развивающиеся в условиях хронической гипоксии, в отличие от клеток нормальных тканей, быстро приобретают устойчивость к пониженному содержанию кислорода. Известно, что устойчивые к гипоксии клетки в рамках злокачественной прогрессии приобретают различные свойства, способствующие их выживаемости: они изменяют метаболизм на аэробный гликолиз, активируют программы, обусловливающие ангиогенез, и перестраивают сигнальные каскады в рамках адаптации к гипоксии. При этом такие опухолевые клетки становятся устойчивыми к химио- и радиотерапии, а также эффективно колонизируют метастатические ниши.

Данный обзор посвящен анализу сигнальных путей, которые активируются в условиях хронической гипоксии и отвечают за адаптацию опухолей к недостатку кислорода. Помимо основного пути, связанного с активацией гипоксией индуцируемого фактора 1α (HIF-1α), рассмотрены и такие каскады, как STAT3, связанный с эпителиально-мезенхимальным переходом каскад Snail, отвечающий за адаптацию к активным формам кислорода фактор NRF2, а также факторы стволовости OCT4, SOX2 и NANOG. Известно, что для эффективного воздействия на опухолевые клетки необходимо одновременное ингибирование нескольких участников сигнальных путей, поскольку воздействие лишь на один из них приведет к переключению сигнальных белков в обход заблокированного. В статье перечислены различные ингибиторы сигнальных путей, которые участвуют в адаптации опухолевых клеток к хронической гипоксии, и рассмотрены механизмы их действия на мишени. Для разработки успешных стратегий лечения устойчивых к гипоксии опухолей необходим поиск эффективной комбинации упомянутых и других ингибиторов ключевых сигнальных каскадов, участвующих в адаптации к гипоксии.

Ключевые слова: устойчивость к гипоксии, гипоксией индуцируемый фактор 1α, HIF-1α, STAT3, Snail, NRF2, OCT4, NANOG, SOX2, ингибитор

Для цитирования: Андреева О.Е., Михаевич Е.И., Красильников М.А. Реаранжировка сигнальных путей и адаптация опухолевых клеток к гипоксии. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(4):8–23.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-8-23

Rearrangement of signaling pathways and adaptation of tumor cells to hypoxia

O.E. Andreeva, E.I. Mikhaevich, 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 Aleksandrovich Krasil'nikov *krasilnikovm1@ya.ru*

Malignant tumors developing in the conditions of chronic hypoxia, unlike normal tissues, quickly acquire resistance to decreased oxygen level. Hypoxia-resistant cells in malignant disease obtain various features promoting their survival: they alter metabolism to aerobic glycolysis, activate angiogenesis-stimulating programs, and rearrange signaling cascades to adapt to hypoxia. At the same time, tumor cells become resistant to chemotherapy and radiation therapy and effectively colonize metastatic niches.

This review analyzes signaling pathways which activate in the conditions of chronic hypoxia and underlie tumor adaptation to insufficient oxygen. Apart from the main pathway associated with activation of hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α), such cascades as STAT3, Snail cascade associated with epithelial-mesenchymal transition, NRF2 factor responsible for adaptation to reactive oxygen species, and stemness factors OCT4, SOX2 and NANOG are also considered. Effective killing of tumor cells requires simultaneous inhibition of several parts of signaling pathways because disruption of just one will lead to switching of signaling proteins to bypass the blocked one. The article lists various inhibitors of signaling pathways patricipating in tumor cell adaptation to chronic hypoxia and describes their mechanisms of action and targets. Development of successful strategies for treatment of hypoxia-resistant tumors requires identification of an effective combination of the above-mentioned and other inhibitors of the key signaling cascades participating in adaptation to hypoxia.

Keywords: hypoxia resistance, hypoxia-inducible factor 1α, HIF-1α, STAT3, Snail, NRF2, OCT4, NANOG, SOX2, inhibitor

For citation: Andreeva O.E., Mikhaevich E.I., Krasil'nikov M.A. Rearrangement of signaling pathways and adaptation of tumor cells to hypoxia. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(4):8–23. (In Russ.).
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-8-23

ВВЕДЕНИЕ

В солидных опухолях подача кислорода к неопластическим и стромальным клеткам снижается или даже прекращается из-за изменения геометрии диффузии, серьезных структурных аномалий микрососудов опухоли и нарушенной микроциркуляции [1]. Кроме того, анемия и образование метгемоглобина или карбоксигемоглобина негативно влияют на способность крови транспортировать O_2. В результате в солидных опухолях формируются участки с низким (вплоть до нуля) парциальным давлением кислорода, неоднородно распределенные в опухолевой массе и располагающиеся рядом с областями с нормальным парциальным давлением O_2.

Как правило, кровеносные сосуды образуются в результате процесса, известного как ангиогенез, в ходе которого обеспечивается дополнительная васкуляризация опухолей. Разрастание опухолевой массы приводит к сдавливанию кровеносных и лимфатических сосудов, вызывая коллапс и дисфункцию последних [2]. Таким образом, развивающиеся в результате быстрой пролиферации опухоли многоветвистые нефункциональные, слабые кровеносные сосуды с неупорядоченным, изменчивым и сниженным потоком крови не препятствуют в достаточной степени возникновению гипоксии и ацидоза в опухоли [3].

Принято подразделять гипоксию на острую и хроническую; также иногда выделяют циклическую гипоксию. При этом временные рамки, которые используют в экспериментах *in vitro* для моделирования соответствующих состояний, довольно широко варьируют. Например, чтобы вызвать хроническую гипоксию, в различных исследованиях клетки инкубировали в гипоксических условиях от 4 ч до нескольких недель. Для индукции острой гипоксии клетки подвергали непрерывной гипоксии от 30 мин до 72 ч [4]. В ряде исследований применялась модель циклической гипоксии, при которой, как и в опухоли, циклы гипоксии чередуются с циклами реоксигенации. Для моделирования циклической гипоксии *in vitro* в некоторых работах клетки инкубировали с циклическими временными графиками гипоксии от 10 мин гипоксии/10 мин нормоксии до 1 нед гипоксии/1–3 нед нормоксии, а количество циклов варьировало от 2 до 12 [4], в том числе использовалось и различное содержание кислорода – от 0 до 6 % [4].

Цель работы – анализ и систематизация данных литературы, посвященной изучению механизмов опухолевого роста в условиях гипоксии.

ГИПОКСИЯ И ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ОПУХОЛЕЙ

Гипоксия влияет на метаболизм опухолевых клеток, способствуя усилению гликолиза и развитию ацидоза. Гликолиз – процесс расщепления глюкозы до пирувата и далее до лактата – активирован в опухолевых клетках даже в условиях достаточного количества кислорода. Это явление известно как эффект Варбурга, или аэробный гликолиз [5]. В отличие от нормальных клеток, которые в присутствии кислорода преимущественно используют окислительное фосфорилирование в митохондриях для эффективного производства аденозинтрифосфата (АТФ), опухолевые клетки отдают предпочтение гликолизу, который производит значительно меньше АТФ на молекулу глюкозы [6]. Усиленный гликолиз дает опухолевым клеткам ряд преимуществ, в частности, способствует ускоренному производству АТФ: несмотря на меньшую эффективность по сравнению с окислительным фосфорилированием, гликолиз протекает скорее, что позволяет опухолевым клеткам быстро генерировать энергию, необходимую для быстрых роста и деления [6]. Также важным фактором является образование промежуточных продуктов гликолиза, которые используются в биосинтетических путях для синтеза макромолекул (нуклеотидов, липидов, аминокислот), необходимых для роста и пролиферации клеток. К этим продуктам относятся рибоза-5-фосфат и аминокислоты, такие как аспартат, глутамин и серин, необходимые для синтеза нуклеотидов, ацетил-КоА (использующийся для синтеза липидов из конечного продукта гликолиза – пирувата) [7], 3-фосфо-глицерат (который может преобразовываться в серин и затем в глицин) [8, 9], пируват (который может быть трансаминирован с образованием аланина) [10] и другие соединения.

Каким образом гипоксия влияет на гликолиз на молекулярном уровне? Важнейшую роль в регуляции этого процесса в рамках гипоксии играет индуцируемый гипоксией фактор 1 (HIF-1). В результате стабилизации данного транскрипционного фактора в условиях гипоксии происходит активация транскрипции таких его мишеней, как транспортеры глюкозы GLUT1 (*SLC2A1*) и GLUT3 (*SLC2A3*). HIF-1 непосредственно связывается с элементами, отвечающими за гипоксию (HRE), в промоторах этих генов и активирует их экспрессию на уровне как белка, так и матричной РНК (мРНК) [11, 12]. В результате увеличения экспрессии транспортеров глюкозы в клетку поступает повышенное количество субстрата гликолиза. Также HIF-1 регулирует экспрессию ферментов, участвующих в гликолизе, таких как гексокиназа, фосфофруктокиназа и лактатдегидрогеназа А (*LDHA*) [13], что ускоряет превращение глюкозы в лактат. Еще одной важнейшей мишенью HIF является пируватдегидрогеназа киназа 1 (*PDK1*) [14], катализирующая превращение пирувата в ацетил-КоА для поступления в цикл Кребса. Таким образом, HIF-1 играет главную роль в метаболической адаптации клеток к гипоксии, способствуя переключению энергетического метаболизма с окислительного фосфорилирования на менее эффективный, но не зависящий от кислорода гликолиз, что позволяет клеткам поддерживать производство АТФ и в условиях недостатка кислорода.

Ацидоз, вызванный избыточным накоплением лактата в результате гликолиза, играет важнейшую роль в опухолевой прогрессии, создавая агрессивную микросреду, способствующую выживанию, инвазии и метастазированию опухолевых клеток. Ацидоз вызывает деградацию внеклеточного матрикса за счет активации матриксных металлопротеиназ (MMP), что облегчает инвазию опухолевых клеток в окружающие ткани и их диссеминацию [15]. Ацидоз может снижать эффективность многих химиотерапевтических препаратов, таких как антрациклины, таксаны, антиметаболиты и алкилирующие агенты, поскольку некоторые из них являются слабыми основаниями и хуже проникают в кислую среду, или их активность уменьшается при низком pH [16]. Ацидоз подавляет активность окружающих опухоль иммунных клеток, таких как Т-лимфоциты и NK-клетки (NK – естественные киллеры), способствуя уклонению опухоли от иммунного надзора [17].

АДАПТАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ГИПОКСИИ

Роль индуцируемых гипоксией факторов 1 и 2 в клеточном ответе на гипоксию

В условиях длительной гипоксии опухолевые клетки, в отличие от нормальных, эффективно адаптируются к пониженному содержанию кислорода. Особую роль в этой адаптации играют уже упомянутые факторы транскрипции из семейства HIF, которые далее будут рассмотрены более подробно. Данные факторы отвечают за выживание клеток в гипоксии и способны инициировать реаранжировку множества сигнальных каскадов. Совокупность этих явлений позволяет опухолевым клеткам приспосабливаться к недостатку кислорода, выживать, а также образовывать метастазы.

К транскрипционным факторам из семейства HIF относятся несколько белков: 3 α-субъединицы (HIF-1α, -2α и -3α) и субъединица HIF-1β (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT). Эти факторы отвечают за большинство вызванных гипоксией изменений в экспрессии генов [18, 19]. HIF-1α-опосредованные изменения клеточного метаболизма способствуют росту опухоли, злокачественной прогрессии, подавлению и активации экспрессии генов, а также патологическим модификациям генома [19], тогда как HIF-2α стимулирует некоторые гены, активируемые HIF-1α [20]. HIF-1α реагирует на острую гипоксию быстрой стабилизацией и активацией генов-мишеней, тогда как HIF-2α активируется в условиях умеренной гипоксии и накапливается с течением времени [21].

При нормальной концентрации кислорода нестабильная α-субъединица HIF быстро гидроксилируется по 2 остаткам пролина в кислородзависимых областях одной из 3 пролилгидроксилаз (PHD), убиквитинируется белком Von Hippel Lindau (VHL) и становится мишенью для протеасомной деградации [22]. В условиях гипоксии стабильный HIF-1α транслоцируется в ядро и образует гетеродимер с HIF-1β, запуская скоординированную программу экспрессии генов [23]. В промоторах генов-мишеней HIF присутствуют сайты связывания данного фактора – последовательности вида 5’-RCGTG-3’, где R – это аденин или гуанин [24].

Индуцируемый гипоксией фактор 1α активирует транскрипцию большого набора генов, кодирующих белки, которые способствуют ангиогенезу (*LEP*, *LRP1*, *TGFB3*, *VEGF*), перестройке метаболизма на гликолиз (*HK1*, *HK2*, *GPI*, *ENO1*, *SLC2A1*, *GAPDH*, *LDHA* и др.), пролиферации (*CCNG2*, *IGF2*, *IGFBP1*, *IGFBP2*, *IGFBP3*, *WAF1*, *TGFA* и др.), выживаемости (*ADM*, *EPO*, *NOS2* и др.), лекарственной устойчивости (*ABCB1*, *ABCC1* и др.), перестройке внеклеточного матрикса (*CATHD*, *COL5A1*, *FN1*, *MMP2*, *SERPINE1* и др.), повышению подвижности клеток, инвазии и метастазированию (*MET*, *LRP1*, *TGFA*, *SNAI1* и др.) [25]. HIF-1α принимает непосредственное участие в регуляции апоптоза и может действовать и как про-, и как антиапоптотический фактор в зависимости от условий эксперимента и типа клеток [26]. Так, результаты исследования H. Suzuki и соавт. на клетках рака молочной железы (РМЖ) продемонстрировали, что при апоптозе, индуцированном гипоксией, активировались 2 различные формы HIF-1α – фосфорилированная и дефосфорилированная [27]. Фосфорилированный HIF-1α был основной формой, которая связывалась с HIF-1β, вызывая соответствующее повышение транскрипции таргетных генов, при этом эктопическая экспрессия HIF-1β последовательно усиливала фосфорилирование HIF-1α зависимым от связывания образом. Напротив, дефосфорилированная форма HIF-1α была основной формой, которая связывалась с p53, стабилизируя его и индуцируя апоптоз.

Гиперэкспрессия HIF считается неблагоприятным прогностическим фактором [28]. Как сообщалось в различных исследованиях, гиперэкспрессия HIF-1α в значительной степени коррелирует с неблагоприятным исходом и более низкими показателями выживаемости у пациентов с РМЖ [29, 30], гепатоцеллюлярной карциномой [31], раком поджелудочной железы [32], легкого [33], желудка [34] и другими видами новообразований. HIF-1α и его мишень фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) участвуют в развитии химио- и радиорезистентности опухолей [35]. Экспрессия HIF-1α увеличивается в зависимости от градации опухоли, она выше при менее дифференцированных опухолях, чем при хорошо дифференцированных новообразованиях [36, 37].

Повышенный уровень HIF-1α связан с метастазированием в регионарные лимфатические узлы, кости, отдаленные органы. Повышенная экспрессия HIF-1α фиксируется в биоптатах метастатических поражений у больных РМЖ [28], раком легкого [38, 39], колоректальным раком [40] и другими нозологиями и коррелирует с неблагоприятным исходом.

Сигнальный каскад Snail и его роль в адаптации к гипоксии

Snail и эпителиально-мезенхимальный переход. Гипоксия и метастазирование непосредственно связаны с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП) – последовательностью событий, приводящих к быстрым и часто обратимым изменениям фенотипа клетки. После ЭМП снижается межклеточная адгезия и резко увеличивается подвижность клеток, как результат, развивается способность к активной инвазии и метастазированию на фоне повышенной устойчивости к апоптотическим воздействиям [41]. Ключевым событием в активации ЭМП является подавление E-кадгерина, ответственного за формирование межклеточных контактов посредством участия белков из семейства Snail [42].

Суперсемейство факторов транскрипции Snail включает семейства SNAIL и SCRATCH [43]. Три белка из семейства SNAIL, экспрессирующиеся в клетках позвоночных, получили название SNAIL (*SNAI1*), SLUG (*SNAI2*) и SMUC (*SNAI3*). Все члены этого семейства кодируют факторы транскрипции типа цинковых пальцев. Они имеют схожую организацию высококонсервативного C-концевого домена, который содержит от 4 до 6 цинковых пальцев типа C_2H_2 (в разном количестве в различных гомологах) и связывается с последовательностью E-box 5’-CACCTG-3’ (или в обратной форме 5’-CAGGTG-3’) в промоторах таргетных генов [43].

Механизм транскрипционной репрессии Snail выглядит следующим образом: Snail связывается с E-боксами промотора гена E-кадгерина (*CDH1*), привлекает в промоторную область комплексы с гистондеацетилазной активностью, в частности комплекс Sin3A/HDAC1/HDAC2, вызывающий деацетилирование гистонов, которое ассоциировано с более плотной структурой хроматина и подавлением транскрипции [44]. Также Snail способен рекрутировать комплекс PRC2 (polycomb repressive complex), который отвечает за триметилирование лизина 27 в гистоне H3 (H3K27me3), что является репрессивной эпигенетической меткой и приводит к долгосрочному подавлению экспрессии гена *CDH1* [45]. Экспрессия и активность Snail регулируются рядом сигнальных путей, в том числе фактора некроза опухоли (TNF) α [46], трансформирующего фактора роста β (TGF-β) [47], Wnt [48], STAT3 [49], а также HIF-1α [50].

Повышенная экспрессия Snail и сниженная экспрессия E-кадгерина – прогностические факторы, ассоциированные, как и в случае с HIF-1α, с низкой выживаемостью пациентов с различными онкологическими заболеваниями [51, 52].

Snail и HIF-1. Как уже отмечалось выше, гипоксия приводит к стабилизации и активации HIF-1 в опухолевых клетках. Активированный HIF-1 связывается с промоторной областью гена *SNAI1* и активирует его транскрипцию. Способность HIF-1 активировать экспрессию *SNAI1* на транскрипционном уровне посредством связывания HIF-1α с респонсивными элементами промотора гена *SNAI1* показана для опухолей различных локализаций [50, 52–54]. Соответствующее подавление E-кадгерина в условиях гипоксии, сопровождающееся повышением миграционного потенциала, также продемонстрировали результаты ряда работ [55–57]. Поскольку Snail является ключевым регулятором ЭМП, HIF-1 способствует активации ЭМП в опухолевых клетках, что является критическим этапом в метастазировании, позволяя неопластическим клеткам отделяться от первичной опухоли, проникать в окружающие ткани и кровеносные сосуды и колонизировать отдаленные участки.

Snail и транскрипционный ядерный фактор κB. Snail играет большую роль в развитии лекарственной устойчивости и гормональной резистентности (в случае гормонозависимых опухолей). Результаты экспериментов *in vitro* продемонстрировали, что развитие гормональной резистентности коррелирует с увеличением экспрессии и активности Snail. Также установлено участие Snail в негативной регуляции эстрогенового рецептора (ER) и снижении гормональной чувствительности опухолевых клеток. Обнаружено, что транскрипционный ядерный фактор κB (NF-κB) активирует Snail в клетках РМЖ, а одновременное ингибирование NF-κB и Snail частично восстанавливает гормональную зависимость [58].

Результаты многочисленных исследований продемонстрировали феномен активации NF-κB в условиях гипоксии [59, 60]. При этом в промоторе гена NF-κB (*NFKB1*) отсутствуют HRE, что свидетельствует о непрямом влиянии гипоксии на этот фактор, без непосредственного участия HIF-1. В то же время в промоторе *HIF1A* присутствуют NF-κB-респонсивные сайты, что говорит о тесной взаимной регуляции HIF-1 и NF-κB [61].

Сигнальный путь STAT3 и его роль в адаптации к гипоксии

Одним из факторов, тесно связанных с активацией Snail, является STAT3 – транскрипционный фактор, под контролем которого находятся ключевые сигнальные белки клетки. В активации STAT3 участвует партнер Snail – компонент комплекса PRC2 лизинметилтрансфераза EZH2. На клетках глиобластомы было показано, что EZH2 связывается со STAT3 и метилирует его, что приводит к усилению фосфорилирования и повышению активности STAT3 [62]. В ходе исследования Q. Xie и соавт. на клетках рака легкого выявлено, что лактат, продуцируемый опухолевыми клетками, стимулирует экспрессию рецептора лактата GPR81, а также повышает активность Snail и индуцирует сборку комплекса Snail/EZH2/STAT3, причем в этом тройном комплексе активность STAT3 значительно усиливается [63]. С учетом накопления лактата в условиях гипоксии подобный путь активации Snail и STAT3 может играть большую роль в регуляции выживаемости опухолевых клеток в гипоксии.

Snail может активировать STAT3 путем влияния на каскад PI3K/AKT/mTOR. Известно, что данный каскад косвенным образом активирует STAT3 через киназы BMX (bone marrow X-linked kinase), которые фосфорилируют STAT3, а также через тирозинкиназные рецепторы, такие как рецептор эпидермального фактора роста (EGFR). Y. Li и соавт. в ходе исследования на клетках рака шейки матки выявили, что нокдаун BMX блокирует прохождение клеточного цикла и ингибирует экспрессию p-STAT3 и p-AKT [64]. При этом Snail является активатором каскада PI3K/AKT/mTOR посредством отрицательной регуляции транскрипции опухолевого супрессора PTEN [65] – ингибитора каскада PI3K/AKT/mTOR [66]. Таким образом, Snail способен активировать STAT3 с помощью ряда косвенных механизмов.

STAT3, в свою очередь, является активатором Snail. Результаты работы M. Saitoh и соавт. показали, что гиперэкспрессия STAT3 усиливает индукцию Snail, тогда как опосредованный малыми интерферирующими РНК (siРНК) нокдаун STAT3 ингибировал ее [49]. С помощью направленного мутагенеза авторы продемонстрировали, что замена Tyr 705 на фенилаланин в молекуле STAT3 приводит к неспособности мутантного STAT3 активировать Snail, при этом гиперэкспрессия PIAS3 – белкового ингибитора активированного STAT3 – подавляет индукцию промотора *SNAI1* под действием TGF-β и Ras.

STAT3 может активировать Snail не только путем влияния на вышестоящие регуляторы, такие как TGF-β, но и непосредственно/опосредованно воздействуя на транскрипцию *SNAI1*. На клетках атипичной тератоидной/рабдоидной опухоли с резистентностью к цисплатину продемонстрирована способность STAT3 связываться с промотором *SNAI1* и активировать его транскрипцию [67]. При этом в ходе исследования J. Xiao и соавт. на клетках РМЖ выявлено, что предполагаемые STAT3-связывающие элементы в промоторных областях *SNAI1* не требуются для STAT3-опосредованной индукции Snail, однако для нее необходимы кофакторы, такие как L3MBTL3 (histone methyl-lysine binding protein 3) [68]. Авторы показали, что белок L3MBTL3 взаимодействует со STAT3 и рекрутирует STAT3 на промотор *SNAI1*, повышая уровни транскрипции *SNAI1* и способствуя метастазированию.

Общие характеристики белков STAT. Семейство белков STAT насчитывает 7 членов, кодируемых генами, расположенными на 3 хромосомах: 2-й (*STAT1*, *STAT4*), 12-й (*STAT2*, *STAT6*) и 17-й (*STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B*). Впервые эти белки описаны в работе J.E. Darnell, посвященной идентификации факторов, вовлеченных в экспрессию генов, регулируемых интерфероном (IFN) [69]. Наибольшим онкогенным потенциалом из этого семейства в солидных опухолях обладает STAT3 (онкогенная роль STAT5A и STAT5B чаще изучается в контексте гематологических опухолей). Гиперэкспрессия STAT3 характерна для различных типов опухолей, таких как РМЖ [70], рак предстательной железы [71], легкого [72] и других нозологий, и связана с неблагоприятным прогнозом, метастазированием и резистентностью к химио- и радиотерапии.

Белки STAT находятся в латентном состоянии в цитоплазме до тех пор, пока не будут активированы внеклеточными лигандами, включая различные цитокины и факторы роста, такие как IFN, EGF, интерлейкин (IL) 5, IL-6, фактор роста гепатоцитов (HGF), лейкемия-ингибирующий фактор (LIF) и BMP2 [69, 73]. Связывание этих внеклеточных лигандов с их специфическими рецепторами приводит к активации различных тирозинкиназ (ТК), включая рецепторные и нерецепторные ТК, такие как SRC и ABL, которые могут напрямую фосфорилировать STAT в отсутствие лиганда [74]. ТК фосфорилируют один остаток тирозина каждой молекулы STAT, после чего следует гомо- или гетеродимеризация STAT через остатки фосфорилированных тирозинов в доменах Src-гомологии 2 (SH2) с последующей транслокацией в ядро образовавшихся димеров и активацией транскрипции таргетных генов [75].

Активное участие в регуляции STAT3 принимают киназы JAK – ТК нерецепторного типа, фосфорилирующие белки STAT [76]. Одним из ключевых активаторов каскада JAK/STAT3 считается IL-6. Повышенные уровни данного IL наблюдаются в условиях хронического воспаления при таких заболеваниях, как ревматоидный артрит, и у пациентов с гематопоэтическими злокачественными новообразованиями и солидными опухолями [77]. IL-6 посредством активации STAT3 повышает экспрессию таргетных генов STAT3, при этом STAT3 в свою очередь активирует экспрессию IL-6, создавая петлю положительной обратной связи [78].

Сайтами связывания STAT3 являются последовательности вида TTCCCGAA [79], расположенные в промоторах таргетных генов. STAT3 участвует в регуляции клеточного цикла, индуцируя экспрессию ключевых генов для перехода от фазы G1 к фазе S, таких как *CCND1* [80]. Помимо этого, аберрантная активация каскада STAT3 приводит к увеличению транскрипции генов-мишеней, контролирующих пролиферацию (*BCL2*, *BCL2L1*, *BIRC5*, *CCND1*, *MYC* и *MCL1*), ангиогенез (*HIF1A* и *VEGF*), ЭМП (*VIM*, *TWIST1*, *MMP9* и *MMP7*) и ряд других процессов, связанных с опухолевой прогрессией [81].

Регуляция STAT3 в гипоксии. В условиях гипоксии существенно возрастает секреция клетками опухоли провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, которые являются мощными активаторами сигнального пути JAK-STAT. Так, C. Fan и соавт. выявили, что HIF-1α непосредственно связывается с промотором *IL6* в В-клетках и активирует транскрипцию данного гена [82]. Кроме того, гипоксия приводит к увеличению продукции активных форм кислорода (АФК), которые инактивируют фосфатазы, ответственные за дефосфорилирование JAK и STAT, тем самым поддерживая активированное состояние последних [83].

В случае хронической гипоксии, как правило, наблюдаются чередующиеся циклы гипоксии и реоксигенации (H/R), которые, помимо повышения уровней АФК, также способствуют активации STAT3, благодаря связыванию STAT3 с белками Rac1 и PKC [84]. Гуанозинтрифосфатаза Rac1 – субъединица НАДФН-оксидазы – может активировать экспрессию *IL6* и, таким образом, влиять на активацию STAT3 [85]. Помимо этого, N-концевой домен активированного Rac1 (Rac1-GTP) может непосредственно связываться со спирально-спиральным (coiled-coil) доменом STAT3 как в мембране, так и в ядре и способствовать фосфорилированию STAT3 по остаткам тирозина (Y705) и серина (S727) [84].

Гипоксия и фактор 2, связанный с ядерным фактором эритроида

Наряду с HIF-1, важным фактором, индуцируемым гипоксией, является фактор 2, связанный с ядерным фактором эритроида (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2). В развитых солидных опухолях состояние гипоксии, как правило, развивается на фоне выраженного окислительного стресса. Ключевые функции NRF2 в опухолевой клетке – защита от окислительного стресса и поддержание клеточной выживаемости; он является главным регулятором антиоксидантной защиты [86]. Необходимо отметить, что повышенная экспрессия NRF2 в образцах опухолей связана с плохим прогнозом и устойчивостью к терапии, как было продемонстрировано в случае РМЖ [87], рака легкого [88], желудка [89] и других злокачественных новообразований.

Фактор 2, связанный с ядерным фактором эритроида, представляет собой транскрипционный фактор, связывающийся с регуляторными элементами генов-мишеней – элементами антиоксидантного ответа (antioxidant response element, ARE). Это последовательности вида RTGACNNNGC (R – пурин (A или G), N – любой нуклеотид) [90]. Активированный NRF2 перемещается в ядро и образует гетеродимер с небольшими белками семейства Maf (small Maf proteins). Комплекс NRF2/sMAF связывается с последовательностями ARE в промоторах таргетных генов, инициируя транскрипцию [91]. В нормальных клетках NRF2 препятствует канцерогенезу, однако в опухолевых клетках он обладает онкогенными свойствами, способствуя росту и прогрессии опухоли [92, 93]. Активность NRF2 регулируется на посттрансляционном уровне с помощью его негативного регулятора KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), который действует как адаптерный белок, связывающийся при нормальном уровне кислорода с комплексом Cul3/RBX1 и опосредующий деградацию NRF2 в протеасоме посредством убиквитинирования. При стрессовом сигнале активные формы кислорода, ксенобиотики и другие стимулы взаимодействуют с чувствительными цистеиновыми остатками в молекуле KEAP1, что приводит к изменению конформации и диссоциации от NRF2 [94]. В результате этих событий NRF2 накапливается в ядре и индуцирует транскрипцию таргетных генов, к которым относятся такие гены, как *NOTCH1*, *HK2*, *PKM* (пролиферация, выживаемость, изменение метаболизма), *BCL2*, *ABCC1*, *ABCG2* (устойчивость к терапии), *VEGF* (ангиогенез), *NOTCH1*, *HMOX1* (ЭМП, метастазирование) [95–99].

Как связаны NRF2 и HIF-1α? NRF2 может непосредственно связываться с элементами ARE в промоторе гена *HIF1A* и индуцировать экспрессию HIF-1α. Некоторые гены-мишени NRF2, такие как *TRX1* (тиоредоксин 1) и *NQO1* (НАД(Ф)Н-хиноноксидоредуктаза 1), способны усиливать накопление и стабилизацию HIF-1α путем влияния на окислительно-восстановительный баланс клетки, что благоприятствует ингибированию PHD – ферментов, ответственных за деградацию HIF-1α. Также известно, что NRF2 может напрямую взаимодействовать с этим фактором, препятствуя связыванию последнего с PHD, что вызывает накопление HIF-1α [100]. Таким образом, повышение активности NRF2 вследствие накопления АФК в условиях хронической гипоксии в ряде случаев способствует увеличению экспрессии и стабильности HIF-1α и адаптации к условиям окислительного стресса и выживанию. Соответственно, ингибирование NRF2 в опухолях с повышенной экспрессией HIF и NRF2 может быть эффективной стратегией лечения больных с гипоксическими опухолями. Например, брусатол – ингибитор белка NRF2 – препятствует индуцируемому гипоксией накоплению HIF-1α и снижает потребление глюкозы в клетках рака толстой и прямой кишок [101].

Гипоксия и регуляторы стволовости OCT4, SOX2 и NANOG

В адаптации опухолевых клеток к хронической гипоксии играют важнейшую роль и регуляторы стволовости опухолевых клеток – такие белки, как OCT4 (POU5F1), SOX2 и NANOG.

OCT4 (octamer-binding transcription factor 4) – транскрипционный фактор, необходимый для поддержания плюрипотентности стволовых клеток; в опухолевых клетках он отвечает за самообновление и способствует выживанию и лекарственной устойчивости. SOX2 (SRY-box transcription factor) часто действует в комплексе с OCT4, образуя гетеродимеры, усиливая транскрипцию общих генов-мишеней, включая *NANOG*, *SOX2* и *OCT4*, что также поддерживает стволовость. NANOG регулируется комплексом OCT4/SOX2 [102]. Этот фактор, как и SOX2 и OCT4, определяет судьбу не только плюрипотентных, но и опухолевых клеток. NANOG, SOX2 и OCT4 являются маркерами опухолевых стволовых клеток (ОСК); их экспрессия в опухолях повышается, что приводит к формированию фенотипа, устойчивого к стрессу, включая гипоксию, и к возобновлению роста опухоли после лечения [103]. Повышенная экспрессия данных белков связана с низкими показателями выживаемости больных и неблагоприятным прогнозом [104, 105].

Стволовость опухолевых клеток – основная биологическая причина устойчивости опухоли к лечению и ее способностей к возобновлению роста и распространению. Согласно сложившейся концепции ОСК лишь небольшая субпопуляция клеток внутри опухоли обладает ключевыми свойствами, характерными для нормальных стволовых клеток: самообновлением и способностью к дифференцировке [103]. В условиях гипоксии не только HIF-1α, но и гомологичный фактор HIF-2α связывается с элементами ответа на гипоксию в промоторах генов *OCT4*, *SOX2* и *NANOG*, что способствует усиленной транскрипции этих генов, индуцируя фенотип ОСК в ответ на низкие уровни кислорода [106, 107]. HIF-1α является мощным индуктором факторов ЭМП (Snail и TWIST), активируя транскрипцию этих генов через респонсивные участки в их промоторах. Последние не только способствуют инвазии и метастазированию, но и могут положительно регулировать экспрессию *OCT4*, *SOX2* и *NANOG*, создавая петлю обратной связи, которая стабилизирует фенотип ОСК [108]. STAT3, активированный в условиях гипоксии, перемещается в ядро и выступает в роли коактиватора транскрипции *OCT4*, *SOX2* и *NANOG*, связываясь с промоторами данных генов, делая ОСК устойчивыми к гипоксии и химиотерапии. Результаты исследования D.V. Do и соавт. продемонстрировали, что STAT3 напрямую связывается с дистальными энхансерами *Oct4* и *Nanog*, модулируя их экспрессию для поддержания плюрипотентности эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мышей [109]. Гены стволовости также позитивно регулируют STAT3/Snail. Так, в ходе исследования на клетках рака яичников, проведенного S. Liu и соавт., было обнаружено, что NANOG вызывает ЭМП и химиорезистентность через активацию сигнального пути STAT3, что приводит к изменению маркеров ЭМП, включая повышение уровня экспрессии Snail [110].

Согласно приведенным выше данным можно подвести некий промежуточный итог. Адаптация опухолевых клеток к хронической гипоксии, а именно приобретение клетками, устойчивыми к гипоксии, фенотипа агрессивности, увеличение их выживаемости, развитие их способности к метастазированию, а также устойчивости к химиотерапии и радиотерапии являются результатом скоординированной перестройки многочисленных сигнальных путей, которые, как правило, подразумевают активацию, стабилизацию и накопление HIF-1α. Участвуют в этой перестройке как гены-мишени HIF-1α, тесно связанные друг с другом взаимной положительной регуляцией, – STAT3, Snail, гены плюрипотентности, так и альтернативные регуляторы, в частности NRF2, которые позволяют клеткам справляться с действием АФК, вырабатываемым вследствие гипоксии, и в то же время способствуют активации HIF-1α.

Взаимосвязь ключевых компонентов сигнальных путей, определяющих адаптацию к гипоксии посредством своей реаранжировки и гиперактивации, а также последствия активации этих каскадов представлены на рис. 1. Важнейшим следствием адаптации опухолевых клеток к гипоксии является активация ЭМП посредством участия Snail и его положительного регулятора STAT3. В результате клетки, выжившие в условиях опухолевой гипоксии, колонизируют новые метастатические ниши, а ведь именно метастазирование может считаться основной причиной смерти онкологических пациентов.

Таким образом, очевидно, что для эффективной борьбы с онкологическими заболеваниями, для которых характерны гипоксические условия, необходим поиск подходов к сенсибилизации к гипоксии тех клеток, которые уже приобрели устойчивость к недостатку кислорода вследствие реаранжировки ключевых сигнальных путей. Ниже будут рассмотрены ингибиторы этих каскадов. Известно, что основной парадигмой эффективности противоопухолевой терапии является необходимость воздействия как минимум на несколько компонентов сигнальных путей, поскольку воздействие лишь на один из них приводит к компенсаторной активации каскадов в обход мишени. Вероятно, поиск комбинации нескольких

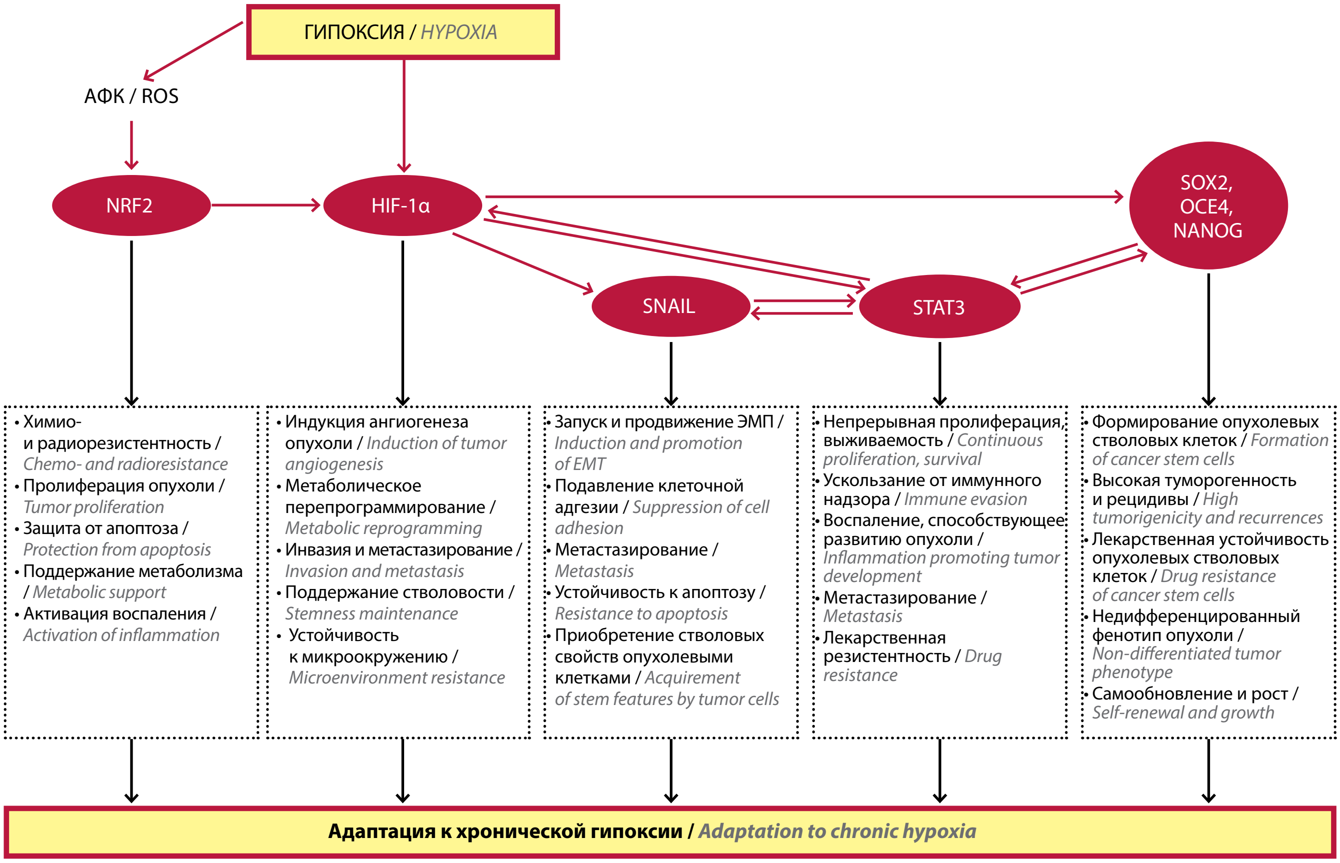


Рис. 1. *Взаимосвязь и биологические эффекты гиперактивации сигнальных путей, реаранжировка которых способствует развитию устойчивости опухолевых клеток к гипоксии. АФК – активные формы кислорода; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; NRF2 – фактор 2, связанный с ядерным фактором эритроида 2; HIF-1α – индуцируемый гипоксией фактор 1α*

Fig. 1. *Interplay and biological effects of hyperactivation of signaling pathways rearrangement of which promotes resistance of tumor cells to hypoxia. ROS – reactive oxygen species; EMT – epithelial-mesenchymal transition; NRF2 – nuclear factor erythroid 2-related factor 2; HIF-1α – hypoxia-inducible factor 1α*

ингибиторов из числа препаратов, представленных в следующем разделе, может послужить основой для эффективной борьбы с устойчивыми к гипоксии опухолями с учетом вклада каскадов STAT3, Snail, NRF2, OCT4, SOX2 и NANOG в развитие этой устойчивости.

ИНГИБИТОРЫ, КОТОРЫЕ МОГУТ ИСПОЛЬЗОВАТЬСЯ ДЛЯ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ГИПОКСИИ

Ингибиторы индуцируемого гипоксией фактора 1α

Один из подходов к ингибированию HIF-1α подразумевает использование активаторов PHD, к которым отсносится α-кетоглутарат. Как уже было сказано выше, они гидроксилируют HIF-1α в нормоксических условиях и запускают его деградацию в протеасомах. PHD – это ферменты, относящиеся к α-кетоглутаратзависимым диоксигеназам и являющиеся членами суперсемейства негемовых железодиоксигеназных ферментов. PHD неактивны в условиях гипоксии, однако в присутствии кислорода и α-кетоглутарата они преобразуют остатки пролина в молекуле HIF-1α в гидроксипролин с образованием CO_2 и сукцината [111]. При этом было показано, что ингибированные в условиях гипоксии PHD могут быть реактивированы при обработке клеток этерифицированным α-кетоглутаратом. Такая обработка приводила к подавлению HIF-1α, снижению индуцированного гипоксией гликолиза и PHD-опосредованной гибели клеток *in vitro* [112].

Рассматривается применение химиопрофилактического и химиотерапевтического соединения природного происхождения – 3,3'-дииндолилметана (DIM) – для подавления HIF-1α. На клетках линий MDA-MB-231 и HepG2 показано, что данное соединение, содержащееся в больших концентрациях в овощах семейства крестоцветных, эффективно подавляет вызванное гипоксией накопление уровня HIF-1α в опухолевых клетках, что приводит к снижению уровня экспрессии генов-мишеней HIF-1α, таких как *VEGF*, *ENO1*, *PFKM* и др. [113]. Механизм действия DIM основан на стимулировании деградации HIF-1α в протеасомах даже в условиях гипоксии, а также на подавлении транскрипционной его активности и путем влияния на положительные регуляторы данного фактора, такие как каскады Akt/mTOR и NF-κB.

Акрифлавин (акридин) – органическое соединение, относящееся к классу акридиновых красителей, смесь трипафлавина (3,6-диамино-10-метилакридиния хлорида) и профлавина (3,6-диаминоакридина), которое много лет использовалось как антибактериальное средство и антисептик. В настоящее время он исследуется как потенциальный препарат для противоопухолевой терапии, в основном благодаря его способности ингибировать HIF-1α. Акрифлавин напрямую связывается с субъединицами HIF-1α и HIF-2α, препятствуя их димеризации с HIF-1β [114]. Это соединение показало свою эффективность в ходе доклинических исследований на широком спектре злокачественных новообразований, включая колоректальный рак [115], рак мозга [116], гепатоцеллюлярный рак [117] и другие новообразования.

Еще одним подходом, который может использоваться для ингибирования как HIF-1, так и HIF-2, является использование циклических пептидов cyclo-CKLIIF, которые нарушают функцию этих факторов транскрипции, ингибируя взаимодействие HIF-1α и HIF-2α с HIF-1β. A.T. Ball и соавт. с использованием высокопроизводительной платформы скрининга идентифицировали лидерные циклические гексапептиды с максимальным сродством к PAS-B-домену HIF-1α и HIF-2α, которые в комбинации с фармакофором эффективно ингибировали HIF-1α, HIF-2α и их таргетные гены *VEGF* и *CAIX* в подвергнутых гипоксии клетках РМЖ (MCF-7) и рака поджелудочной железы (Panc-1), а также в клетках рака шейки матки (HeLa) [118].

Ингибиторы Snail

Одним из наиболее перспективных ингибиторов Snail является Cyd19 – малая молекула, направленная на Snail и гистондеацетилазу 1 (HDAC1). Cyd19 с высокой эффективностью связывается с консервативным карманом Snail, содержащим аргинин-174, и нарушает взаимодействие Snail-CBP/p300 [119]. Взаимодействие Snail с CBP/p300 необходимо для ацетилирования Snail, подавление ацетилирования приводит к деградации Snail через убиквитин-протеасомный путь [120].

В качестве потенциальных ингибиторов Snail рассматриваются ингибиторы протеасом, хотя в целом их роль в регуляции ответа опухолевых клеток на гипоксию довольно противоречива. С одной стороны, деградация Snail происходит с участием протеасом, и ингибирование последних может стабилизировать Snail (как в случае применения MG-132 [121]). С другой стороны, известны примеры, когда некоторые протеасомные ингибиторы, такие как NPI-0052 (салиноспорамид А), косвенно приводили к ингибированию Snail, взаимодействуя с компонентами других сигнальных путей. Так, согласно данным, полученным S. Baritaki и соавт., ингибитор протеасом NPI-0052 снижает уровень экспрессии как NF-κB, так и Snail и индуцирует экспрессию RKIP, что приводит к сенсибилизации клеток к CDDP и TRAIL [122].

Еще одним подходом к подавлению Snail является ингибирование деубиквитиназы DUB3, которая защищает Snail от протеасомной деградации, удаляя с молекулы убиквитиновые метки. Одним из ингибиторов DUB3 является малая молекула WP1130. Показано, что это соединение вызывает деградацию Snail, что приводит к подавлению роста и миграции клеток РМЖ [123, 124].

Ингибиторы XPO1/CRM1 (exportin 1/chromosomal region maintenance 1), также известные как селективные ингибиторы ядерного экспорта (SINE), оказывают существенное влияние на активность Snail [125]. Белок Snail содержит последовательность ядерного экспорта (NES), которая позволяет XPO1/CRM1 связываться с ним и транспортировать его из ядра в цитоплазму. При различных патологических состояниях, включая злокачественные опухоли, наблюдается повышенная экспрессия XPO1/CRM1 [126, 127]. Это приводит к усиленному экспорту многих белков из ядра, включая опухолевые супрессоры (например, p53, p21, FOXO3a), и, что важно, белка Snail [128]. Ингибиторы XPO1/CRM1, такие как селинексор (Selinexor, KPT-330), KPT-185 и лептомицин B (LMB), способствуют накоплению Snail в ядре, что в итоге приводит к его деградации [125].

Из известных противоопухолевых соединений к отрицательным регуляторам Snail можно отнести кверцетин и метформин. J.H. Chang и соавт. на клеточных линиях немелкоклеточного рака легкого показали, что кверцетин ингибирует экспрессию Snail и других белков, связанных с ЭМП: Slug, Twist, N-кадгерина [129]. На клеточных линиях рака легкого и РМЖ продемонстрировано, что метформин вызывает снижение уровня экспрессии Snail и Slug и приводит к повышению уровня экспрессии E-кадгерина – ключевого эпителиального маркера [130].

Ингибиторы STAT3

Ингибиторы STAT3 могут действовать путем предотвращения фосфорилирования STAT3 по остатку тирозина-705 (Y705) протеинкиназами, такими как JAK или Src, или предотвращения димеризации, ядерной транслокации, связывания с ДНК и/или стимулирования убиквитинзависимой деградации [131].

Одним из наиболее изученных ингибиторов STAT3 является Stattic (6-нитро-1-бензотиофен 1,1-диоксид) – малый молекулярный ингибитор, связывающийся с SH2-доменом STAT3 и предотвращающий фосфорилирование, димеризацию и проникновение в ядро. Stattic приводит к подавлению экспрессии генов, регулируемых STAT3, и к апоптозу в STAT3-зависимых опухолевых клетках [132], а также потенцирует эффективность химиотерапевтических средств, таких как доксорубицин [133], повышает чувствительность опухолевых клеток к облучению [134, 135].

WP1066 ((S, E)-3-(6-бромпиридин-2-ил)-2-циано-N-(1-фенилэтил)акриламид) предотвращает димеризацию STAT3 и ядерную транслокацию, а также стабилизирует неактивную конформацию STAT3. WP1066 активен в отношении опухолей различных типов с гиперэкспрессией STAT3, включая почечно-клеточный рак [136], рак мочевого пузыря [137], яичников [138], РМЖ [139] и др.

5,15-DPP (5,15-дифенилпорфирин) нарушает фосфорилирование STAT3, взаимодействуя с его доменом SH2. При этом 5,15-DPP не только вызывает подавление STAT3, но и снижает уровень HIF-1α, что подтверждает регуляцию экспрессии HIF-1α со стороны STAT3 [140].

Еще одним перспективным ингибитором STAT3 является никлозамид – соединение, описанное в 1950-х годах как противогельминтное средство. Впоследствии выявлены его противоопухолевые эффекты, связанные не только с подавлением STAT3 (препарат препятствует димеризации STAT3 и ядерной транслокации, нарушая его взаимодействие с коактиваторами), но и с воздействием на вышележащие сигнальные пути [141]. X. Ren и соавт. провели репортерный анализ и выявили, что никлозамид является сильным ингибитором STAT3 и подавляет его транскрипционную активность [142]. Показано, что этот препарат ингибирует образование сфероидов РМЖ и индуцирует апоптоз *in vitro* и рост опухоли *in vivo* [143]. Помимо этого, никлозамид подавляет сигнальные каскады Wnt/β-катенин [144], mTORC1 [145], Akt, ERK, Src и ингибирует ЭМП [146].

Еще одним перспективным ингибитором STAT3 является галиеллалактон – метаболит грибов, малая молекула, которая ковалентно связывается с остатками цистеина Cys-367, Cys-468, Cys-542. Это ковалентное взаимодействие препятствует связыванию STAT3 с ДНК и не зависит от статуса фосфорилирования STAT3 [147]. На клетках рака предстательной железы было показано, что галиеллалактон индуцирует апоптоз в p-STAT3-положительных клетках рака предстательной железы (андроген-нечувствительных DU145 и PC-3), но не в клетках, лишенных p-STAT3 (андрогенчувствительных LNCaP). Примечательно, что модифицированные соединения на основе этого препарата эффективны в отношении клеток трижды негативного РМЖ и подавляют фосфорилирование STAT3 [148].

Ингибиторы фактора 2, связанного с ядерным фактором эритроида

Существует несколько ингибиторов NRF2, которые можно рассматривать в контексте сенсибилизации клеток к гипоксии. Упомянутый выше брусатол – наиболее изученный природный ингибитор NRF2, природное соединение, относящееся к классу квассиноидов (тетрациклических тритерпеноидов). Его выделяют из растения *Brucea javanica*, которое традиционно используется в китайской медицине [149]. Брусатол ускоряет деградацию NRF2 за счет стимуляции убиквитинирования данного белка, а также нарушения его трансляции [150]. Снижение уровня NRF2 приводит к подавлению экспрессии его нижестоящих генов-мишеней, которые кодируют ферменты антиоксидантной защиты (например, ферменты синтеза глутатиона, гемоксигеназу-1) и белки, участвующие в детоксикации и выведении лекарств. Подавление антиоксидантной защиты делает опухолевые клетки более уязвимыми к АФК [151]. Брусатол повышает чувствительность широкого спектра опухолевых клеток к традиционным химиотерапевтическим препаратам (например, цисплатину, гемцитабину, иринотекану), способствует индукции апоптоза и ферроптоза и рассматривается как перспективный адъювантный химиотерапевтический препарат [152, 153]. Исследования *in vitro* и *in vivo* демонстрируют эффективность данного препарата в качестве адъювантного средства при лечении рака легкого, поджелудочной железы, колоректального рака, рака печени и других новообразований [154].

Еще одним природным ингибитором NRF2 является триптолид – дитерпеноид, основной активный компонент китайского травянистого растения *Trypterigium wilfordii*. Данное соединение обладает мощной противовоспалительной, иммуносупрессивной и противоопухолевой активностью [155]. В нормальных клетках при невысоких концентрациях триптолид активирует NRF2, однако в опухолевых клетках он действует как ингибитор NRF2, способствуя его ядерному экспорту и деградации в цитоплазме [156]. Ингибирование NRF2 триптолидом блокирует антиоксидантный ответ, что приводит к накоплению АФК и в конечном счете вызывает апоптоз и повышает чувствительность опухолевых клеток к химиотерапии, поскольку активация NRF2 может положительно регулировать HIF-1α и, наоборот, триптолид способен сенсибилизировать к гипоксии устойчивые к ее действию опухолевые клетки. Более того, данное соединение является и ингибитором NF-κB [157].

К ингибиторам NRF2 относится также ML385 – низкомолекулярное синтетическое соединение, которое связывается с белком NRF2 через домен Neh1 и ингибирует способность NRF2 взаимодействовать со своим кофактором sMAF и связываться с регуляторными последовательностями ДНК (ARE); в результате блокируется транскрипционная активность NRF2 и подавляется экспрессия его целевых генов. Эффекты соединения (подавление клеточного роста и сенсибилизация к химиотерапевтическим препаратам) продемонстрированы на клетках немелкоклеточного рака легкого [158], плоскоклеточного рака головы и шеи [159] и др. Исследовано влияние ML385 на индуцированную гипоксией химиорезистентность клеток РМЖ MDA-MB-231 [160]. Обнаружено, что гипоксия заметно повышает уровень экспрессии NRF2 и гемоксигеназы-1, при этом обработка ML385 нивелировала эти эффекты и дозозависимым образом подавляла индуцированную гипоксией резистентность клеток к доксорубицину, цисплатину и олапарибу, а также ингибировала экспрессию маркеров стволовости (NOTCH1, SOX9, NANOG и OCT4).

Ингибиторы OCT4, SOX2 и NANOG

К числу ингибиторов OCT4 относится транс-ретиноевая кислота (all-trans retinoic acid, ATRA). ATRA связывается с рецептором ретиноевой кислоты α (RARα) и активирует ERK, что приводит к индукции тестикулярного ядерного рецептора (TR2) – ингибитора транскрипции гена OCT4 – и в результате вызывает дифференцировку клеток [161]. Результаты исследования C.S. Lu и соавт. продемонстрировали, что ATRA подавляет экспрессию OCT4 и повышает чувствительность клеток рака мочевого пузыря к цисплатину, причем комбинация цисплатина и ATRA была более эффективна, чем цисплатин в монорежиме [162].

Еще одно соединение – KRIBB53 (2’,4-dihydroxy-3, 4’,6’-trimethoxychalcone) – было идентифицировано как ингибитор OCT4 посредством скрининга химической библиотеки с использованием репортерной конструкции, кодирующей люциферазу под контролем OCT4. J. Jung и соавт. выявили, что данное соединение ингибирует экспрессию OCT4 и его таргетных генов *NANOG* и *USP44* в плюрипотентных клетках эмбриональной карциномы NCCIT [163]. С использованием различных методов продемонстрировано непосредственное связывание ингибитора с мишенью OCT4, также показано *in vivo*, что введение KRIBB53 мышам с ксенотрансплантированными клетками NCCIT уменьшает объем опухолей на 77 %.

Описан также ингибитор OCT4 – производное триптофана ITE (2-(1’H-indole-3’-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester). Показано, что данное соединение является агонистом рецептора арильного углеводородного рецептора AhR, негативного регулятора OCT4, оно способствует усилению связывания AhR с промотором OCT4, подавляя его транскрипцию [165]. На клетках глиобластомы U87 продемонстрировано, что ITE подавляет и индуцированное гипоксией накопление OCT4, что доказывает перспективность применения ITE для сенсибилизации к гипоксии клеток, устойчивых к пониженному содержанию кислорода [164].

Прямые ингибиторы SOX2 практически не описаны, поскольку данный белок в силу его структурных особенностей является «неуловимой» (undruggable) мишенью [165]. Подходы к ингибированию SOX2 сводятся к использованию искусственных транскрипционных факторов по типу цинковых пальцев (ZF-ATF) ZF-552SKD, ZF-598SKD и ZF-619SKD, связывающихся с промотором *SOX2* и снижающих уровни его мРНК, однако данные конструкции доставляются посредством вирусов, что ограничивает их применение [166]. Также используются пептидные аптамеры [167], селективные ДНК-связывающие синтетические молекулы – шпилечные пиррол-имидазольные полиамиды (PIP-S2), ингибирующие связывание SOX2 с ДНК [168], и ингибиторы вышестоящих сигнальных путей [165].

Также практически нет описаний непосредственных ингибиторов NANOG, по аналогии с SOX2, из-за особенностей структуры белка. В настоящее время изучаются опосредованные ингибиторы NANOG. К выявленным негативным регуляторам NANOG относятся урогинины (циклогексилметилфлавоноиды) – природные соединения, выделенные из корневищ китайского лекарственного растения *Helminthostachys zeylanica*. Результаты исследования W.-Y. Liao и соавт. показали, что урогинины J и K ингибируют образование маммосфер и подавляют рост ксенотрансплантатов опухолей, снижая уровень белка NANOG посредством активации p53 [169]. Через p53 действует и другой ингибитор NANOG – нокодазол. Показано, что обработка им эмбриональных стволовых клеток человека (hESC) приводит к снижению экспрессии маркеров плюрипотентности NANOG и OCT4 на фоне повышения уровня p53 и активации апоптоза [170].

Проблема поиска эффективных ингибиторов регуляторов плюрипотентности и стволовости связана не только с особенностями структур этих белков, но и с их участием в поддержании функции нормальных стволовых клеток, необходимых для нормального функционирования организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Солидные опухоли, для которых свойственен рост в условиях хронической гипоксии, приобретают устойчивость к пониженному содержанию кислорода; эти условия способствуют дальнейшей злокачественной прогрессии, приобретению склонности к лекарственной устойчивости и метастазированию. Активация HIF-1α, обусловленная гипоксией, приводит к мощной индукции его генов-мишеней, к которым относятся факторы, способствующие ангиогенезу, перестройке метаболизма и активации ЭМП. В результате HIF-1α запускает реаранжировку сигнальных каскадов, таких как STAT3, Snail, NRF2, OCT4, SOX2, NANOG4 и др. Эти сигнальные пути регулируются гипоксией, тесно связаны друг с другом и усиливают как друг друга, так и каскад HIF-1α. Скоординированная активация этих сигнальных путей способствует адаптации опухолевых клеток к хронической гипоксии, поэтому воздействие на данные каскады может быть перспективным подходом для сенсибилизации опухолевых клеток к хронической гипоксии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. Cancer Res 1989;49(23):6449–65.
2. Martin J.D., Fukumura D., Duda D.G. et al. Reengineering the tumor microenvironment to alleviate hypoxia and overcome cancer heterogeneity. Cold Spring Harb Perspect Med 2016;6(12):a027094. DOI: 10.1101/cshperspect.a027094
3. Zheng R., Li F., Li F. et al. Targeting tumor vascularization: promising strategies for vascular normalization. J Cancer Res Clin Oncol 2021;147(9):2489–505. DOI: 10.1007/s00432-021-03701-8
4. Bayer C., Vaupel P. Acute *versus* chronic hypoxia in tumors: controversial data concerning time frames and biological consequences. Strahlenther Onkol 2012;188(7):616–27. DOI: 10.1007/s00066-012-0085-4
5. Perez-Tomas R., Perez-Guillen I. Lactate in the tumor microenvironment: an essential molecule in cancer progression and treatment. Cancers (Basel) 2020;12(11):3244. DOI: 10.3390/cancers12113244
6. Zheng J. Energy metabolism of cancer: glycolysis *versus* oxidative phosphorylation. Oncol Lett 2012;4(6):1151–7. DOI: 10.3892/ol.2012.928
7. Lunt S.Y., Vander Heiden M.G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. Ann Rev Cell Develop Biol 2011;27(1):441–64. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237
8. Jaeken J., Detheux M., Van Maldergem L. et al. 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency: an inborn error of serine biosynthesis. Arch Dis Child 1996;74(6):542–5. DOI: 10.1136/adc.74.6.542
9. Zhao X., Fu J., Du J. et al. The role of D-3-phosphoglycerate dehydrogenase in cancer. Int J Biol Sci 2020;16(9):1495–506. DOI: 10.7150/ijbs.41051
10. Garber A., Karl I., Kipnis D. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. I. Glycolysis and amino acid release. J Biol Chem 1976;251(3):826–35.
11. Hayashi M., Sakata M., Takeda T. et al. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1α under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. J Endocrinol 2004;183(1):145–54. DOI: 10.1677/joe.1.05599
12. Ryniawec J.M., Coope M.R., Loertscher E. et al. GLUT3/SLC2A3 is an endogenous marker of hypoxia in prostate cancer cell lines and patient-derived xenograft tumors. Diagnostics (Basel) 2022;12(3):676. DOI: 10.3390/diagnostics12030676
13. Kierans S.J., Taylor C.T. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. J Physiol 2021;599(1):23–37. DOI: 10.1113/JP280572
14. Kim J.W., Tchernyshyov I., Semenza G.L. et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. Cell Metab 2006;3(3):177–85. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.02.002
15. Ji K., Mayernik L., Moin K. et al. Acidosis and proteolysis in the tumor microenvironment. Cancer Metastasis Rev 2019; 38(1-2):103–12. DOI: 10.1007/s10555-019-09796-3
16. Mahoney B.P., Raghunand N., Baggett B. et al. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents *in vitro*. Biochem Pharmacol 2003;66(7):1207–18. DOI: 10.1016/s0006-2952(03)00467-2
17. Damgaci S., Ibrahim-Hashim A., Enriquez-Navas P.M. et al. Hypoxia and acidosis: immune suppressors and therapeutic targets. Immunology 2018;154(3):354–62. DOI: 10.1111/imm.12917
18. Semenza G.L. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. Crit Rev Biochem Mol Biol 2000;35(2):71–103. DOI: 10.1080/10409230091169186
19. Vaupel P., Mayer A., Briest S. et al. Hypoxia in breast cancer: role of blood flow, oxygen diffusion distances, and anemia in the development of oxygen depletion. Adv Exp Med Biol 2005;566:333–42. DOI: 10.1007/0-387-26206-7_44
20. Loboda A., Jozkowicz A., Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors – similar but not identical. Mol Cells 2010;29:435–42. DOI: 10.1007/s10059-010-0067-2
21. Keith B., Johnson R.S., Simon M.C. HIF1α and HIF2α: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. Nat Rev Cancer 2012;12(1):9–22. DOI: 10.1038/nrc3183
22. Huang L.E., Gu J., Schau M. et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1α is mediated by an O_2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95(14):7987–92. DOI: 10.1073/pnas.95.14.7987
23. Weidemann A., Johnson R. Biology of HIF-1α. Cell Death Differ 2008;15(4):621–7. DOI: 10.1038/cdd.2008.12.
24. Semenza G.L., Jiang B.-H., Leung S.W. et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem 1996;271(51):32529–37. DOI: 10.1074/jbc.271.51.32529
25. Lee J.-W., Bae S.-H., Jeong J.-W. et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α: its protein stability and biological functions. Exp Mol Med 2004;36(1):1–12. DOI: 10.1038/emm.2004.1
26. Piret J.P., Mottet D., Raes M. et al. Is HIF-1 alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? Biochem Pharmacol 2002;64(5–6): 889–92. DOI: 10.1016/s0006-2952(02)01155-3
27. Suzuki H., Tomida A., Tsuruo T. Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. Oncogene 2001;20(41):5779–88. DOI: 10.1038/sj.onc.1204742
28. Gruber G., Greiner R.H., Hlushchuk R. et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? Breast Cancer Res 2004;6:1–8. DOI: 10.1186/bcr775
29. Yamamoto Y., Ibusuki M., Okumura Y. et al. Hypoxia-inducible factor 1α is closely linked to an aggressive phenotype in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2008;110:465–75. DOI: 10.1007/s10549-007-9742-1
30. Schindl M., Schoppmann S.F., Samonigg H. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1α is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. Clinical Cancer Res 2002;8(6):1831–7.
31. El Shorbagy S., abuTaleb F., Labib H.A. et al. Prognostic significance of VEGF and HIF-1 α in hepatocellular carcinoma patients receiving sorafenib *versus* metformin sorafenib combination. J Gastrointestinal Cancer 2021;52(1):269–79. DOI: 10.1007/s12029-020-00389-w
32. Ye L.-Y., Zhang Q., Bai X.-L. et al. Hypoxia-inducible factor 1α expression and its clinical significance in pancreatic cancer: a meta-analysis. Pancreatology 2014;14(5):391–7. DOI: 10.1016/j.pan.2014.06.008.
33. Zheng H., Ning Y., Zhan Y. et al. Co-expression of PD-L1 and HIF-1α predicts poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer after surgery. J Cancer 2021;12(7):2065. DOI: 10.7150/jca.53119
34. Niu G., Ma X. Expression of Trx-1, HIF-1α and their associations with clinicopathological parameters in gastric cancer. Eurasian J Med Oncol 2023;8:371–7. DOI: 10.14744/ejmo.2024.97176
35. Wilson W.R., Hay M.P. Targeting hypoxia in cancer therapy. Nat Rev Cancer 2011;11(6):393–410. DOI: 10.1038/nrc3064
36. Kronblad Å., Jirström K., Rydén L. et al. Hypoxia inducible factor-1α is a prognostic marker in premenopausal patients with intermediate to highly differentiated breast cancer but not a predictive marker for tamoxifen response. Int J Cancer 2006;118(10):2609–16. DOI: 10.1002/ijc.21676
37. Ma B., Wen S., Luo Y. et al. Targeting tumor hypoxia inhibits aggressive phenotype of dedifferentiated thyroid cancer. J Clin

Endocrinol Metab 2023;108(2):368–84. DOI: 10.1210/clinem/dgac548

38. Pezzuto A., Perrone G., Orlando N. et al. A close relationship between HIF-1 alpha expression and bone metastases in advanced NSCLC, a retrospective analysis. Oncotarget 2019;10(66):7071–9. DOI: 10.18632/oncotarget.27378
39. Berghoff A.S., Ilhan-Mutlu A., Wohrer A. et al. Prognostic significance of Ki67 proliferation index, HIF1 alpha index and microvascular density in patients with non-small cell lung cancer brain metastases. Strahlenther Onkol 2014;190(7):676–85. DOI: 10.1007/s00066-014-0639-8
40. Wada Y., Morine Y., Imura S. et al. HIF-1 alpha expression in liver metastasis but not primary colorectal cancer is associated with prognosis of patients with colorectal liver metastasis. World J Surg Oncol 2020;18(1):241. DOI: 10.1186/s12957-020-02012-5
41. De Herreros A.G., Peiro S., Nassour M. et al. Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2010;15(2):135–47. DOI: 10.1007/s10911-010-9179-8
42. Loh C.Y., Chai J.Y., Tang T.F. et al. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges. Cells 2019;8(10):1118. DOI: 10.3390/cells8101118
43. Nieto M.A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3(3):155–66. DOI: 10.1038/nrm757
44. Peinado H., Ballestar E., Esteller M. et al. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1(HDAC1)/HDAC2 complex. Mol Cell Biol 2004;24(1):306–19. DOI: 10.1128/MCB.24.1.306-319.2004
45. Markouli M., Strepkos D., Basdra E.K. et al. Prominent role of histone modifications in the regulation of tumor metastasis. Int J Mol Sci 2021;22(5):2778. DOI: 10.3390/ijms22052778
46. Wu Y.-D., Zhou B. TNF-α/NF-κB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. Br J Cancer 2010;102(4):639–44. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605530
47. Cho H.J., Baek K.E., Saika S. et al. Snail is required for transforming growth factor-β-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway. Biochem Biophys Res Commun 2007;353(2):337–43. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.12.035.
48. Katoh M., Katoh M. Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3β to regulate β-catenin and SNAIL signaling cascades. Cancer Biol Ther 2006;5(9):1059–64. DOI: 10.4161/cbt.5.9.3151
49. Saitoh M., Endo K., Furuya S. et al. STAT3 integrates cooperative Ras and TGF-β signals that induce Snail expression. Oncogene 2016;35(8):1049–57. DOI: 10.1038/onc.2015.161
50. Zhu G.-H., Huang C., Feng Z.-Z. et al. Hypoxia-induced snail expression through transcriptional regulation by HIF-1α in pancreatic cancer cells. Dig Dis Sci 2013;58(12):3503–15. DOI: 10.1007/s10620-013-2841-4
51. Bottner J., Ribbat-Idel J., Klapper L. et al. Elevated LSD1 and SNAIL expression indicate poor prognosis in hypopharynx carcinoma. Int J Mol Sci 2022;23(9):5075. DOI: 10.3390/ijms23095075
52. Hutasoit G.A., Miskad U.A., Akil F. et al. Snail expression as a prognostic factor in colorectal adenocarcinoma. Asian Pac J Cancer Prev 2024;25(9):3143–9. DOI: 10.31557/APJCP.2024.25.9.3143
53. Yang S.-W., Zhang Z.-G., Hao Y.-X. et al. HIF-1α induces the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer stem cells through the Snail pathway. Oncotarget 2017;8(6):9535. DOI: 10.18632/oncotarget.14484
54. Xu X., Tan X., Tampe B. et al. Snail is a direct target of hypoxia-inducible factor 1α (HIF1α) in hypoxia-induced endothelial to mesenchymal transition of human coronary endothelial cells. J Biol Chem 2015;290(27):16653–64. DOI: 10.1074/jbc.M115.63694
55. Jing S.-W., Wang Y.-D., Kuroda M. et al. HIF-1α contributes to hypoxia-induced invasion and metastasis of esophageal carcinoma via inhibiting E-cadherin and promoting MMP-2 expression. Acta Medica Okayama 2012;66(5):399–407. DOI: 10.18926/AMO/48964
56. Domingos P.L.B., Souza M.G., Guimarães T.A. et al. Hypoxia reduces the E-cadherin expression and increases OSCC cell migration regardless of the E-cadherin methylation profile. Pathol Res Pract 2017;213(5):496–501. DOI: 10.1016/j.prp.2017.02.003
57. Imai T., Horiuchi A., Wang C. et al. Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. Am J Pathol 2003;163(4):1437–47. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63501-8
58. Scherbakov A.M., Andreeva O.E., Shatskaya V.A. et al. The relationships between snail1 and estrogen receptor signaling in breast cancer cells. J Cell Biochem 2012;113(6):2147–55. DOI: 10.1002/jcb.24087
59. Koong A.C., Chen E.Y., Giaccia A.J. Hypoxia causes the activation of nuclear factor κB through the phosphorylation of IκBα on tyrosine residues. Cancer Res 1994;54(6):1425–30.
60. Taylor C.T., Cummins E.P. The role of NF-kappaB in hypoxia-induced gene expression. Ann NY Acad Sci 2009;1177:178–84. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05024.x
61. Van Uden P., Kenneth N.S., Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. Biochem J 2008;412(3): 477–84. DOI: 10.1042/BJ20080476
62. Kim E., Kim M., Woo D.-H. et al. Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. Cancer Cell 2013;23(6):839–52. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.04.008
63. Xie Q., Zhu Z., He Y. et al. A lactate-induced Snail/STAT3 pathway drives GPR81 expression in lung cancer cells. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 2020;1866(1):165576. DOI: 10.1016/j.bbadis.2019.165576
64. Li Y., Cui N., Zheng P.S. et al. BMX/Etk promotes cell proliferation and tumorigenicity of cervical cancer cells through PI3K/AKT/mTOR and STAT3 pathways. Oncotarget 2017;8(30):49238–52. DOI: 10.18632/oncotarget.17493
65. Escriva M., Peiro S., Herranz N. et al. Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis. Mol Cell Biol 2008;28(5):1528–40. DOI: 10.1128/MCB.02061-07
66. Bu L., Wang H., Pan J.-A. et al. PTEN suppresses tumorigenesis by directly dephosphorylating Akt. Signal Transduct Target Ther 2021;6(1):262. DOI: 10.1038/s41392-021-00571-x
67. Liu W.H., Chen M.T., Wang M.L. et al. Cisplatin-selected resistance is associated with increased motility and stem-like properties via activation of STAT3/Snail axis in atypical teratoid/rhabdoid tumor cells. Oncotarget 2015;6(3):1750–68. DOI: 10.18632/oncotarget.2737
68. Xiao J., Wang J., Li J. et al. L3MBTL3 and STAT3 collaboratively upregulate SNAIL expression to promote metastasis in female breast cancer. Nat Commun 2025;16(1):231. DOI: 10.1038/s41467-024-55617-9
69. Darnell J.E. Jr. STATs and gene regulation. Science 1997;277(5332):1630–5. DOI: 10.1126/science.277.5332.1630
70. Li Y., Wang Y., Shi Z. et al. Clinicopathological and prognostic role of STAT3/p-STAT3 in breast cancer patients in China: a meta-analysis. Sci Rep 2019;9(1):11243. DOI: 10.1038/s41598-019-47556-z
71. Don-Doncow N., Marginean F., Coleman I. et al. Expression of STAT3 in prostate cancer metastases. Eur Urol 2017;71(3):313–6. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.06.018
72. Xu Y., Lu S. A meta-analysis of STAT3 and phospho-STAT3 expression and survival of patients with non-small-cell lung cancer. Eur J Surg Oncol 2014;40(3):311–7. DOI: 10.1016/j.ejso.2013.11.012
73. Levy D.E., Darnell J.E. Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3(9):651–62. DOI: 10.1038/nrm909

74. Bowman T., Garcia R., Turkson J. et al. STATs in oncogenesis. Oncogene 2000;19(21):2474–88. DOI: 10.1038/sj.onc.1203527
75. Yang J., Stark G.R. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. Cell Res 2008;18(4):443–51. DOI: 10.1038/cr.2008.41
76. Garcia R., Bowman T.L., Niu G. et al. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. Oncogene 2001;20(20):2499–513. DOI: 10.1038/sj.onc.1204349
77. Johnson D.E., O'Keefe R.A., Grandis J.R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. Nat Rev Clin Oncol 2018;15(4):234–48. DOI: 10.1038/nrclinonc.2018.8
78. Chang Q., Bournazou E., Sansone P. et al. The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. Neoplasia 2013;15(7):848–62. DOI: 10.1593/neo.13706
79. Turkson J., Bowman T., Garcia R. et al. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. Mol Cell Biol 1998;18(5):2545–52. DOI: 10.1128/MCB.18.5.2545
80. Leslie K., Lang C., Devgan G. et al. Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. Cancer Res 2006;66(5):2544–52. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2203
81. Banerjee K., Resat H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: a review. Int J Cancer 2016;138(11):2570–8. DOI: 10.1002/ijc.29923
82. Fan C., Li J., Li Y. et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates the interleukin-6 production by B cells in rheumatoid arthritis. Clin Transl Immunology 2023;12(5):e1447. DOI: 10.1002/cti2.1447
83. Simon A.R., Rai U., Fanburg B.L. et al. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. Am J Physiol 1998;275(6):1640–52. DOI: 10.1152/ajpcell.1998.275.6.C1640
84. Mattagajasingh S.N., Yang X.P., Irani K. et al. Activation of Stat3 in endothelial cells following hypoxia-reoxygenation is mediated by Rac1 and protein kinase C. Biochim Biophys Acta 2012;1823(5):997–1006. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.008
85. Faruqi T.R., Gomez D., Bustelo X.R. et al. Rac1 mediates STAT3 activation by autocrine IL-6. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98(16):9014–9. DOI: 10.1073/pnas.161281298
86. Torrente L., DeNicola G.M. Targeting NRF2 and its downstream processes: opportunities and challenges. Ann Rev Pharmacol Toxicol 2022;62:279–300. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-052220-104025
87. Almeida M., Soares M., Ramalhinho A.C. et al. The prognostic value of NRF2 in breast cancer patients: a systematic review with meta-analysis. Breast Cancer Res Treat 2020;179(3):523–32. DOI: 10.1007/s10549-019-05494-4
88. Wang Q., Xu L., Wang G. et al. Prognostic and clinicopathological significance of NRF2 expression in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. PLoS One 2020;15(11):e0241241. DOI: 10.1371/journal.pone.0241241
89. Jeddi F., Soozangar N., Sadeghi M.R. et al. Nrf2 overexpression is associated with P-glycoprotein upregulation in gastric cancer. Biomed Pharmacother 2018;97:286–92. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.129
90. Gall Trošelj K., Tomljanović M., Jaganjac M. et al. Oxidative stress and cancer heterogeneity orchestrate NRF2 roles relevant for therapy response. Molecules 2022;27(5):1468. DOI: 10.3390/molecules27051468
91. Hirotsu Y., Katsuoka F., Funayama R. et al. Nrf2–MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. Nucleic Acids Res 2012;40(20):10228–39. DOI: 10.1093/nar/gks827
92. Rojo de la Vega M., Chapman E., Zhang D.D. NRF2 and the hallmarks of cancer. Cancer Cell 2018;34(1):21–43. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.03.022
93. Menegon S., Columbano A., Giordano S. The dual roles of NRF2 in cancer. Trends Mol Med 2016;22(7):578–93. DOI: 10.1016/j.molmed.2016.05.002
94. Martinez V.D., Vucic E.A., Pikor L.A. et al. Frequent concerted genetic mechanisms disrupt multiple components of the NRF2 inhibitor KEAP1/CUL3/RBX1 E3-ubiquitin ligase complex in thyroid cancer. Mol Cancer 2013;12(1):124. DOI: 10.1186/1476-4598-12-124
95. Robertson H., Dinkova-Kostova A.T., Hayes J.D. NRF2 and the ambiguous consequences of its activation during initiation and the subsequent stages of tumourigenesis. Cancers (Basel) 2020;12(12):3609. DOI: 10.3390/cancers12123609
96. Wakabayashi N., Shin S., Slocum S.L. et al. Regulation of notch1 signaling by nrf2: implications for tissue regeneration. Sci Signal 2010;3(130):ra52. DOI: 10.1126/scisignal.2000762
97. He F., Ru X., Wen T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. Int J Mol Sci 2020;21(13):4777. DOI: 10.3390/ijms21134777
98. Kim T.H., Hur E.G., Kang S.J. et al. NRF2 blockade suppresses colon tumor angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1α. Cancer Res 2011;71(6):2260–75. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3007
99. Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. Trends Biochem Sci 2014;39(4):199–218. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.02.002
100. Bae T., Hallis S.P., Kwak M.K. Hypoxia, oxidative stress, and the interplay of HIFs and NRF2 signaling in cancer. Exp Mol Med 2024;56(3):501–14. DOI: 10.1038/s12276-024-01180-8
101. Lu Y., Wang B., Shi Q. et al. Brusatol inhibits HIF-1 signaling pathway and suppresses glucose uptake under hypoxic conditions in HCT116 cells. Sci Rep 2016;6:39123. DOI: 10.1038/srep39123
102. Rodda D.J., Chew J.L., Lim L.H. et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. J Biol Chem 2005;280(26):24731–7. DOI: 10.1074/jbc.M502573200
103. Frank N.Y., Schatton T., Frank M.H. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. J Clin Invest 2010;120(1):41–50. DOI: 10.1172/JCI41004
104. Basati G., Mohammadpour H., Emami Razavi A. Association of high expression levels of SOX2, NANOG, and OCT4 in gastric cancer tumor tissues with progression and poor prognosis. J Gastrointest Cancer 2020;51(1):41–7. DOI: 10.1007/s12029-018-00200-x
105. You L., Guo X., Huang Y. Correlation of cancer stem-cell markers OCT4, SOX2, and NANOG with clinicopathological features and prognosis in operative patients with rectal cancer. Yonsei Med J 2018;59(1):35–42. DOI: 10.3349/ymj.2018.59.1.35
106. Irawan R.C.S., Hidayah N., Wilaksono B. Hypoxia-Induced Modulation of OCT-4, SOX-2, NANOG, and KLF-4 expression in mesenchymal stem cells. Int J Cell Biomed Sci 2024;3(9):282–9. DOI: 10.59278/cbs.v3i9.62
107. Xiong S., Wang D., Tang Y. et al. HIF1α and HIF2α regulate non-small-cell lung cancer dedifferentiation *via* expression of Sox2 and Oct4 under hypoxic conditions. Gene 2023;863:147288. DOI: 10.1016/j.gene.2023.147288
108. Zhou W., Lv R., Qi W. et al. Snail contributes to the maintenance of stem cell-like phenotype cells in human pancreatic cancer. PLoS One 2014;9(1):e87409. DOI: 10.1371/journal.pone.0087409
109. Do D.V., Ueda J., Messerschmidt D.M. et al. A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. Genes Dev 2013;27(12):1378–90. DOI: 10.1101/gad.221176.113
110. Liu S., Sun J., Cai B. et al. NANOG regulates epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance through activation of the STAT3 pathway in epithelial ovarian cancer. Tumor Biol 2016;37(7):9671–80. DOI: 10.1007/s13277-016-4848-x
111. Tennant D.A., Gottlieb E. HIF prolyl hydroxylase-3 mediates alpha-ketoglutarate-induced apoptosis and tumor suppression. J Mol Med (Berl) 2010;88(8):839–49. DOI: 10.1007/s00109-010-0627-0
112. Tennant D.A., Frezza C., MacKenzie E.D. et al. Reactivating HIF prolyl hydroxylases under hypoxia results in metabolic catastrophe and cell death. Oncogene 2009;28(45):4009–21. DOI: 10.1038/onc.2009.250
113. Riby J.E., Firestone G.L., Bjeldanes L.F. 3, 3'-Diindolylmethane reduces levels of HIF-1α and HIF-1 activity in hypoxic cultured

human cancer cells. Biochem Pharmacol 2008;75(9):1858–67. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.01.017
114. Zeng M., Shen J., Liu Y. et al. The HIF-1 antagonist acriflavine: visualization in retina and suppression of ocular neovascularization. J Mol Med (Berl) 2017;95(4):417–29. DOI: 10.1007/s00109-016-1498-9
115. Shay J.E., Imtiyaz H.Z., Sivanand S. et al. Inhibition of hypoxia-inducible factors limits tumor progression in a mouse model of colorectal cancer. Carcinogenesis 2014;35(5):1067–77. DOI: 10.1093/carcin/bgu004
116. Mangraviti A., Raghavan T., Volpin F. et al. HIF-1α-targeting acriflavine provides long term survival and radiological tumor response in brain cancer therapy. Sci Rep 2017;7(1):14978. DOI: 10.1038/s41598-017-14990-w
117. Lee C.J., Yue C.H., Lin Y.Y. et al. Antitumor activity of acriflavine in human hepatocellular carcinoma cells. Anticancer Res 2014;34(7):3549–56.
118. Ball A.T., Mohammed S., Doigneaux C. et al. Identification and development of cyclic peptide inhibitors of hypoxia inducible factors 1 and 2 that disrupt hypoxia-response signaling in cancer cells. J Am Chem Soc 2024;146(13):8877–86. DOI: 10.1021/jacs.3c10508
119. Li H.M., Bi Y.R., Li Y. et al. A potent CBP/p300-Snail interaction inhibitor suppresses tumor growth and metastasis in wild-type p53-expressing cancer. Sci Adv 2020;6(17):eaaw8500. DOI: 10.1126/sciadv.aaw8500
120. Chuang K.T., Chiou S.S., Hsu S.H. Recent advances in transcription factors biomarkers and targeted therapies focusing on epithelial-mesenchymal transition. Cancers (Basel) 2023;15(13). DOI: 10.3390/cancers15133338
121. Ryu K.J., Park S.M., Park S.H. et al. p38 stabilizes snail by suppressing DYRK2-mediated phosphorylation that is required for GSK3beta-betaTrCP-induced snail degradation. Cancer Res 2019;79(16):4135–48. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0049
122. Baritaki S., Yeung K., Palladino M. et al. Pivotal roles of snail inhibition and RKIP induction by the proteasome inhibitor NPI-0052 in tumor cell chemoimmunosensitization. Cancer Res 2009;69(21):8376–85. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1069
123. Wu Y., Wang Y., Lin Y. et al. Dub3 inhibition suppresses breast cancer invasion and metastasis by promoting Snail1 degradation. Nat Commun 2017;8(1):14228. DOI: 10.1038/ncomms14228
124. Guan T., Yang X., Liang H. et al. Deubiquitinating enzyme USP9X regulates metastasis and chemoresistance in triple-negative breast cancer by stabilizing Snail1. J Cell Physiol 2022;237(7):2992–3000. DOI: 10.1002/jcp.30763
125. Azmi A.S., Muqbil I., Wu J. et al. Targeting the nuclear export protein XPO1/CRM1 reverses epithelial to mesenchymal transition. Sci Rep 2015;5(1):16077. DOI: 10.1038/srep16077
126. Sendino M., Omaetxebarria M.J., Rodríguez J.A. Hitting a moving target: inhibition of the nuclear export receptor XPO1/CRM1 as a therapeutic approach in cancer. Cancer Drug Resist 2018;1(3):139–63. DOI: 10.20517/cdr.2018.09
127. Sexton R., Mahdi Z., Chaudhury R. et al. Targeting nuclear exporter protein XPO1/CRM1 in gastric cancer. Int J Mol Sci 2019;20(19):4826. DOI: 10.3390/ijms20194826
128. Newell S., van der Watt P.J., Leaner V.D. Therapeutic targeting of nuclear export and import receptors in cancer and their potential in combination chemotherapy. IUBMB Life 2024;76(1):4–25. DOI: 10.1002/iub.2773
129. Chang J.H., Lai S.L., Chen W.S. et al. Quercetin suppresses the metastatic ability of lung cancer through inhibiting Snail-dependent Akt activation and Snail-independent ADAM9 expression pathways. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 2017;1864(10):1746–58. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.06.017
130. Banerjee P., Surendran H., Chowdhury D.R. et al. Metformin mediated reversal of epithelial to mesenchymal transition is triggered by epigenetic changes in E-cadherin promoter. J Mol Med (Berl) 2016;94:1397–409. DOI: 10.1007/s00109-016-1455-7
131. Debnath B., Xu S., Neamati N. Small molecule inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3(Stat3) protein. J Med Chem 2012;55(15):6645–68. DOI: 10.1021/jm300207s
132. Guo H., Xiao Y., Yuan Z. et al. Inhibition of STAT3Y705 phosphorylation by Stattic suppresses proliferation and induces mitochondrial-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. Cell Death Discov 2022;8(1):116. DOI: 10.1038/s41420-022-00922-9
133. Mohammadian J., Mahmoudi S., Pourmohammad P. et al. Formulation of Stattic as STAT3 inhibitor in nanostructured lipid carriers (NLCs) enhances efficacy of doxorubicin in melanoma cancer cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2020;393(12):2315–23. DOI: 10.1007/s00210-020-01942-x
134. Zhang Q., Zhang C., He J. et al. STAT3 inhibitor stattic enhances radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma. Tumor Biol 2015;36(3):2135–42. DOI: 10.1007/s13277-014-2823-y
135. Xu G., Zhu L., Wang Y. et al. Stattic enhances radiosensitivity and reduces radio-induced migration and invasion in HCC cell lines through an apoptosis pathway. Biomed Res Int 2017;2017(1):1832494. DOI: 10.1155/2017/1832494
136. Horiguchi A., Asano T., Kuroda K. et al. STAT3 inhibitor WP1066 as a novel therapeutic agent for renal cell carcinoma. Br J Cancer 2010;102(11):1592–9. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605691
137. Tsujita Y., Horiguchi A., Tasaki S. et al. STAT3 inhibition by WP1066 suppresses the growth and invasiveness of bladder cancer cells. Oncol Rep 2017;38(4):2197–204. DOI: 10.3892/or.2017.5902
138. Yang J., Li N., Zhao X. et al. WP1066, a small molecule inhibitor of STAT3, chemosensitizes paclitaxel-resistant ovarian cancer cells to paclitaxel by simultaneously inhibiting the activity of STAT3 and the interaction of STAT3 with stathmin. Biochem Pharmacol 2024;221:116040. DOI: 10.1016/j.bcp.2024.116040
139. Cheng C.-C., Shi L.-H., Wang X.-J. et al. Stat3/Oct-4/c-Myc signal circuit for regulating stemness-mediated doxorubicin resistance of triple-negative breast cancer cells and inhibitory effects of WP1066. Int J Oncol 2018;53(1):339–48. DOI: 10.3892/ijo.2018.4399
140. Dodd K.M., Yang J., Shen M.H. et al. mTORC1 drives HIF-1α and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. Oncogene 2015;34(17):2239–50. DOI: 10.1038/onc.2014.164
141. Chen W., Mook R.A., Premont R.T. et al. Niclosamide: beyond an antihelminthic drug. Cell Signal 2018;41:89–96. DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.04.001
142. Ren X., Duan L., He Q. et al. Identification of niclosamide as a new small-molecule inhibitor of the STAT3 signaling pathway. ACS Med Chem Lett 2010;1(9):454–9. DOI: 10.1021/ml100146z
143. Wang Y.-C., Chao T.-K., Chang C.-C. et al. Drug screening identifies niclosamide as an inhibitor of breast cancer stem-like cells. PLoS One 2013;8(9):e74538. DOI: 10.1371/journal.pone.0074538
144. Lu W., Lin C., Roberts M.J. et al. Niclosamide suppresses cancer cell growth by inducing Wnt co-receptor LRP6 degradation and inhibiting the Wnt/β-catenin pathway. PLoS One 2011;6(12): e29290. DOI: 10.1371/journal.pone.0029290
145. Fonseca B.D., Diering G.H., Bidinosti M.A. et al. Structure-activity analysis of niclosamide reveals potential role for cytoplasmic pH in control of mammalian target of rapamycin complex 1(mTORC1) signaling. J Biol Chem 2012;287(21):17530–45. DOI: 10.1074/jbc.M112.359638
146. Liu J., Chen X., Ward T. et al. Combined niclosamide with cisplatin inhibits epithelial-mesenchymal transition and tumor growth in cisplatin-resistant triple-negative breast cancer. Tumour Biol 2016;37(7):9825–35. DOI: 10.1007/s13277-015-4650-1
147. Don-Doncow N., Escobar Z., Johansson M. et al. Galiellalactone is a direct inhibitor of the transcription factor STAT3 in prostate cancer cells. J Biol Chem 2014;289(23):15969–78. DOI: 10.1074/jbc.M114.564252

148. Kim H.S., Kim T., Ko H. et al. Identification of galiellalactone-based novel STAT3-selective inhibitors with cytotoxic activities against triple-negative breast cancer cell lines. Bioorg Med Chem 2017;25(19):5032–40. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.06.036
149. Yu X.-Q., Shang X.-Y., Huang X.-X. et al. Brusatol: a potential anti-tumor quassinoid from Brucea javanica. Chin Herb Med 2020;12(4):359–66. DOI: 10.1016/j.chmed.2020.05.007
150. Ren D., Villeneuve N.F., Jiang T. et al. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. Proc Natl Acad Sci USA 2011;108(4):1433–8. DOI: 10.1073/pnas.1014275108
151. Xie J., Lai Z., Zheng X. et al. Apoptotic activities of brusatol in human non-small cell lung cancer cells: involvement of ROS-mediated mitochondrial-dependent pathway and inhibition of Nrf2-mediated antioxidant response. Toxicology 2021;451:152680. DOI: 10.1016/j.tox.2021.152680
152. Xiang Y., Ye W., Huang C. et al. Brusatol enhances the chemotherapy efficacy of gemcitabine in pancreatic cancer via the Nrf2 signalling pathway. Oxid Med Cell Longev 2018;2018(1):2360427. DOI: 10.1155/2018/2360427
153. Qi S., Li D., Deng F. et al. Brusatol modulates the Nrf2/GCLC pathway to enhance ferroptosis in the treatment of oral squamous cell carcinoma. Eur J Pharmacol 2025:177935. DOI: 10.1016/j.ejphar.2025.177935
154. Zhang J., Xu H.-X., Zhu J.-Q. et al. Natural Nrf2 inhibitors: a review of their potential for cancer treatment. Int J Biol Sci 2023;19(10):3029. DOI: 10.7150/ijbs.82401
155. Wang H.F., Zhao Z.L. Triptolide inhibits proliferation and invasion of colorectal cancer cells by blocking Nrf2 expression. Chem Biol Drug Des 2024;103(1):e14410. DOI: 10.1111/cbdd.14410
156. Nam L.B., Choi W.J., Keum Y.-S. Triptolide downregulates the expression of NRF2 target genes by increasing cytoplasmic localization of NRF2 in A549 cells. Front Pharmacol 2021;12:680167. DOI: 10.3389/fphar.2021.680167
157. Yang J., Tang X., Ke X. et al. Triptolide suppresses NF-κB-mediated inflammatory responses and activates expression of Nrf2-mediated antioxidant genes to alleviate caerulein-induced acute pancreatitis. Int J Mol Sci 2022;23(3):1252. DOI: 10.3390/ijms23031252
158. Singh A., Venkannagari S., Oh K.H. et al. Small molecule inhibitor of NRF2 selectively intervenes therapeutic resistance in KEAP1-deficient NSCLC tumors. ACS Chem Biol 2016;11(11):3214–25. DOI: 10.1021/acschembio.6b00651
159. Jeong E.-J., Choi J.J., Lee S.Y. et al. The effects of ML385 on head and neck squamous cell carcinoma: implications for NRF2 inhibition as a therapeutic strategy. Int J Mol Sci 2024;25(13):7011. DOI: 10.3390/ijms25137011
160. Yang H., Zheng W., Lin H. et al. ML385 Suppresses hypoxia-induced drug resistance and cancer stemness of breast cancer cells by blocking the Nrf2/HO-1 pathway. Pharm Chem J 2025:1–8. DOI: 10.1007/s11094-025-03301-7
161. Schenk T., Stengel S., Zelent A. Unlocking the potential of retinoic acid in anticancer therapy. Br J Cancer 2014;111(11):2039–45. DOI: 10.1038/bjc.2014.412
162. Lu C.S., Shieh G.S., Wang C.T. et al. Chemotherapeutics-induced Oct4 expression contributes to drug resistance and tumor recurrence in bladder cancer. Oncotarget 2017;8(19):30844–58. DOI: 10.18632/oncotarget.9602
163. Jung J., Kim Y., Song J. et al. KRIBB53 binds to OCT4 and enhances its degradation through the proteasome, causing apoptotic cell death of OCT4-positive testicular germ cell tumors. Carcinogenesis 2018;39(6):838–49. DOI: 10.1093/carcin/bgy054
164. Cheng J., Li W., Kang B. et al. Tryptophan derivatives regulate the transcription of Oct4 in stem-like cancer cells. Nat Commun 2015;6(1):7209. DOI: 10.1038/ncomms8209
165. Zhang S., Xiong X., Sun Y. Functional characterization of SOX2 as an anticancer target. Signal Transduct Target Ther 2020;5(1):135. DOI: 10.1038/s41392-020-00242-3
166. Stolzenburg S., Rots M.G., Beltran A.S. et al. Targeted silencing of the oncogenic transcription factor SOX2 in breast cancer. Nucleic Acids Res 2012;40(14):6725–40. DOI: 10.1093/nar/gks360
167. Liu K., Xie F., Zhao T. et al. Targeting SOX2 protein with peptide aptamers for therapeutic gains against esophageal squamous cell carcinoma. Mol Ther 2020;28(3):901–13. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.01.012
168. Taniguchi J., Pandian G.N., Hidaka T. et al. A synthetic DNA-binding inhibitor of SOX2 guides human induced pluripotent stem cells to differentiate into mesoderm. Nucleic Acids Res 2017;45(16):9219–28. DOI: 10.1093/nar/gkx693
169. Liao W.-Y., Liaw C.-C., Huang Y.-C. et al. Cyclohexylmethyl flavonoids suppress propagation of breast cancer stem cells via downregulation of NANOG. Evid Based Complement Alternat Med 2013;2013(1):170261. DOI: 10.1155/2013/170261
170. Kallas A., Pook M., Maimets M. et al. Nocodazole treatment decreases expression of pluripotency markers Nanog and Oct4 in human embryonic stem cells. PLoS One 2011;6(4):e19114. DOI: 10.1371/journal.pone.0019114

Вклад авторов
О.Е. Андреева: обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи, редактирование;
Е.И. Михаевич: написание текста статьи;
М.А. Красильников: обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи, редактирование.
Authors' contributions
O.E. Andreeva: review of the literature on the topic of the article, article writing, editing;
E.I. Mikhaevich: article writing;
M.A. Krasil'nikov: review of the literature on the topic of the article, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors
О.Е. Андреева / O.E. Andreeva: https://orcid.org/0000-0002-6015-6619
Е.И. Михаевич / E.I. Mikhaevich: https://orcid.org/0000-0002-1299-9080
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 № 24-25-00462).
Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 24-25-00462).

Статья поступила: 30.10.2025. **Принята к публикации:** 10.11.2025. **Опубликована онлайн:** 10.12.2025.
Article submitted: 30.10.2025. **Accepted for publication:** 10.11.2025. **Published online:** 10.12.2025.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-24-37

Противоопухолевые механизмы действия ацетилсалициловой кислоты: обзор современных данных

О.А. Кузнецова[1, 2], М.Ш. Манукян[1], А.А. Лебедева[2], А.А. Трякин[1], М.Ю. Федянин[1], М.М. Братухина[1], С.А. Тюляндин[1]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;
[2]ООО «ОнкоАтлас»; Россия, 119049 Москва, Ленинский пр-кт, 4, стр. 1А

Контакты: Мария Михайловна Братухина *maria.m.bratukhina@gmail.com*

Ацетилсалициловая кислота, более известная как аспирин, на протяжении десятилетий используется в клинической практике как анальгетик, жаропонижающее и противовоспалительное средство. В последние годы все большее внимание уделяется ее потенциалу в профилактике и терапии онкологических заболеваний.
В статье обобщены современные данные о молекулярных и клеточных механизмах, лежащих в основе противоопухолевого действия аспирина. Главными мишенями ацетилсалициловой кислоты являются циклооксигеназа-1 и циклооксигеназа-2, ингибирование которых приводит к снижению продукции простагландинов и модуляции воспалительного ответа. Кроме того, аспирин влияет на процессы апоптоза, пролиферации, ангиогенеза и метастазирования опухолевых клеток. В статье рассмотрены также независимые от циклооксигеназ механизмы, включая активацию AMP-зависимой протеинкиназы (AMPK), ингибирование транскрипционного ядерного фактора κB (NF-κB) и пути RhoA/ROCK, представлены результаты клинических исследований, посвященных оценке эффективности аспирина в отношении различных типов злокачественных новообразований, включая колоректальный рак, рак молочной и предстательной желез. В обзоре акцентируется внимание на необходимости проведения дальнейших исследований, направленных на идентификацию предиктивных биомаркеров и стратификацию пациентов, у которых может наблюдаться наибольший ответ на терапию с учетом молекулярно-генетического профиля опухоли (например, при гиперэкспрессии циклооксигеназы-2 или наличии альтераций сигнального пути PI3K/AKT).

Ключевые слова: ацетилсалициловая кислота, аспирин, противоопухолевый эффект, циклооксигеназа, противовоспалительная терапия, онкологическое заболевание, транскрипционный ядерный фактор κB, β-катенин, ген *PIK3CA*

Для цитирования: Кузнецова О.А., Манукян М.Ш., Лебедева А.А. и др. Противоопухолевые механизмы действия ацетилсалициловой кислоты: обзор современных данных. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(4):24–37.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-24-37

Antitumor mechanisms of acetylsalicylic acid: a review of current evidence

O.A. Kuznetsova[1, 2], M.S. Manukyan[1], A.A. Lebedeva[2], A.A. Tryakin[1], M.Yu. Fedyanin[1], M.M. Bratukhina[1], S.A. Tjulandin[1]

[1]N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;
[2]LLC "OncoAtlas"; Bld. 1A, 4 Leninsky Prospekt, 119049 Moscow, Russia

Contacts: Maria Mikhailovna Bratukhina *maria.m.bratukhina@gmail.com*

Acetylsalicylic acid, more commonly known as aspirin, has been used in clinical practice for decades as analgesic, antipyretic and anti-inflammatory drug. In recent years, its potential in prevention and therapy of oncological diseases has become a new topic of research.
The article summarizes modern data on molecular and cellular mechanisms underlying antitumor action of aspirin. The main targets of acetylsalicylic acid are cyclooxigenase-1 and cyclooxigenase-2, inhibition of which leads to a decrease in prostaglandin production and modulation of inflammatory response. Additionally, aspirin affects apoptosis, proliferation, angiogenesis, and metastasis of tumor cells. Cyclooxigenases-independent mechanisms are also considered including activation of AMP-dependent protein kinase (AMPK), inhibition of nuclear transcription factor κB (NF-κB) and RhoA/ROCK pathway; results of clinical trials investigating efficacy of aspirin in various malignant neoplasms

including colorectal, breast and prostate cancers are presented. The review focuses on the necessity of further studies aimed at identification of predictive biomarkers and stratification of patients who can have the strongest response to therapy taking into account molecular and genetic profile of the tumors (for example, hyperexpression of cyclooxygenase-2 or alterations in the PI3K/AKT signaling pathway).

Keywords: acetylsalicylic acid, aspirin, antitumor effect, cyclooxigenase, anti-inflammatory therapy, oncological disease, nuclear transcription factor κB, β-catenin, *PIK3CA* gene

For citation: Kuznetsova O.A., Manukyan M.S., Lebedeva A.A. et al. Antitumor mechanisms of acetylsalicylic acid: a review of current evidence. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(4):24–37. (In Russ.). DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-24-37

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), включая аспирин, привлекают внимание онкологов не только как средство симптоматической терапии, но и как потенциальные агенты для профилактики и лечения злокачественных новообразований (ЗНО). Первые данные об ингибировании опухолевого роста НПВП появились в 80-х годах прошлого века в исследованиях, посвященных анализу активности индометацина и пироксикама в лечении опухолей кишки у грызунов [1–3]. Спустя десятилетие внимание исследователей сосредоточилось на изучении влияния НПВП (прежде всего аспирина) на риск развития и исход онкологических заболеваний у людей. Так, результаты ряда обсервационных работ с использованием различных методологий и популяций продемонстрировали протективный эффект данных препаратов (в первую очередь аспирина) в отношении заболеваемости ЗНО и смертности от них, в частности при колоректальном раке (КРР) [4, 5]. Однако данные, полученные в ходе последующих клинических испытаний, оказались противоречивыми, что поставило под сомнение однозначную пользу НПВП в онкологии [6].

В настоящий момент данные о влиянии аспирина на риск развития ЗНО и рецидива/прогрессирования уже существующего заболевания обобщены в ряде метаанализов и систематических обзоров [7, 8]. В ходе метаанализа P. Elwood и соавт., в который вошли 118 работ, установлено, что прием аспирина позволяет снизить смертность от ЗНО на 20 % (отношение рисков (ОР) 0,79; 95 % доверительный интервал (ДИ) 0,73–0,84) у пациентов с различными онкологическими заболеваниями [9]. При этом уровень смертности от кровотечений был крайне низким. С учетом актуальных данных о роли аспирина в профилактике возникновения рака (в частности, у носителей синдрома Линча по результатам исследования CAPP-3 [10]), рассматривается возможность расширения клинического применения этого препарата в качестве превентивной терапии у лиц без ЗНО.

Однако, несмотря на наличие крупных исследований, результаты которых демонстрируют преимущества добавления в состав вспомогательной терапии аспирина, в рутинную практику лечения и вторичной профилактики ЗНО данный препарат так и не был введен, что связано как с высоким риском развития побочных явлений, так и с особенностями доказательной базы. Преимущество в показателях снижения смертности от приема аспирина продемонстрировано в обсервационных исследованиях, однако в ходе большинства рандомизированных исследований это не было выявлено. Так, в исследовании III фазы ASCOLT 1550 пациентов с местно-распространенным КРР после проведения хирургического вмешательства и адъювантной химиотерапии были рандомизированы в группы аспирина в дозе 200 мг/сут и плацебо в течение 3 лет после операции. Пятилетняя выживаемость без прогрессирования (ВБП) оказалась равной 77 % и 74,8 % соответственно (ОР 0,91; 95 % ДИ 0,73–1,13; $p = 0{,}38$). Несмотря на удовлетворительную переносимость аспирина (частота развития нежелательных явлений составила 49 % в группе аспирина и 51 % в группе плацебо), его прием не позволил снизить вероятность прогрессии процесса [11]. В исследовании A011502 адъювантное назначение этого препарата (в дозе 300 мг/сут) при HER2-негативном (HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа) раке молочной железы (РМЖ) было ассоциировано со статистически незначимым повышением риска смерти (общая выживаемость (ОВ): ОР 1,19; 95 % ДИ 0,82–1,72), несмотря на сопоставимые с группой плацебо данные токсичности, в связи с чем оно было завершено досрочно [12]. В ходе анализа 11 рандомизированных работ, посвященных изучению действия аспирина (средняя длительность приема препарата – 2,8 года), относительный риск возникновения фатальных кровотечений составил 0,77 по отношению к плацебо (4 % в группе аспирина и 8 % в группе плацебо). Таким образом, доступные в настоящий момент данные свидетельствуют о том, что, вероятнее всего, аспирин действительно влияет на риск прогрессирования онкологического процесса. Однако неясно, какие пациенты имеют наибольшую пользу от назначения этого препарата в качестве вспомогательной терапии.

В январе 2025 г. на конгрессе Американского общества клинической онкологии (American Society of Clinical Oncology, ASCO), посвященном опухолям желудочно-кишечного тракта, продемонстрированы 3-летние результаты рандомизированного исследования ALASCCA по оценке роли аспирина в снижении риска прогрессирования КРР при наличии соматических альтераций в сигнальном пути PI3K после радикального лечения [13]. Авторам удалось продемонстрировать положительное влияние этого препарата на безрецидивную выживаемость, что открывает вопрос о механизме его действия и необходимости отбора пациентов для его назначения, исходя из молекулярных особенностей опухоли.

Цель работы – описать вероятный механизм взаимосвязи опухолевого процесса, аспирина и других ингибиторов циклооксигеназы (ЦОГ).

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ АСПИРИНА

Аспирин (ацетилсалициловая кислота) – необратимый ингибитор циклооксигеназы-1 (ЦОГ-1), который реализует свои свойства путем подавления синтеза простагландинов группы E (PGE) и тромбоксанов (рис. 1) [14].

Циклооксигеназа-1 – это фермент, способствующий трансформации арахидоновой кислоты в PGE G_2/H_2, которые впоследствии при воздействии тромбоксансинтазы и простациклинсинтаз трансформируются в тромбоксан A2 (TxA2) и простагландины (PGF2α, PGDα, PGI2, PGE2). Кроме того, гликопротеин ЦОГ имеет 3 изоформы (ЦОГ-1, -2 и -3). ЦОГ-1 – это конститутивная форма фермента, которая экспрессируется в различных типах тканей и превалирует в клетках эндотелия и тромбоцитах. ЦОГ-2 – индуцированная форма, которая экспрессируется в ответ на воспалительные стимулы, участвуя в выработке PGE, поддерживающих воспалительный процесс. В высоких дозах аспирин также способен ингибировать ЦОГ-2. ЦОГ-3 – это альтернативная изоформа фермента ЦОГ-1, не обладающая значимой циклооксигеназной активностью [15]. Широкое применение данного препарата обусловлено в первую очередь снижением риска кардиоваскулярных событий в связи с препятствием агрегации тромбоцитов. Это реализуется путем ингибирования синтеза TxA2, причем данный механизм является уникальным, не свойственным другим антиагрегантным агентам. Ингибирование же выработки PGE вызывает анальгезирующий и антипиретический эффекты а также является предпосылкой к острому повреждению желудка.

Помимо аспирина к ЦОГ-ингибиторам относится ряд препаратов (табл. 1). Селективные ЦОГ-1-ингибиторы представлены аспирином, кеторолаком, индометацином и пироксикамом. Пример неселективных ингибиторов – ибупрофен. Разработка селективных ЦОГ-2-антагонистов связана с выраженностью побочных эффектов ингибирования ЦОГ-1 (желудочно-кишечные язвы, кровотечения). В эту группу входят целекоксиб, диклофенак, мелоксикам и наиболее тропные к ЦОГ-2 – эторикоксиб и лумиракоксиб.

Открытым остается вопрос о противоопухолевой активности ЦОГ-ингибиторов. Есть несколько теорий относительно взаимосвязи препаратов и опухолевого

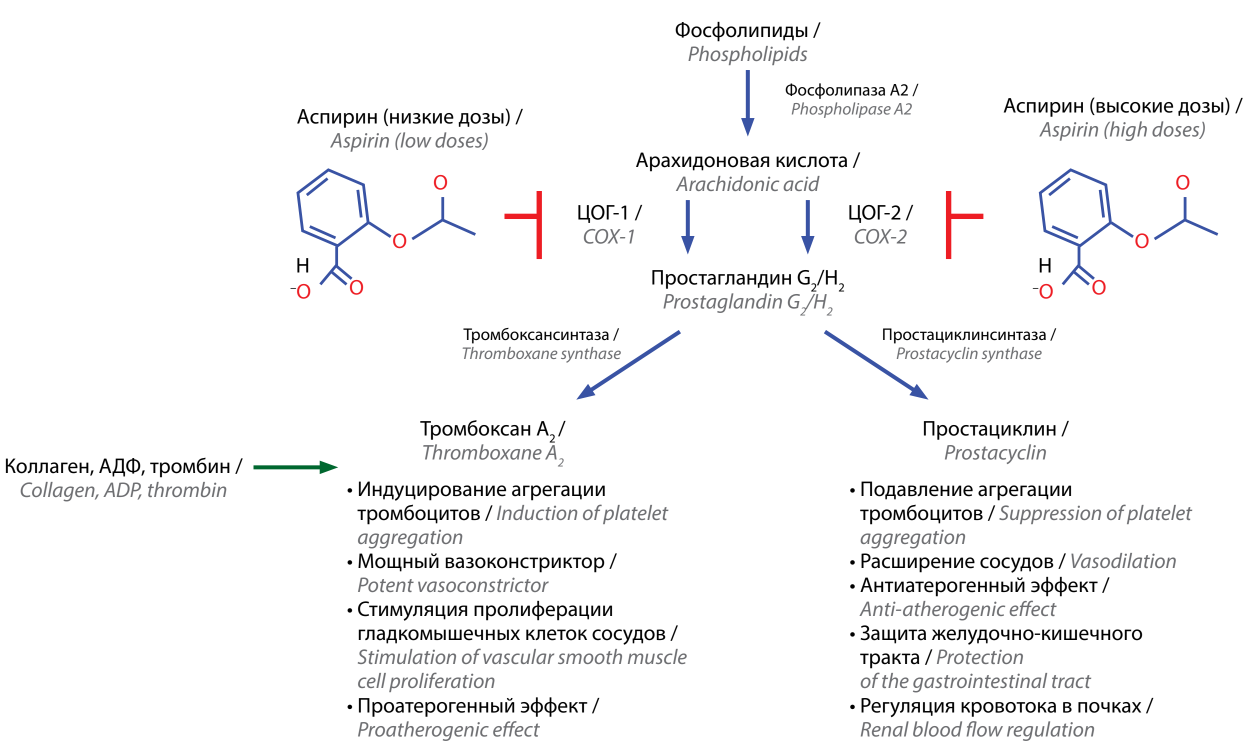


Рис. 1. *Механизмы действия аспирина. ЦОГ-1 – циклооксигеназа-1; ЦОГ-2 – циклооксигеназа-2; АДФ – аденозиндифосфат*

Fig. 1. *Mechanisms of action of aspirin. COX-1 – cyclooxygenase-1; COX-2 – cyclooxygenase-2; ADP – adenosine diphosphate*

Таблица 1. *Классификация ингибиторов циклооксигеназы (ЦОГ)*
Table 1. *Classification of cyclooxygenase (COX) inhibitors*

Более селективные к ЦОГ-1 More COX-1 selective	Неселективные Nonselective	5–50-кратная селективность к ЦОГ-2* 5–50-fold COX-2 selective*	>50-кратная селективность к ЦОГ-2а** >50-fold COX-2 selective**
Кеторолак (акулар), флубипрофен (окуфен), кетопрофен (дженерик), индометацин (индоцин), аспирин (дженерик), напроксен, толметин, пироксикам, меклофенамат Ketorolac (acular), flubiprofen (ocufen), ketoprofen (generic), indomethacin (indocin), aspirin (generic), naproxen, tolmetin, piroxicam, meclofenamate	Ибупрофен (адвил), фенопрофен*** (налфон), салицилат натрия, дифлунизал Ibuprofen (advil), fenoprofen*** (nalfon), sodium salicylate, diflunisal	Сулиндак (клинорил), диклофенак, целекоксиб, мелоксикам, этодолак Sulindac (clinoril), diclofenac, celecoxib, meloxicam, etodolac	Эторикоксиб (аркоксия), лумиракоксиб Etoricoxib (arcoxia), lumiracoxib
Увеличение влияния на желудочно-кишечный тракт Increased gastrointestinal effects			Увеличение влияния на сердечно-сосудистую систему Increased cardiovascular effects

**Упорядочены по мере увеличения селективности к циклооксигеназе-2 (ЦОГ-2). **Одинаковая сила действия на циклооксигеназу-1 (ЦОГ-1) и ЦОГ-2. ***При более высоких дозах селективность к ЦОГ-2 уменьшается и увеличивается ингибирование ЦОГ-1.*
**Listed in order of increasing cyclooxygenase-2 (COX-2) selectivity. **Equipotent for cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 selectivity. ***At higher doses, COX-2 selectivity decreases and COX-1 inhibition increases.*

процесса. Наиболее изучено иммуномодулирующее действие аспирина посредством снижения активности TxA2, а также его влияние на опухолевые клетки путем изменения микроокружения.

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ АСПИРИНА

Ингибирование эффектов PGE2. Клинические и эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что хроническое воспаление является фактором риска развития опухолей желудочно-кишечного тракта. Так, пациенты с персистирующим вирусом гепатита B, *Helicobacter pylori*, а также аутоиммунными заболеваниями (воспалительные заболевания кишечника) имеют высокий риск развития гепатоцеллюлярной карциномы, рака желудка и КРР соответственно. Существует предположение, что хроническое воспаление способствует инициации, росту и прогрессии опухоли. Гиперэкспрессию ЦОГ-2 выявляют в 50 % аденом толстой кишки, а также в 85 % колоректальных карцином [15, 16]. Также продемонстрирована отрицательная ассоциация гиперэкспрессии PGE2 и ЦОГ-2 с выживаемостью пациентов с КРР и раком пищевода, однако неочевидно, могут ли эти находки быть связаны с другими совместно действующими факторами [16, 17].

Причиной этого может быть участие PGE2 в активации нескольких внутриклеточных путей. Так, PGE2 потенцирует рост и пролиферацию клеток колоректальной карциномы через WNT-путь. В обычном состоянии, когда путь неактивен, белки Axin, APC и GSK3β помечают β-катенин для уничтожения, не давая клеткам бесконтрольно делиться. Однако при активации сигнального пути WNT функция этих белков ослабевает, β-катенин накапливается, проникает в ядро и активирует гены, отвечающие за пролиферацию. PGE2 взаимодействует с WNT-сигналингом несколькими способами: стимулируя соответствующий ему рецептор EP2 (связь с белком Axin с его инактивацией), повышая уровень β-катенина через циклический аденозинмонофосфат, усиливая транскрипцию гена *PPAR*δ, который способствует устойчивости к апоптозу и является мишенью сигнального пути WNT. Так формируется порочный круг: чем больше PGE2, тем активнее растут клетки, а чем больше β-катенина, тем выше уровень PGE2. Биологическим обоснованием для применения аспирина являются снижение уровня PGE2 и восстановление нормальной функции WNT-пути [16–18].

Еще одним механизмом, опосредующим благоприятное влияние данного препарата на клинические исходы, может служить его антиангиогенный эффект.

Экспериментальные данные свидетельствуют, что PGE2 обладает выраженной ангиогенной активностью. В частности, в исследовании M. Majima и соавт., в котором использовалась модель гранулематозного воспаления у грызунов, установлено, что ЦОГ-2 потенцирует неоваскуляризацию посредством стимуляции синтеза фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) через PGE-зависимые механизмы [19].

Ингибирование сигнального пути RhoA/ROCK в Т-лимфоцитах. Уникальным антиагрегантным механизмом действия аспирина является снижение уровня TxA2 (путем ингибирования тромбоксансинтазы), который в первую очередь отвечает за вазоконстрикцию и активацию тромбоцитов. Однако, помимо этого, установлена иммуномодулирующая роль молекулы TxA2, а именно способность подавлять Т-клеточный ответ. Эти свойства связаны со специфическим клеточным сигнальным путем обмена гуанина RhoA/ROCK (рис. 2). Наиболее полное описание данного сигнального пути и влияния на него аспирина представлено в работе J. Yang и соавт. [20]. На поверхности большинства клеток организма экспрессируются рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), к которым относится и рецептор TxA2. При взаимодействии этого рецептора с его лигандом в клетках активируется комплекс белков Ga12/Ga13, которые соединяются с белками – факторами обмена гуаниновых нуклеотидов (RhoGEF), например ARHGEF1. Основное назначение белка ARHGEF1 – перевести киназу RhoA из «выключенного» состояния, связанного с гуанидиндифосфатом (RhoA: GDP), во «включенное», ассоциированное с гуанидинтрифосфатом (RhoA: GTP). В активном состоянии киназа передает сигнал эффекторным молекулам ROCK (ROCK-1, ROCK-2). Выключение сигналинга происходит с помощью противодействующих белков (GAP), которые гидролизируют GTP до GDP, переводя активный комплекс RHOA: GTP в неактивный RHOA: GDP [21].

Сигнальный путь RhoA/ROCK контролирует миграцию клеток и их пролиферацию. Он оказался клинически значимым, так как результаты ряда работ продемонстрировали иммуносупрессирующую роль

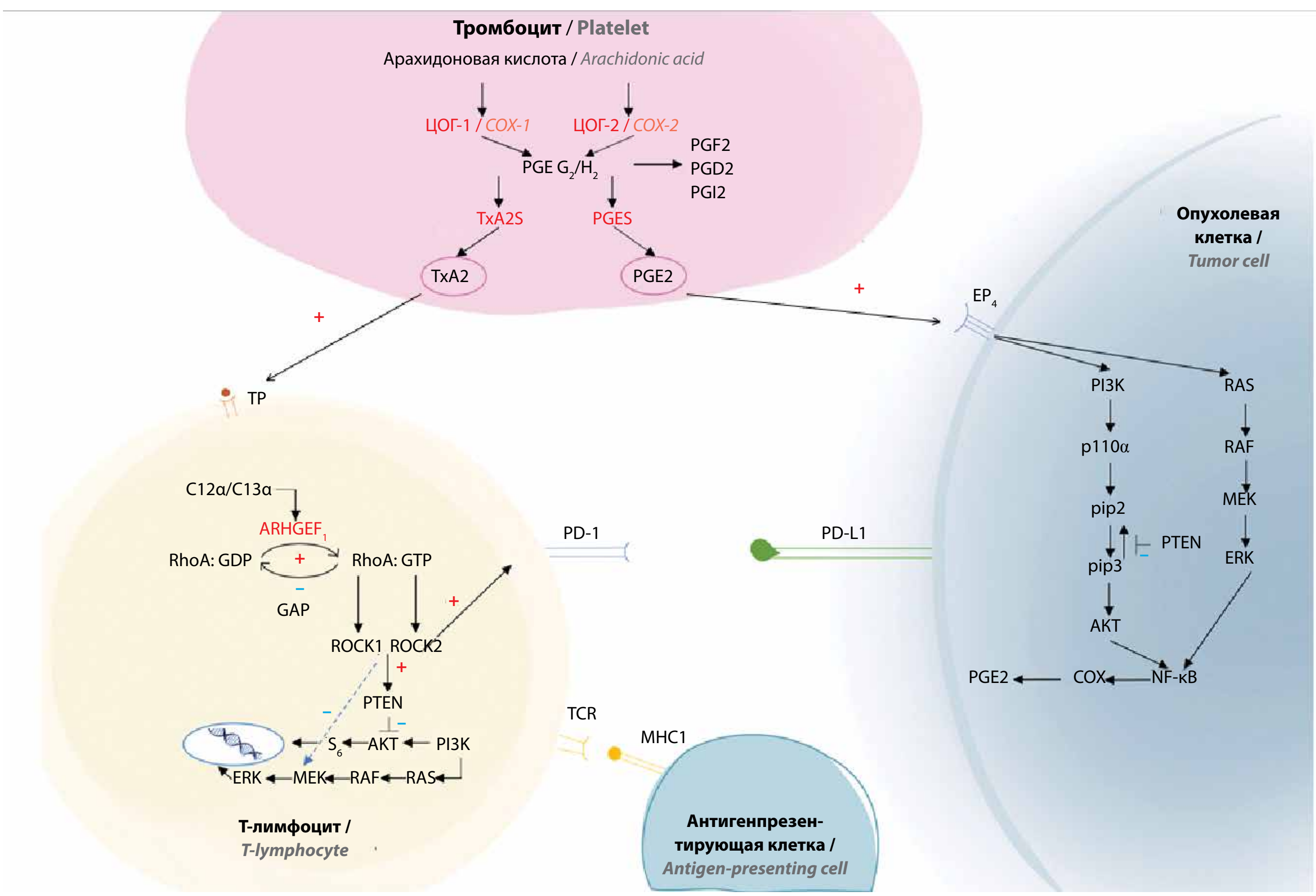


Рис. 2. *Взаимосвязь ингибирования циклооксигеназы (ЦОГ) и противоопухолевого ответа. PGE – простагландины группы E; ЦОГ-1 – циклооксигеназа-1; ЦОГ-2 – циклооксигеназа-2; PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели 1; PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; MHC1 – главный комплекс гистосовместимости 1; NF-κB – транскрипционный ядерный фактор κB*

Fig. 2. *The relationship between cyclooxygenase (COX) inhibition and the antitumor response. PGE – prostaglandins of group E; COX-1 – cyclooxygenase-1; COX-2 – cyclooxygenase-2; PD-1 – programmed cell death 1; PD-L1 – programmed death-ligand 1; PI3K – phosphoinositide-3-kinase; MHC1 – main histocompatibility complex 1; NF-κB –transcription nuclear factor κB*

его отдельных элементов [22]. Изначально исследования были посвящены определению возможности ингибирования сигнального каскада при аутоиммунных заболеваниях [23].

С учетом того что Т-клетки являются основными эффекторами противоопухолевого ответа, стала интересна роль сигнального пути RhoA/ROCK в канцерогенезе. Помимо того что RhoA/ROCK является важным фактором миграции Т-лимфоцитов, активность этого пути влияет на формирование иммунного синапса с антигенпрезентирующими клетками (АПК): чем выше активность сигнального пути, тем меньше активность Т-лимфоцитов, и для их активации требуется больше стимуляции от АПК [23]. Помимо этого, экспериментальным путем установлено, что активация сигнального пути RhoA/ROCK связана с истощением Т-лимфоцитов – снижением их цитокиновой полифункциональности и противоопухолевой активности. С помощью проточной цитометрии проанализированы количество и функция Т-клеток у мышей с метастатическим поражением легких, вызванным внутривенным введением клеток меланомы линии B16-F10 (B78ChOva-mCherry) [20]. Однако предварительно исследователи вывели популяцию мышей с возможностью «выключения» функции гена *Arhgef1* в Т-лимфоцитах (мыши Arhgef1-cKO). Установлено, что у мышей группы Arhgef1-cKO (с «выключенным» геном) с метастазами в легких количество $CD4^+$- и $CD8^+$-клеток было таким же, что и в группе с «включенным» геном, но в Т-лимфоцитах наблюдалась меньшая экспрессия маркеров истощения (рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1), TOX), эти клетки замедляли рост метастазов и вырабатывали по 2–3 цитокина одновременно. Кроме того, белки ROCK блокируют сигнальные пути, идущие от TCR-рецептора (взаимодействует с главным комплексом гистосовместимости I класса опухолевой клетки). Таким образом, в ходе исследований на мышиной модели подтверждена роль активации сигнального пути RhoA/ROCK (в первую очередь за счет перевода RHOA: GDP в RHOA: GTP ферментом ARHGEF1) в снижении противоопухолевого ответа за счет гиперэкспрессии на поверхности клеток рецепторов истощения (PD-1) и уменьшения активности иммунных клеток. Следует отметить, что именно подавление экспрессии ARHGEF1 в Т-клетках связано со снижением метастатического потенциала опухолевых клеток, тогда как его специфическая инактивация в макрофагах или NK-клетках (естественных киллерах) такого эффекта не оказывает.

Кроме того, продемонстрировано, что лиганд TxA2 подавляет функцию лишь Т-клеток (истощение, но не гибель) и не вызывает супрессию АПК и других клеток.

Согласно описанной выше модели, предполагается, что аспирин снижает уровень TxA2 и минимизирует истощение Т-лимфоцитов, что обеспечивает иммунный ответ в отношении опухолевых клеток. С учетом того что уровень TxA2 является ЦОГ-1-зависимым, измерение его уровня обычно используют для экстраполяции активности аспирина. Например, полный ответ на данный препарат характеризуется полным ингибированием тромбоксана (>99 %) и снижением абсолютного уровня его циркуляции (<3,1 нг/мл). Еще одним методом измерения фармакодинамических эффектов является оценка активности тромбоцитов методом импедансной агрегометрии.

Следует отметить, что иммуносупрессирующее действие TxA2 реализуется тогда, когда в сигнальном пути RhoA/ROCK нет «поломок». Таким образом, целесообразность снятия с Т-клетки иммуносупрессирующего воздействия посредством аспирина нужна тем пациентам, у которых не наблюдается альтераций в ключевых элементах каскадного цикла – присутствует экспрессия рецепторов TxA2, а также переводящая в активное состояние RhoA молекула ARHGEF1. В связи с вышесказанным требуется более подробное изучение необходимости определения биомаркеров эффективности аспирина в преодолении иммуносупрессирующего воздействия Т-лимфоцитов.

Этот механизм действия аспирина можно коротко описать следующим образом:

- TxA2 тромбоцитов активирует путь RhoA/ROCK через ARGEF1, который подавляет Т-клеточный иммунный ответ, препятствующий развитию метастазов;
- аспирин снижает сигналинг TxA2, предотвращает подавление Т-клеток, снижая риск развития метастазов;
- реализация действия аспирина в таком случае возможна при отсутствии альтерации в пути RhoA/ROCK.

Ингибирование транскрипционного ядерного фактора κB, DNMT1 и активация AMPK. Один из механизмов действия аспирина связан с транскрипционным ядерным фактором κB (NF-κB). В нестимулированных клетках димеры NF-κB в цитоплазме связаны с ингибирующими NF-κB белками, называемыми I-κ-B. После активации NF-κB отделяется от I-κ-B и мигрирует в ядро, запуская транскрипцию генов, отвечающих за синтез интерлейкинов 1B, 6, фактора некроза опухолей, BCLC2, BCL2L1 и т. д. Такие вирусы, как вирус иммунодефицита человека, герпеса и гепатита С, выработали стратегии позитивной регуляции сигналов NF-κB, блокируя апоптоз и продлевая жизнь клетки-хозяина для собственной репликации. Кроме того, некоторые онкогенные вирусы способны запускать программу конститутивной экспрессии антиапоптотических факторов, зависящих от NF-κB, что приводит к трансформации клеток и неконтролируемой пролиферации [24]. Противовоспалительные препараты, такие как аспирин, ингибируют активацию NF-κB, что дополнительно объясняет механизм действия средств, в том числе и противоопухолевого. Однако препараты, воздействующие на данный транскрипционный фактор, в клинических исследованиях показали низкую эффективность при солидных опухолях [25].

Аспирин индуцирует активацию 5’АМФ-активируемой протеинкиназы (AMPK) – ключевого регулятора клеточного энергетического метаболизма. Этот процесс приводит к подавлению мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) – регулятора клеточного роста и пролиферации. Ингибирование сигнального пути mTOR в свою очередь вызывает снижение пролиферативной активности клеток за счет угнетения синтеза белка и клеточного цикла, активацию аутофагии и индукцию апоптоза через усиление проапоптотических сигналов. Таким образом, AMPK/mTOR-зависимые механизмы вносят вклад в противоопухолевые и цитопротективные эффекты аспирина [26, 27]. Возможно, это также один из механизмов, объясняющих эффективность данного препарата при КРР при альтерациях PI3K/PTEN в исследовании ALASCCA. Однако применение прямых ингибиторов PI3K или mTOR при опухолях желудочно-кишечного тракта, даже при мутациях генов этого сигнального пути, оказалось неэффективным.

Также известно, что салицилат прямо взаимодействует с каталитическим доменом ДНК-метилтрансферазы 1 (DNMT1) – фермента, ответственного за поддержание паттернов метилирования ДНК в процессе репликации. Это взаимодействие приводит к конкурентному ингибированию ферментативной активности DNMT1, что нарушает процесс копирования метильных групп на вновь синтезированную ДНК. В условиях DNMT1-ингибирования происходит снижение гиперметилирования промоторных областей генов-супрессоров опухолей, таких как *p16INK4a*, *APC* и *hMLH1*. Это особенно значимо при опухолях с микросателлитной нестабильностью (MSI), в которых эпигенетическое подавление экспрессии этих генов зачастую обусловлено избыточной метилтрансферазной активностью. Реактивация генов-супрессоров опухолей восстанавливает контроль над клеточным циклом, апоптозом и репарацией ДНК, подавляя опухолевую прогрессию [28].

МОДИФИКАЦИЯ МИКРОБИОМА

Одной из бактерий, рассматриваемой в качестве потенциального канцерогена, является оральный анаэроб *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), обитающий в полости рта человека и связанный с развитием пародонтита. В 2012 г. результаты двух прикладных исследований продемонстрировали повышенное количество генетического материала фузобактерий (в том числе *F. nucleatum*) в тканях КРР по сравнению с нормальными тканями [29, 30], что было примечательно в связи с редкой встречаемостью этих бактерий в кишечнике. При сравнении образцов карциномы толстой кишки и слюны пациентов совпадение паттернов наблюдалось в 75 % случаев, что позволяет предположить происхождение микроорганизма из полости рта. После этого были продемонстрированы пути транслокации бактерий: оральные фузобактерии могли достигать опухолей толстой кишки как через пищеварительный тракт, так и гематогенно (например, при десневом кровотечении), причем второй путь способствовал более эффективной колонизации [31, 32]. Еще одним подтверждением гипотезы гематогенной транслокации стали результаты исследований микробиома РМЖ: так, наличие ДНК *F. nucleatum* в опухолях коррелирует с высоким уровнем Gal-GalNAc – маркера, связанного с прогрессией опухоли [33, 34]. Помимо этого, важными в контексте клинической онкологии являются данные, свидетельствующие о роли *F. nucleatum* в стимулировании пролиферации опухолевых клеток, модуляции иммунного микроокружения и развитии химиорезистентности при КРР [35].

На клеточных культурах, а впоследствии и на мышиных моделях продемонстрировано антибактериальное действие аспирина и его первичного метаболита – салициловой кислоты – на штамм *F. nucleatum*, выделенный из тканей КРР [36]. На клеточной культуре высокие концентрации аспирина (5–10 мМ) вызывали гибель бактерий даже в стационарной фазе. Субингибиторные дозы этого препарата изменяли экспрессию генов *F. nucleatum*, снижая уровень факторов вирулентности и ослабляя его патогенность. В ходе исследований мышиной модели ежедневное введение этих анаэробных бактерий мышам с мутацией *Apc* увеличивало количество опухолей в толстой кишке. Добавление же аспирина в корм животных при совместном введении *F. nucleatum* полностью предотвращало этот эффект, что свидетельствует о его способности блокировать проопухолевое действие бактерий. Кроме того, продемонстрирована протективная роль аспирина и у людей: у пациентов, принимавших данный препарат ежедневно, уровень *Fusobacterium* в тканях аденом был в 2,3 раза ниже, чем у тех, кто его не принимал. Это подтверждает, что наблюдаемые *in vitro* и в моделях на животных эффекты могут быть релевантны для человека. Однако, несмотря на полученные данные, актуальными остаются вопросы об оптимальных дозе и режиме приема аспирина, а также изучение его влияния на другие бактерии при КРР и разработка биомаркеров (например, статус *F. nucleatum*) для назначения терапии.

ПОТЕНЦИРОВАНИЕ ЭФФЕКТА ИНГИБИТОРОВ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ИММУННОГО ОТВЕТА ИНГИБИТОРАМИ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ

Помимо внутренних сигнальных путей, активирующих рост и пролиферацию клетки, прогрессия онкологического процесса была бы невозможной без влияния микроокружения опухоли (tumor microenvironment, TME). Известно, что TME влияет на эффективность ингибиторов контрольных точек

(ИКТ) иммунного ответа. Злокачественные клетки могут избегать иммунного надзора путем истощения $CD8^+$-Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и цитотоксический белок, ассоциированный с Т-лимфоцитами (CTLA-4). Истощение $CD8^+$-Т-лимфоцитов связано с каскадом ЦОГ-2/PGE2. Так, с помощью технологии CRISP-Cas9 S. Zelenay и соавт. устраняли способность нескольких типов линий раковых клеток вырабатывать PGE2. Авторы продемонстрировали влияние PGE2 на хроническое воспаление и способность опухолевых клеток уклоняться от воздействия интерферона 1-го типа и Т-клеточной цитотоксичности [37, 38]. Помимо этого, A. Park и соавт. продемонстрировали, что PGE2 подавляет созревание NK-клеток, а J.P. Böttcher и соавт. выявили снижение продукции хемокинов, привлекающих дендритные клетки для представления опухолевого антигена и запуска дальнейших процессов противоопухолевого иммунного ответа [39, 40]. Очевидно, иммуносупрессия TME PGE2 может быть препятствием для реализации эффекта ИКТ. С целью иммуномодуляции зарубежные авторы провели исследования комбинации ИКТ и ингибиторов ЦОГ.

Возможности преодоления иммунорезистентности при местно-распространенном КРР анализировались в исследовании NICHE. Пациентам независимо от MSI-статуса проводили неоадъювантную терапию – двойную блокаду контрольных точек иммунного ответа (ниволумаб + ипилимумаб) с последующим хирургическим вмешательством. В группе микросателлитностабильных опухолей (proficient mismatch repair/microsatellite stable, pMMR/MSS) 7 из 14 пациентов дополнительно назначали целекоксиб с целью иммуномодуляции. У 2 больных выявлен патоморфологический ответ (<10 % опухолевой ткани в материале после операции), у 2 пациентов зафиксировано прогрессирование заболевания в ходе лечения. Однако с учетом небольшого размера выборки авторы не смогли сделать выводы о целесообразности назначения ингибитора ЦОГ-2 [41]. В ходе исследования PICC авторы сравнили эффективность анти-PD-1-препарата торипалимаб в монотерапии и в комбинации с целекоксибом у пациентов с местно-распространенным dMMR/MSI КРР. После проведения шести 14-дневных циклов терапии выполнялось хирургическое вмешательство. В настоящий момент при медиане наблюдения 14,9 мес доступны лишь данные по частоте полных патоморфологических ответов. В группе торипалимаба в комбинации с целекоксибом этот показатель составил 88 %, в группе торипалимаба – 65 %. Токсичность лечения при добавлении целекоксиба к иммунотерапии не увеличивалась и оценивалась как удовлетворительная [42]. Ретроспективные данные по почечно-клеточному раку не подтверждают повышение эффективности ИКТ при совместном их применении с ингибиторами ЦОГ (селективные и неселективные). Авторы сравнили группу пациентов, получавших ИКТ в комбинации с ингибиторами ЦОГ, и группу пациентов, которым ингибиторы ЦОГ не назначали. Медиана ОВ составила 27 и 33 мес соответственно (ОР 1,09; 95 % ДИ 0,75–1,6; $p = 0,65$). Также выявлены статистически незначимые различия в ВБП (с тенденцией к более низким показателям выживаемости при применении ингибиторов ЦОГ) – медиана ВБП оказалась равна 8 и 13 мес соответственно (ОР 1,4; 95 % ДИ 0,98–1,9; $p = 0,055$) [43]. В ретроспективном исследовании, включавшем 198 пациентов с немелкоклеточным раком легкого, получавших иммунотерапию (ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб), 32,8 % больных получали терапию ингибиторами ЦОГ-1. Несмотря на отсутствие статистически значимых различий в ВБП и частоте объективных ответов, у больных, принимавших ингибиторы ЦОГ-1, наблюдались более низкие показатели ОВ, чем у пациентов, которым они не назначались (медиана ОВ 6,08 мес против 16,10 мес; 95 % ДИ 3,78–11,66 против 9,49–19,68; $p = 0,003$). После проведения псевдорандомизации различий в ОВ выявлено не было [44]. Результаты другого ретроспективного исследования, включавшего 90 пациентов с метастатической меланомой, продемонстрировали, что такой неблагоприятный фактор прогноза, как нейтрофильно-лейкоцитарное отношение (NLR) >5, нивелировался в случае приема ингибиторов ЦОГ-1, при этом наблюдалось увеличение времени до прогрессирования (ОР 0,36; 95 % ДИ 0,2–0,66) [45].

БИОМАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ АСПИРИНА

С учетом результатов исследований ASCOLT, A011502 и ALASCCA встает вопрос о необходимости селекции пациентов, которые будут иметь наибольшую пользу от назначения аспирина в адъювантном режиме, с помощью биомаркеров эффективности этого препарата. Исходя из указанных в обзоре данных, биомаркерами его эффективности могут стать молекулы и рецепторы, задействованные в каскадах механизма его действия. Например, наиболее очевидный фактор – синтез TxA2, который является точкой приложения аспирина, требует дальнейшего изучения. Так, исследование Add-Aspirin посвящено оценке уровня TxA2 посредством подсчета значений его метаболита 11-дегидро-тромбоксана В2 (U-TXM) в моче после радикального лечения РМЖ, КРР, гастроэзофагеального рака и рака предстательной железы [46]. В него включены 716 пациентов, которые получали аспирин в дозе 100 мг/сут в течение 8 нед, а далее были рандомизированы в группы аспирина в дозе 100 мг/сут, в дозе 300 мг/сут и плацебо на срок до 5 лет. Результаты исследования продемонстрировали, что у больных медиана концентрации U-TXM выше, чем у здоровых людей (~500 пг/мг):

- при РМЖ – 782 пг/мг;
- КРР – 1060 пг/мг;
- гастроэзофагеальном раке – 1675 пг/мг;
- раке предстательной железы – 826 пг/мг.

Прием аспирина в дозе 100 мг/день позволял снизить уровень U-TXM на 76–82 % во всех группах. Однако увеличение дозы препарата до 300 мг не демонстрировало дополнительного подавления U-TXM. К тому же у пациентов группы плацебо уровень U-TXM возвращался к исходному. Ограничением работы было отсутствие данных о выживаемости больных. Также в ходе многофакторного анализа выявлено влияние на концентрацию U-TXM таких параметров, как ожирение, курение, высокие уровни нейтрофилов, тромбоцитов и С-реактивного белка. Соответственно, можно лишь предположить, что низкие дозы аспирина позволяют уменьшить уровень U-TXM из-за снижения воспалительного ответа, однако данных об улучшении онкологических исходов и релевантности биомаркера недостаточно.

Также продемонстрирована более высокая активность аспирина при гиперэкспрессирующих ЦОГ-2 опухолях кишки. В работе A. Chan и соавт. проанализированы данные 636 пациентов, доступные для иммуногистохимической оценки экспрессии ЦОГ-2: у 67 % больных наблюдалась умеренная или выраженная экспрессия [47]. Эффект от использования аспирина значимо различался в зависимости от этого показателя. Регулярный прием данного препарата приводил к значительному снижению риска развития КРР с повышенной экспрессией ЦОГ-2 (ОР 0,64; 95 % ДИ 0,52–0,78), тогда как регулярный прием аспирина не оказывал никакого влияния на опухоли со слабой экспрессией ЦОГ-2 или без нее (ОР 0,96; 95 % ДИ 0,73–1,26).

Еще один биомаркер – активирующие альтерации PIK3CA – продемонстрировал свою клиническую значимость при опухолях толстой кишки. Влияние на сигнальный путь PI3K/AKT было сопоставлено с клиническими исходами в работе A. Chen и соавт. Авторы на протяжении 29 лет (1980–1999) использовали опросники и выявили, что прием аспирина позволяет снизить риск развития КРР у пациентов с гиперэкспрессией ЦОГ-2 и не влияет на опухоли со слабой экспрессией или ее отсутствием [46]. При дальнейшем анализе данных пациентов, у которых развился КРР, оказалось, что риск смерти от рака у больных, регулярно принимавших этот препарат, был на 30 % ниже, чем у больных, которым его не назначали (ОР 0,71; 95 % ДИ 0,53–0,95) [48]. На эффективность аспирина влияло наличие мутаций в гене *PIK3CA* [49, 50]. Согласно данным литературы, PGE2 активирует сигнальный путь PI3K/AKT преимущественно через рецептор EP4, который либо напрямую стимулирует фермент PIK3CA, либо опосредованно – через β-аррестин-1–SRC или секрецию EGF-подобных лигандов [51, 52]. Аспирин подавляет этот путь, снижая уровень PGE2, и оказывает более выраженное ингибирующее действие на опухолевый рост в клетках КРР с активирующими мутациями в гене *PIK3CA*. Согласно данным, полученным Y. Cai и соавт., гиперактивность сигнального пути PI3K/AKT приводит к гиперэкспрессии ЦОГ-2 на поверхности клетки опосредованно через NF-κB, что также запускает порочный круг [53]. Таким образом, *PIK3CA*-мутированная опухоль оказывается зависимой от медиатора воспаления – PGE2, что может объяснить эффективность применения аспирина в подгруппе пациентов с альтерациями сигнального пути PI3K [54].

В исследовании CALGB/SWOG 80702 авторы провели сравнение адъювантной терапии при КРР (FOLFOX) III стадии с добавлением целекоксиба или без него [55]. Для общей когорты пациентов этот препарат не продемонстрировал значимого влияния на безрецидивную выживаемость (ОР 0,89, 95 % ДИ 0,76–1,03; $p = 0{,}12$). Однако в группе с активирующими мутациями в гене *PIK3CA* (28 % больных) доказано увеличение ВБП (ОР 0,56, 95 % ДИ 0,33–0,96) и ОВ (ОР 0,44; 95 % ДИ 0,22–0,85). С учетом того что это был незапланированный анализ отрицательных результатов исследования, потребовалось подтверждение этих данных на отобранной популяции пациентов исследования ALASCCA. В этой работе 626 больных с местно-распространенными опухолями и наличием соматических альтераций в сигнальном пути PI3K после радикального лечения рандомизированы либо в группу аспирина в дозе 160 мг (ежедневно), либо в группу плацебо [13]. Прием аспирина позволил снизить риск развития рецидива на 51 % в группе мутаций в 9/20-м экзоне *PIK3CA* (ОР 0,49; 95 % ДИ 0,24–0,98; $p = 0{,}044$) и на 58 % в группе других альтераций сигнального пути PI3K (другие мутации в генах *PIK3CA*, *PIK3R1*, *PTEN*; ОР 0,42; 95 % ДИ 0,21–0,83; $p = 0{,}013$). Относительно безрецидивной выживаемости ОР составило 0,61 (95 % ДИ 0,34–1,08; $p = 0{,}091$) и 0,51 (95 % ДИ 0,29–0,88; $p = 0{,}017$) соответственно. Интересно, что при попытке вторичной профилактики развития метастазов КРР аспирин не продемонстрировал увеличения ВБП и ОВ при аналогичном дизайне исследования в работе ASAC [56], однако отдельный анализ статуса альтераций PIK3/AKT не проводился.

С учетом накопленного объема данных обоснованием эффективности аспирина в подгруппе пациентов с альтерациями в сигнальном пути PI3K/AKT могут быть особенности таких опухолей в плане опухолевого микроокружения, экспрессии лиганда PD-1 (PD-L1) и эпигенетических факторов. Так, результаты работы M. Nusrat и соавт. продемонстрировали, что *PIK3CA*-мутированные опухоли имеют бóльшую чувствительность к иммунотерапии (клиническая польза 50 % в случае иммунотерапии при *PIK3CA*-мутированном КРР и 8,6 % при диком типе *PIK3CA*) за счет более высоких инфильтрации опухоли $CD3^{+}$- и $CD8^{+}$-лимфоцитами и уровня экспрессии PD-L1 [57]. Необходимо также отметить, что соматические альтерации в опухоли уже демонстрировали взаимосвязь с микробиомом при КРР. Так, для *PIK3CA*-мутированных опухолей

Таблица 2. *Результаты исследований эффективности ингибиторов циклооксигеназы в онкологической практике*

Table 2. *Results of studies on the effectiveness of cyclooxygenase inhibitors in oncological practice*

Исследование Trial	**Нозология** Nosology	**Вариант назначения** Treatment option	**Число пациентов** Number of patients	**Препарат и режим приема** Drug and dosage regimen	**Биомаркер** Biokmarker	**Результаты** Results	**Нежелательные явления** Adverse events
ALASCCA	КРР CRC	Адъювантное Adjuvant	626	Аспирин в дозе 160 мг/сут *vs* плацебо – 3 года Aspirin in a dose 160 mg/day *vs* placebo – for 3 years	PI3Kmut/PTEN	3-летняя ВБП: группа аспирина – ОР 0,61 (95 % ДИ 0,34–1,08; $p = 0,091$); группа плацебо – ОР 0,51 (95 % ДИ 0,29–0,88; $p = 0,017$) 3-year PFS: aspirin group – HR 0.61 (95 % CI 0.34–1.08; $p = 0.091$); placebo group – HR 0.51 (95 % CI 0.29–0.88; $p = 0.017$)	Развитие кровотечения – 0,5 % (3/626) Bleeding – 0.5 % (3/626)
ASCOLT	КРР CRC	Адъювантное Adjuvant	1550	Аспирин в дозе 200 мг/сут *vs* плацебо (3 года) Aspirin in a dose 200 mg/day *vs* placebo – for 3 years	–	5-летняя ОВ – 77 % *vs* 74,8 % (ОР 0,91; 95 % ДИ 0,73–1,13) 5-year OS – 77 % *vs* 74.8 % (HR 0.91; 95 % CI 0.73–1.13)	Развитие кровотечения – 0,4 % (3/791) Bleeding – 0.4 % (3/791)
Add-Aspirin	КРР, рак молочной и предстательной желез CRC, breast cancer, prostatic cancer	Адъювантное Adjuvant	716	Аспирин в дозе 100 мг/сут *vs* 300 мг/сут *vs* аспирин в дозе плацебо – 5 лет Aspirin in a dose 100 mg/day *vs* aspirin in a dose 300 mg/day *vs* placebo – for 5 years	U-TXM	Снижение уровня U-TXM на 76–82 % Reducing the level of U-TXM by 76–82 %	–
SAKK 41/13 [61]	КРР CRC	Адъювантное Adjuvant	112	Аспирин в дозе 100 мг/сут *vs* плацебо – 3 года Aspirin in a dose 100 mg/day *vs* placebo – for 3 years	PIK3CAmut	5-летняя ВБП – 86,5 % *vs* 72,9 % ($p = 0,08$) 5-year PFS – 86.5 % *vs* 72.9 % ($p = 0.08$)	–
CALGB/SWOG 80702	КРР CRC	Адъювантное Adjuvant	2524	Целекоксиб в дозе 400 мг 2 раза в день Celocoxib in a dose 400 mg 2 times a day	–	3-летняя ВБП – 76,3 % *vs* 73,4 % (ОР 0,89; 95 % ДИ 0,76–1,03) 3-year PFS – 76.3 % *vs* 73.4 % (HR 0.89; 95 % CI 0.76–1.03)	–
ASAC	КРР CRC	Условно адъювантное Conditional use of adjuvant therapy	466	Аспирин в дозе 160 мг/сут *vs* плацебо – 3 года Aspirin in a dose 160 mg/day *vs* placebo – for 3 years	–	3-летняя ВБП – ОР 1,06 (95 % ДИ 0,77–1,45) *vs* ОР 1.60 (95 % ДИ 0,99–2,61) 3-year PFS – HR 1.06 (95 % CI 0.77–1.45) *vs* HR 1.60 (95 % CI 0.99–2.61)	Серьезные нежелательные явления – 7,8 % *vs* 1,9 % Serious adverse events – 7.8 % *vs* 1.9 %

Окончание табл. 2
End of table 2

Исследование Trial	**Нозология** Nosology	**Вариант назначения** Treatment option	**Число пациентов** Number of patients	**Препарат и режим приема** Drug and dosage regimen	**Биомаркер** Biokmarker	**Результаты** Results	**Нежелательные явления** Adverse events
A011502	Рак молочной железы Breast cancer	Адъювантное Adjuvant	3020	Аспирин в дозе 300 мг/сут *vs* плацебо – 3 года Aspirin in a dose 300 mg/day *vs* placebo – for 3 years	–	3-летняя ВБП – ОР 1,27 (95 % ДИ 0,99–1,64) *vs* ОР 1,19 (95 % ДИ 0,82–1,72) 3-year PFS – HR 1.27 (95 % CI 0.99–1.64) *vs* HR 1.19 (95 % CI 0.82–1.72)	Развитие кровотечения – 1,8 *vs* 1,5 % Bleeding – 1.8 *vs* 1.5 %
NICHE	MSS КРР MSS CRC	Неоадъювантное Neoadjuvant	7	Ниволумаб + ипилимумаб + + целекоксиб Nivolumab + ipilimumab + + celecoxib	–	Выраженный патоморфологический ответ – 28 %, прогрессирование заболевания – 28 % Major pathological response – 28 %, progression disease – 28 %	–
PICC	MSI КРР MSI CRC	Неоадъювантное Neoadjuvant	34	Торипалимаб + целекоксиб в дозе 200 мг 2 раза в сутки *vs* торипалимаб Toripalimab + celecoxib in a dose 200 mg 2 times a day *vs* toripalimab	–	Частота патологического полного ответа 88 % *vs* 65 % The frequency of the pathological complete response 88 % *vs* 65 %	–

Примечание. *КРР – колоректальный рак; MSS – микросателлитностабильный фенотип; MSI – микросателлитнонестабильный фенотип; ВБП – выживаемость без прогрессирования; ОВ – общая выживаемость; ОР – отношение рисков; ДИ – доверительный интервал.*
Note. *CRC – colorectal cancer; MSS – microsatellite stable phenotype; MSI – microsatellite instability phenotypes; PFS – progression-free survival; OS – overall survival; HR – hazard ratio; DI – confidence interval.*

показано преобладание некоторых бактерий, в том числе *Lactobacillales*, которые замедляют рост КРР, секретируя короткоцепочечные жирные кислоты (SCFAs), усиливающие барьерную функцию кишечника [58]. Таким образом, биологическое обоснование действия аспирина при выявлении альтерации сигнального пути PI3K/AKT может быть связано как с особенностями иммунного окружения опухоли, так и с особенностями микробиома.

Также высказаны предположения о влиянии на ответ на лечение аспирином уровня опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов [59]. Согласно данным J. Yang и соавт. [20], другими возможными биомаркерами эффективности этого препарата являются TxA2-рецепторы, ARHGEF1 в T-лимфоцитах и рецепторы EP4, EP2 в опухоли, которые необходимо изучить с целью отбора пациентов для терапии ЦОГ-ингибиторами.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ

В настоящее время накоплен значительный объем данных, свидетельствующих о потенциальной противоопухолевой активности аспирина (табл. 2). Однако для внедрения этого препарата в клиническую практику в качестве вспомогательного или профилактического средства при ЗНО требуется решение ряда ключевых вопросов.

Одной из приоритетных задач является определение спектра нозологий, при которых применение аспирина может быть оправдано. Больше всего данных об эффективности этого препарата получено при КРР и РМЖ [60]. Перспективным направлением является изучение влияния аспирина на прогноз при других опухолях, особенно ассоциированных с хроническим воспалением (например, рак желудка, поджелудочной, предстательной желез). Важным аспектом служит стратификация пациентов на основе молекулярно-генетических особенностей опухоли (например, активирующие мутации в гене *PIK3CA*) и поиск других предиктивных биомаркеров.

Другой приоритетной задачей является изучение синергизма действия аспирина с новыми методами лечения: иммунной (модуляция иммунного ответа за счет влияния на экспрессию PD-L1 и активность опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов), таргетной (воздействие на сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR), химиолучевой (оценка радиосенсибилизирующего эффекта) терапией.

Еще одно направление исследований – оценка результатов включения аспирина в схемы неоадъювантного лечения. В качестве суррогатного маркера эффективности может рассматриваться частота патологического полного ответа, что особенно актуально при КРР и РМЖ как нозологий с уже полученными предварительными данными о высокой результативности ингибиторов ЦОГ-1. Анализ динамики патологического полного ответа на фоне приема аспирина поможет уточнить его потенциальную роль в повышении эффективности стандартной терапии.

С учетом актуальных данных о роли аспирина в профилактике возникновения рака (в частности среди носителей синдрома Линча, по результатам исследования CAPP-3 [10]), требуется рассмотреть возможность расширения клинического применения этого препарата в качестве превентивной терапии у лиц без онкологических заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, несмотря на значительный объем накопленных данных, в связи с противоречивыми результатами проспективных исследований аспирин пока не внедрен в первичную профилактику КРР при ряде наследственных синдромов и во вторичную профилактику при выявлении в опухоли мутации в гене *PIK3CA*/*PIK3R1*/*PTEN* при раке прямой кишки pTNM I–III стадии и ободочной кишки pTNM II–III стадии у пациентов 18–80 лет в адъювантном режиме. Это говорит о необходимости дальнейшего изучения противоопухолевой активности данного препарата и других селективных ингибиторов ЦОГ-1.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Pollard M., Luckert P.H. Treatment of chemically-induced intestinal cancers with indomethacin. Proc Soc Exp Biol Med 1981;167(2):161–4. DOI: 10.3181/00379727-167-41142
2. Pollard M., Luckert P.H. Prolonged antitumor effect of indomethacin on autochthonous intestinal tumors in rats. J Natl Cancer Inst 1983;70(6):1103–5.
3. Narisawa T., Hermanek P., Habs M. et al. Reduction of carcinogenicity of W-nitrosomethylurea by indomethacin and failure of resuming effect of prostaglandin E2 (PGE2) against indomethacin. J Cancer Res Clin Oncol 1984;108(2):239–42. DOI: 10.1007/BF00402475
4. Rosenberg L., Palmer J.R., Zauber A.G. et al. A hypothesis: nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large-bowel cancer. J Natl Cancer Inst 1991;83(5):355–8. DOI: 10.1093/jnci/83.5.355
5. Suh O., Mettlin C., Petrelli N.J. Aspirin use, cancer, and polyps of the large bowel. Cancer 1993;72(4):1171–7. DOI: 10.1002/1097-0142(19930815)72:4<1171::aid-cncr2820720407>3.0.co;2-d
6. Wang P., Chen B., Huang Y. et al. The relationship between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer incidence: an umbrella review. Heliyon 2024;10(2):e23203. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e23203
7. Rothwell P.M., Wilson M., Price J.F. et al. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. Lancet 2012;379(9826):1591–601. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60209-8
8. Mills E.J., Wu P., Alberton M. et al. Low-dose aspirin and cancer mortality: a meta-analysis of randomized trials. Am J Med 2012;125(6):560–7. DOI: 10.1016/j.amjmed.2012.01.017

9. Elwood P.C., Morgan G., Delon C. et al. Aspirin and cancer survival: a systematic review and meta-analyses of 118 observational studies of aspirin and 18 cancers. Ecancermedicalscience 2021;15:1258. DOI: 10.3332/ecancer.2021.1258
10. Cancer Researcg UK. Low-dose aspirin can prevent bowel cancer in people with Lynch syndrome. Available at: https://news.cancerresearchuk.org/2025/06/24/capp3-low-dose-of-aspirin-can-prevent-bowel-cancer-in-people-with-lynch-syndrome/
11. Chia J.W.K., Segelov E., Deng Y. et al. Aspirin after completion of standard adjuvant therapy for colorectal cancer (ASCOLT): an international, multicentre, phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Gastroenterol Hepatol 2025;10(3):198–209. DOI: 10.1016/S2468-1253(24)00387-X
12. Chen W.Y., Ballman K.V., Partridge A.H. et al. Aspirin *vs* placebo as adjuvant therapy for breast cancer: the alliance A011502 randomized trial. JAMA 2024;331(20):1714–21. DOI: 10.1001/jama.2024.4840
13. Martling A., Hed Myrberg I., Nilbert M. et al. Low-dose aspirin for PI3K-Altered localized colorectal cancer. N Engl J Med 2025;393(11):1051–64. DOI: 10.1056/NEJMoa2504650
14. Angiolillo D.J., Prats J., Deliargyris E.N. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of a novel phospholipid aspirin formulation. Clin Pharmacokinet 2022;61(4):465–79. DOI: 10.1007/s40262-021-01090-2
15. Davies N.M., Jamali F. COX-2 selective inhibitors cardiac toxicity: getting to the heart of the matter. J Pharm Pharm Sci 2004;7(3):332–6.
16. Marnett L.J., DuBois R.N. COX-2: a target for colon cancer prevention. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2002;42:55–80. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.42.082301.164620
17. Gupta R., DuBois R. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. Nat Rev Cancer 2001;1(1):11–21. DOI: 10.1038/35094017
18. Ogino S., Kirkner G.J., Nosho K. et al. Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. Clin Cancer Res 2008;14(24):8221–7. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1841
19. Majima M., Hayashi I., Muramatsu M. et al. Cyclo-oxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. Br J Pharmacol 2000;130(3):641–9. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703327
20. Yang J., Yamashita-Kanemaru Y., Morris B.I. et al. Aspirin prevents metastasis by limiting platelet TXA2 suppression of T cell immunity. Nature 2025;640(8060):1052–61 DOI: 10.1038/s41586-025-08626-7
21. Reactome. Orlic-Milacic M. RHOA GAPs stimulate RHOA GTPase activity. Available at: https://www.reactome.org/content/detail/R-HSA-8981637
22. Lawson C.D., Fan C., Mitin N. et al. Rho GTPase transcriptome analysis reveals oncogenic roles for rho GTPase-activating proteins in basal-like breast cancers. Cancer Res 2016;76(13):3826–37. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2923
23. Bros M., Haas K., Moll L., Grabbe S. RhoA as a key regulator of innate and adaptive immunity. Cells 2019;8(7):733. DOI: 10.3390/cells8070733
24. Huen D.S., Henderson S.A., Croom-Carter D., Rowe M. The Epstein–Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. Oncogene 1995;10(3):549–60.
25. Kopp E., Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. Science 1994;265(5174):956–9. DOI: 10.1126/science.8052854
26. Hawley S.A., Fullerton M.D., Ross F.A. et al. The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. Science 2012;336(6083):918–22. DOI: 10.1126/science.1215327
27. Din F.V., Valanciute A., Houde V.P. et al. Aspirin inhibits mTOR signaling, activates AMP-activated protein kinase, and induces autophagy in colorectal cancer cells. Gastroenterology 2012;142(7):1504–15.e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.02.050
28. Qian X., Ning H., Zhang J. et al. Posttranslational regulation of DNMT1 stability by salicylate compounds. Cancer Res 2011;71(24):7236–46. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2040
29. Kostic A.D., Gevers D., Pedamallu C.S. et al. Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma. Genome Res 2012;22(2):292–8. DOI: 10.1101/gr.126573.111
30. Castellarin M., Warren R.L., Freeman J.D. et al. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. Genome Res 2012;22(2):299–306. DOI: 10.1101/gr.126516.111
31. Ashare A., Stanford C., Hancock P. et al. Chronic liver disease impairs bacterial clearance in a human model of induced bacteremia. Clin Transl Sci 2009;2(3):199–205. DOI: 10.1111/j.1752-8062.2009.00122.x
32. Abed J., Maalouf N., Manson A.L. et al. Colon cancer-associated Fusobacterium nucleatum may originate from the oral cavity and reach colon tumors via the circulatory system. Front Cell Infect Microbiol 2020;10:400. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00400
33. Nejman D., Livyatan I., Fuks G. et al. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. Science 2020;368(6494):973–80. DOI: 10.1126/science.aay9189
34. Hieken T.J., Chen J., Hoskin T.L. et al. The microbiome of aseptically collected human breast tissue in benign and malignant disease. Sci Rep 2016;6:30751. DOI: 10.1038/srep30751
35. Alon-Maimon T., Mandelboim O., Bachrach G. Fusobacterium nucleatum and cancer. Periodontol 2000 2022;89(1):166–80. DOI: 10.1111/prd.12426
36. Brennan C.A., Nakatsu G., Gallini Comeau C.A. et al. Aspirin modulation of the colorectal cancer-associated microbe fusobacterium nucleatum. mBio 2021;12(2):e00547–21. DOI: 10.1128/mBio.00547-21
37. Hutchinson L. Evading immune escape: synergy of COX and immune-checkpoint inhibitors. Nat Rev Clin Oncol 2015;12(11):622. DOI: 10.1038/nrclinonc.2015.167
38. Zelenay S., van der Veen A.G., Böttcher J.P. et al. Cyclooxygenase-dependent tumor growth through evasion of immunity. Cell 2015;162(6):1257–70. DOI: 10.1016/j.cell.2015.08.015
39. Park A., Lee Y., Kim M.S. et al. Prostaglandin E2 secreted by thyroid cancer cells contributes to immune escape through the suppression of natural killer (NK) cell cytotoxicity and NK cell differentiation. Front Immunol 2018;9:1859. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01859
40. Böttcher J.P., Bonavita E., Chakravarty P. et al. NK cells stimulate recruitment of cDC1 into the tumor microenvironment promoting cancer immune control. Cell 2018;172(5):1022–1037.e1014. DOI: 10.1016/j.cell.2018.01.004
41. Chalabi M., Fanchi L.F., Dijkstra K.K. et al. Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers. Nat Med 2020;26(4):566–76. DOI: 10.1038/s41591-020-0805-8
42. Hu H., Kang L., Zhang J. et al. Neoadjuvant PD-1 blockade with toripalimab, with or without celecoxib, in mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high, locally advanced, colorectal cancer (PICC): a single-centre, parallel-group, non-comparative, randomised, phase 2 trial. Lancet Gastroenterol Hepatol 2022;7(1):38–48. DOI: 10.1016/S2468-1253(21)00348-4
43. Zhang Y., Kumar P., Adashek J.J. et al. Cyclooxygenase inhibitors to immune checkpoint inhibitors did not improve outcomes in metastatic renal cell carcinoma. Cells 2022;11(16):2505. DOI: 10.3390/cells11162505
44. Kanai O., Ito T., Saito Z. et al. Effect of cyclooxygenase inhibitor use on immunotherapy efficacy in non-small cell lung cancer. Thorac Cancer 2021;12(6):949–57. DOI: 10.1111/1759-7714.13845
45. Wang S.J., Khullar K., Kim S. et al. Effect of cyclo-oxygenase inhibitor use during checkpoint blockade immunotherapy in patients

with metastatic melanoma and non-small cell lung cancer. J Immunother Cancer 2020;8(2):e000889. DOI: 10.1136/jitc-2020-000889
46. Joharatnam-Hogan N., Hatem D., Cafferty F.H. et al. Thromboxane biosynthesis in cancer patients and its inhibition by aspirin: a sub-study of the Add-Aspirin trial. Br J Cancer 2023;129(4):706–20. DOI: 10.1038/S41416-023-02310-1
47. Chan A.T., Ogino S., Fuchs C.S. Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. N Eng J Med 2007;356(21):2131–42. DOI: 10.1056/NEJMoa067208
48. Chan A.T., Ogino S., Fuchs C.S. Aspirin use and survival after diagnosis of colorectal cancer. JAMA 2009;302(6):649–58. DOI: 10.1001/jama.2009.1112
49. Reimers M.S., Bastiaannet E., Langley R.E. et al. Expression of HLA class I antigen, aspirin use, and survival after a diagnosis of colon cancer. JAMA Intern Med 2014;174(5):732–9. DOI: 10.1001/jamainternmed.2014.511
50. Liao X., Lochhead P., Nishihara R. et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. N Eng J Med 2012;367(17):1596–606. DOI: 10.1056/NEJMoa1207756
51. Buchanan F.G., Gorden D.L., Matta P. et al. Role of β-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103 (5):1492–7. DOI: 10.1073/pnas.0510562103
52. Buchanan F.G., Wang D., Bargiacchi F., DuBois R.N. Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. J Biol Chem 2003;278 (37):35451–7. DOI: 10.1074/jbc.M302474200
53. Cai Y., Yousef A., Grandis J.R., Johnson D.E. NSAID therapy for PIK3CA-altered colorectal, breast, and head and neck cancer. Adv Biol Regul 2020;75:100653. DOI: 10.1016/j.jbior.2021.100856
54. Grancher A., Michel P., Di Fiore F., Sefrioui D. Colorectal cancer chemoprevention: is aspirin still in the game? Cancer Biol Ther 2022;23(1):446–61. DOI: 10.1080/15384047.2022.2104561
55. Meyerhardt J.A., Shi Q., Fuchs C.S. et al. Effect of celecoxib vs placebo added to standard adjuvant therapy on disease-free survival among patients with stage III colon cancer: the CALGB/SWOG 80702 (alliance) randomized clinical trial. JAMA 2021;325(13):1277–86. DOI: 10.1001/jama.2021.2454
56. Aspirin as secondary prevention for colorectal cancer liver metastases (ASAC): a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Available at: https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2025.43.17_suppl.LBA3511
57. Nusrat M., Roszik J., Katkhuda R. et al. Association of PIK3CA mutations (mut) with immune engagement and clinical benefit from immunotherapy in microsatellite stable (MSS) colorectal cancer (CRC) patients (pts). J Clin Oncol 2019;37(15_suppl):3604. DOI: 10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.3604
58. Yuan D., Tao Y., Wang H. et al. A comprehensive analysis of the microbiota composition and host driver gene mutations in colorectal cancer. Invest New Drugs. 2022;40(5):884–94. DOI: 10.1007/s10637-022-01263-1
59. Cao Y., Nishihara R., Qian Z.R. et al. Regular aspirin use associates with lower risk of colorectal cancers with low numbers of tumor-infiltrating lymphocytes. Gastroenterology 2016;151(5):879–92.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.07.030
60. Henry W.S., Laszewski T., Tsang T. et al. Aspirin suppresses growth in PI3K-mutant breast cancer by activating AMPK and inhibiting mTORC1 signaling. Cancer Res 2017;77(3):790–801. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2400
61. Güller U., Hayoz S., Horber D. et al. Adjuvant aspirin treatment in PIK3CA mutated colon cancer patients: the SAKK 41/13-prospective randomized placebo-controlled double-blind trial. Clin Cancer Res 2025;31(15):3142–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-24-4048

Вклад авторов
О.А. Кузнецова: поиск и анализ литературы по теме статьи, написание текста статьи;
М.Ш. Манукян: систематизация данных литературы, редактирование;
А.А. Лебедева: сбор и систематизация данных;
А.А. Трякин: разработка концепции и дизайна, научное руководство, редактирование;
М.Ю. Федянин: разработка концепции, интерпретация данных, научное редактирование;
М.М. Братухина: сбор и систематизация данных литературы, редактирование, подготовка иллюстративного материала;
С.А. Тюляндин: разработка концепции, научное консультирование, редактирование.

Authors' contributions
O.A. Kuznetsova: search and analysis of literature on the topic of the article, article writing;
M.S. Manukyan: systematization of literature data, editing;
A.A. Lebedeva: data collection and systematization;
A.A. Tryakin: concept and design development, scientific guidance, editing;
M.Yu. Fedyanin: concept development, data interpretation, scientific editing;
M.M. Bratukhina: collection and systematization of literature data, editing, preparation of illustrative material;
S.A. Tjulandin: concept development, scientific consulting, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors
О.А. Кузнецова / O.A. Kuznetsova: https://orcid.org/0000-0001-7753-3081
М.Ш. Манкуян / M.S. Manukyan: https://orcid.org/0000-0002-5084-4872
А.А. Лебедева / A.A. Lebedeva: https://orcid.org/0000-0003-1920-5076
А.А. Трякин / A.A. Tryakin: https://orcid.org/0000-0003-2245-214X
М.Ю. Федянин / M.Yu. Fedyanin: https://orcid.org/0000-0001-5615-7806
М.М. Братухина / M.M. Bratukhina: https://orcid.org/0000-0002-9278-5399
С.А. Тюляндин / S.A. Tjulandin: https://orcid.org/0000-0001-9807-2229

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

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

Статья поступила: 04.08.2025. **Принята к публикации:** 20.10.2025. **Опубликована онлайн:** 10.12.2025.
Article submitted: 04.08.2025. **Accepted for publication:** 20.10.2025. **Published online:** 10.12.2025.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-38-50

Роль FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в механизмах вторичной резистентности гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам тирозинкиназных рецепторов

П.Д. Дунаев[1], Ф.И. Мухутдинова[1], М.С. Шашина[1], П.Б. Копнин[2], С.В. Бойчук[1, 3, 4]

[1]ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 49;
[2]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;
[3]Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18, корп. 1;
[4]ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Контакты: Сергей Васильевич Бойчук *boichuksergei@mail.ru*

В настоящее время большое количество научных исследований посвящено изучению роли рецепторных тирозинкиназ в механизмах резистентности опухолевых клеток к таргетным и химиопрепаратам. Активация FGFR- и VEGR-сигнальных путей, запускаемых соответственно факторами роста фибробластов (FGF) и факторами роста эндотелия сосудов (VEGF), отмечается при развитии многих злокачественных новообразований.
Обзор литературы посвящен изучению роли сигналинга рецепторов FGF (FGFR) и VEGF (VEGFR) в развитии вторичной (приобретенной) резистентности гастроинтестинальных стромальных опухолей к таргетным препаратам – ингибиторам тирозинкиназных рецепторов (иматиниба мезилату, сунитинибу, регорафенибу). В статье представлена информация о механизмах активации FGFR- и VEGR-сигнальных путей в опухолевых клетках, а также об их структурной и функциональной взаимосвязи. Проведен анализ собственных исследований, посвященных изучению активации FGFR- и VEGFR-сигналинга в гастроинтестинальных стромальных опухолях. Описаны клинические испытания эффективности ингибиторов указанных сигнальных путей при диссеминированных формах этих новообразований, а также даны рекомендации по использованию маркеров активации FGFR- и VEGFR-сигналинга в диагностике прогрессирования гастроинтестинальных стромальных опухолей.

Ключевые слова: гастроинтестинальная стромальная опухоль, резистентность к иматинибу, сигнальный путь рецепторов факторов роста фибробластов, FGFR-сигнальный путь, сигнальный путь рецепторов факторов роста эндотелия сосудов, VEGFR-сигнальный путь, ингибитор тирозинкиназных рецепторов, сунитиниб, регорафениб

Для цитирования: Дунаев П.Д., Мухутдинова Ф.И., Шашина М.С. и др. Роль FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в механизмах вторичной резистентности гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам тирозинкиназных рецепторов. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(4):38–50.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-38-50

The role of FGFR and VEGFR signaling pathways in the mechanisms of secondary resistance of gastrointestinal stromal tumors to tyrosine kinase receptor inhibitors

P.D. Dunaev[1], F.I. Mukhutdinova[1], M.S. Shashina[1], P.B. Kopnin[2], S.V. Boichuk[1, 3, 4]

[1]Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 49 Butlerova St., Kazan 420012, Russia;
[2]N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia;
[3]Research Laboratory "Biomarker", Institute of Fundamental Medicine and Biology of the Kazan Federal University; Bld. 1, 18 Kremlevskaya St., Kazan 420008, Russia;
[4]Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 Barricadnaya St., 125993 Moscow, Russia;

Contacts: Sergei Vasilyevich Boichuk *boichuksergei@mail.ru*

Currently, many scientific studies investigate the role of receptor tyrosine kinases in mechanisms of tumor cell resistance to targeted therapies and chemotherapies. Activation of FGFR and VEGR signaling pathways through fibroblast growth factors (FGF) and vascular endothelial growth factors (VEGF) is seen in many malignant neoplasms. The literature review was addressed to describe the role of FGFR and VEGFR signaling pathways in the secondary (acquired) resistance of gastrointestinal stromal tumors to the targeted drugs – tyrosine kinase receptor inhibitors (imatinib mesylate, sunitinib, regorafenib).

The review describes the molecular mechanisms of activation of FGFR and VEGR signaling pathways in tumor cells, as well as their structural and functional relationship between aforementioned pathways. Multiple studies, including our own, illustrate the activation of FGFR and VEGFR pathways in gastrointestinal stromal tumors. The review also describes the clinical effectiveness of FGFR and VEGFR inhibition for advanced and metastatic gastrointestinal stromal tumors, thereby providing a rationale to utilize activation of the aforementioned signaling pathways as the markers for gastrointestinal stromal tumors progression.

Keywords: gastrointestinal stromal tumor, imatinib resistance, fibroblast growth factors receptor, FGFR signaling pathway, vascular endothelial growth factors receptor, VEGFR signaling pathway, tyrosine kinase receptor inhibitor, sunitinib, regorafenib

For citation: Dunaev P.D., Mukhutdinova F.I. Shashina M.S. et al. The role of FGFR and VEGFR signaling pathways in the mechanisms of secondary resistance of gastrointestinal stromal tumors to tyrosine kinase receptor inhibitors. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(4):38–50. (In Russ.).
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-38-50

ВВЕДЕНИЕ

Среди злокачественных новообразований (ЗНО) желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) следует особо отметить гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) – редкие неоплазмы мезенхимного происхождения, развивающиеся из интерстициальных клеток Кахаля (водителей ритма гладкой мускулатуры желудка и кишечника) [1, 2]. Согласно статистическим данным, ГИСО составляют 3–4 % всех злокачественных опухолей ЖКТ. В мире ежегодно диагностируют 10–15 случаев этих опухолей на 1 млн населения [3, 4]. В большинстве случаев ГИСО локализуются в области дна и тела желудка (65–70 % случаев), а также в двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишках (25–35 % случаев). Реже они располагаются в ободочной и прямой кишках (3–5 % случаев). Описаны крайне редкие локализации ГИСО – в забрюшинном пространстве, сальнике, брыжейке и пищеводе. Обычно возраст пациентов с данной патологией составляет 50–65 лет [5, 6].

В патогенезе ГИСО ключевое значение имеют активирующие мутации в генах *KIT* или *PDFRA*, которые являются взаимоисключающими. Примерно в 75–80 % случаев при данной патологии в опухолевых клетках обнаруживают мутации в гене *KIT*, мутации же в гене *PDFRA* отмечаются не более чем у 10 % пациентов. Вариант ГИСО, при котором в опухолевых клетках отсутствуют мутации в генах *KIT* и *PDFRA*, обозначается как ГИСО *KIT/PDGFRA* дикого типа. Частота его встречаемости составляет 10–15 % случаев [7, 8]. Мутации в генах *KIT* и *PDFRA* способствуют повышенной активности рецептора фактора роста стволовых клеток (c-KIT, CD117) или α-рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFRα) соответственно, за счет которых в опухолевых клетках поддерживается лиганд-независимый сигналинг (MAPK, AKT, STAT), приводящий к пролиферации [9, 10].

Дополнительными диагностическими маркерами ГИСО являются мембранный белок CD34 и внутриклеточные белки – гладкомышечный актин, десмин, S-100 протеин, а также обнаруженный в 2004 г. DOG1, который экспрессируется в опухолевых клетках даже в отсутствие c-KIT и PDGFRα [11–13].

Таргетная терапия ГИСО основана на применении ингибиторов тирозинкиназ, первым из которых является иматиниба мезилат (ИМ), зарегистрированный для лечения данных опухолей в 2002 г. Это лекарственное средство за счет блокирования тирозинкиназных рецепторов (c-KIT, PDGFRα) индуцирует развитие апоптоза клеток ГИСО и тем самым обеспечивает стабилизацию клинической картины диссеминированных форм заболевания, что способствует увеличению продолжительности жизни пациентов [14]. Тем не менее на фоне терапии ИМ формируется приобретенная (вторичная) резистентность опухолевых клеток к препарату, которая проявляется у 40–50 % пациентов примерно через 18–24 мес от начала лечения [14, 15].

Препаратами 2-й и 3-й линий таргетной терапии ГИСО являются соответственно сунитиниб (зарегистрирован в 2006 г.) и регорафениб (зарегистрирован в 2013 г.). Данные таргетные препараты, помимо ингибирования c-KIT и PDGFR, способны блокировать рецепторы фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGFR), а также другие тирозинкиназы, представляя собой, таким образом, мультикиназные ингибиторы [16, 17]. Терапия сунитинибом и регорафенибом сопряжена с возникновением большого количества побочных эффектов (сердечная недостаточность, артериальная гипертензия, геморрагический синдром, гепатотоксичность и др.), что существенным образом снижает их клиническую значимость. Кроме того, как и в случае ИМ, у клеток ГИСО развивается приобретенная резистентность к этим препаратам [16–18]. В настоящее время проводятся клинические испытания III фазы препарата рипретиниб (NCT03673501) (DCC-2618) с целью определения возможности его применения в качестве 4-й линии таргетной терапии ГИСО, т. е. в случае резистентности опухолевых клеток к сунитинибу и регорафенибу [19]. Этот препарат блокирует регуляторные домены рецепторов c-KIT и PDGFRα: 1) юкста-мембранный домен, расположенный в цитоплазме на внутренней поверхности клеточной мембраны; 2) киназную вставку рецептора – цитоплазматический участок, расположенный между 1-м и 2-м тирозинкиназными доменами рецепторов. В результате он ингибирует сигналинг, поступающий от 1-го цитоплазматического тирозинкиназного домена (TK1) рецепторов c-KIT и PDGFRα к их 2-му цитоплазматическому тирозинкиназному домену (TK2). За счет такого механизма действия рипретиниб обладает эффективностью в отношении ГИСО, имеющих вторичные мутации в гене *KIT* или *PDFRA*, которые во многих случаях индуцируют изменение структуры 1-го цитоплазматического тирозинкиназного домена рецепторов c-KIT и PDGFRα с развитием их гиперактивации [20]. Предварительные результаты использования рипретиниба для терапии ГИСО являются многообещающими. В частности, медиана выживаемости без прогрессирования пациентов с диссеминированными ГИСО, получавших рипретиниб в качестве 4-й линии таргетной терапии, составила более 5 мес, а получавших этот препарат в качестве 2-й линии терапии – более 10 мес [19, 20].

Развитие вторичной резистентности ГИСО к таргетному препарату ИМ может быть следствием различных механизмов. В опухолевых клетках, как указано выше, могут возникнуть вторичные мутации в гене *KIT* или *PDGFRA*, приводящие к изменению структуры 1-го цитоплазматического тирозинкиназного домена рецепторов c-KIT и PDGFRα, что нарушает взаимодействие с ним ИМ и поддерживает клеточную пролиферацию [15, 20]. Приобретенная резистентность ГИСО к ИМ может быть вызвана уменьшением экспрессии рецепторов c-KIT и PDGFRα, а также изменением киназного профиля опухолевых клеток, проявляющегося активацией других тирозинкиназ (рецепторных и внутриклеточных). В частности, в ИМ-резистентных клетках ГИСО продемонстрирована активация рецепторных тирозинкиназ MET, AXL и нерецепторной тирозинкиназы FAK, которые способны запускать внутри клеток альтернативную активацию сигнальных каскадов (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR) и тем самым обеспечивать их пролиферацию [21, 22].

В патогенезе множества ЗНО показано участие белков FGFR- и VEGFR-сигналинга. Исследование механизмов активации данных сигнальных путей в ГИСО является актуальной задачей молекулярной онкологии, поскольку позволит обнаружить новые потенциальные мишени для таргетной терапии и, следовательно, обеспечит улучшение качества жизни пациентов с метастатическими и рецидивирующими формами заболевания [23–25].

Цель работы – охарактеризовать современные представления о механизмах активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в ГИСО и их роли в развитии вторичной резистентности к ингибиторам тирозинкиназных рецепторов (иматиниба мезилату, сунитинибу, регорафенибу).

АКТИВАЦИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ РЕЦЕПТОРОВ ФАКТОРОВ РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Факторы роста фибробластов (fibroblast growth factors, FGF) представляют собой семейство белков, состоящее из 22 представителей (FGF1–22). По химической структуре они являются гликопротеинами, которые могут обнаруживаться внутри клетки (в цитоплазме, ядре), а также секретироваться во внеклеточное пространство. Среди всех представителей FGF наиболее изученными являются гликопротеины 1-го (FGF-1) и 2-го (FGF-2) типов [26, 27].

Молекулы FGF-1 и FGF-2 для реализации своих функций связываются с соответствующими рецепторами FGFR1–4, которые обнаруживаются на мембранах различных клеток организма человека – эпителии, клетках соединительной ткани (фибробласты, эндотелий сосудов, гладкомышечные клетки), костной, нервной тканях и др. [27, 28]. От рецепторов FGFR1–4 сигнал поступает внутрь клетки на адаптерный белок FRS-2 (fibroblast growth factor receptor substrate 2). Далее от него активационный сигнал передается к клеточным белкам пролиферативных каскадов (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR). В результате запускаются процессы деления клеток и их дифференцировки [26–28].

Фактор роста фибробластов 1-го типа главным образом участвует в процессах ангиогенеза, воздействуя на эндотелий и гладкую мускулатуру сосудистой стенки. FGF-2, в отличие от FGF-1, обладает более широким спектром биологических эффектов: в эмбриогенезе играет большую роль в процессах формирования паренхиматозных органов, а также стенок полых органов, участвует в заживлении поврежденных тканей и их регенерации, обеспечивает ангиогенез, способствует развитию нервной и костной систем [29, 30].

Сигнальный путь FGFR активизирован в ЗНО различного происхождения и локализации: дыхательная система, молочная железа, мочевыделительная система, ЖКТ, костная ткань, печень и желчевыводящие пути и др. [23–25, 31–33]. Активация FGFR-сигналинга может быть следствием амплификации гена *FGFR1–4*, что обусловливает гиперэкспрессию соответствующих рецепторов. В результате в опухолевых клетках возникает неконтролируемая активация сигнальных белков (AKT, STAT, MAPK), способствующих их пролиферации [34–36]. В некоторых случаях активация сигнального пути FGFR в опухолевых клетках развивается за счет активирующих мутаций в *FGFR1–4* [37–39].

В табл. 1 представлена частота встречаемости гиперэкспрессии FGFR1–4 в различных ЗНО. Следует отметить, что гиперэкспрессия FGFR1 в опухолевых

Таблица 1. *Частота встречаемости гиперэкспрессии рецепторов факторов роста фибробластов 1–4-го типов (FGFR1–4) в злокачественных новообразованиях*

Table 1. *Incidence of fibroblast growth factor types 1–4 (FGFR1–4) hyperexpression in malignant neoplasms*

Рецептор Receptor	Опухоль Tumor	Число случаев, % Number of cases, %	Источник Source
FGFR1	Плоскоклеточный рак легкого Squamous cell carcinoma of the lung	5,1–41	[25, 34–38, 40]
	Аденокарцинома легкого Adenocarcinoma of the lung	1–14	
	Мелкоклеточный рак легкого Small cell lung cancer	1–8	
	Миксофибросаркома Myxofibrosarcoma	18–20	
	Остеосаркома Osteosarcoma	7–9	
	Рабдомиосаркома Rhabdomyosarcoma	2–3	
	Недифференцированная плеоморфная саркома Undifferentiated pleiomorphic sarcoma	5–7	
	Гормонозависимый рак молочной железы Hormone-dependent breast cancer	13–15	
	Трижды негативный рак молочной железы Triple negative breast cancer	3–5	
	Плоскоклеточный рак головы и шеи Head and neck squamous cell carcinoma	9 – 17	
	Рак предстательной железы Prostate cancer	14–16	
	Рак яичников Ovarian cancer	3–5	
	Рак мочевого пузыря Bladder cancer	0,5–2	
	Рак пищевода Esophageal cancer	6–9	
	Рак желудка Stomach cancer	1–2	
	Колоректальный рак Colorectal cancer	4–6	
	Рак поджелудочной железы Pancreatic cancer	0,5–1	
FGFR2	Рак желудка Stomach cancer	5–10	[41–43]
	Внутрипеченочная холангиокарцинома Intrahepatic cholangiocarcinoma	10–12	
	Рак молочной железы Breast cancer	1–2	
FGFR3	Плоскоклеточный рак головы и шеи Head and neck squamous cell carcinoma	1–3	[35, 44, 45]
	Плоскоклеточный рак полости рта Oral squamous cell carcinoma	46–48	
	Плоскоклеточный рак ротоглотки Oropharyngeal squamous cell carcinoma	56–59	
	Олигометастатический колоректальный рак Oligometastatic colorectal cancer	13–15	
	Уротелиальный рак Urothelial cancer	2–3	
FGFR4	Холангиокарцинома Cholangiocarcinoma	48–50	[34, 46, 47]
	Рак печени Liver cancer	29–32	

клетках отмечается гораздо чаще, чем гиперэкспрессия FGFR2–4.

Сигнальный путь FGFR может быть активирован в опухолевых клетках вследствие аутокринной продукции FGF-лигандов. Кроме того, возможна паракринная продукция FGF-лигандов клетками микроокружения опухоли (фибробластами, макрофагами, эндотелиальными клетками и др.) [37, 38]. В качестве примера можно привести усиленную продукцию FGF-2 при таких ЗНО, как почечно-клеточная карцинома, рак молочной железы, легкого, острые и хронические лейкозы. У пациентов со злокачественной опухолью предстательной железы в плазме крови отмечается повышенный уровень FGF-8. Для клеток гепатоцеллюлярной карциномы характерна гиперэкспрессия FGF-19 [34, 48, 49].

Активация FGFR-сигналинга в опухолевых клетках, как правило, указывает на прогрессирование заболевания. Продемонстрировано, что лиганд FGF-2 способен активировать миграционную активность опухолевых клеток, приводящую к инвазивному росту опухоли и развитию метастазирования [50, 51]. В частности, контактное взаимодействие FGF-2 с мембраной клеток колоректального рака усиливало их миграцию, поскольку способствовало повышению экспресии молекул адгезии $\alpha v\beta 5$ интегринов [52]. В клетках рака молочной железы лиганд FGF-2 активизировал аутокринную продукцию фактора роста соединительной ткани (CTGF), который усиливал инвазивный рост опухоли, а также миграцию опухолевых клеток с развитием метастазов [51].

Продемонстрировано, что FGFR-сигнальный путь играет большую роль в механизмах резистентности опухолевых клеток к таргетным и химиопрепаратам. Например, за счет активации FGFR-сигналинга снижается чувствительность клеток немелкоклеточного рака легкого к таргетному препарату гефитинибу – ингибитору рецепторов эпидермального фактора роста (epidermal growth factor, EGF) [53, 54]. В клетках немелкоклеточного рака легкого под воздействием гефитиниба активизируется аутокринная продукция лиганда FGF-2, которая способствует формированию альтернативного механизма пролиферации опухолевых клеток, обусловленного активностью FGFR-сигнального пути. В результате цитотоксический и антипролиферативный эффекты гефитиниба в отношении клеток немелкоклеточного рака легкого резко снижаются [54].

Показано, что в присутствии лиганда FGF-2 *in vitro* отмечается снижение чувствительности клеток аденокарциномы предстательной железы к химиопрепаратам – паклитакселу, доксорубицину и 5-фторурацилу. Напротив, при добавлении в культуральную среду моноклональных IgG-антител (IgG – иммуноглобулины G), нейтрализующих FGF-2, чувствительность опухолевых клеток предстательной железы к химиопрепаратам восстанавливается [54]. Аналогичным образом высокая экспрессия FGF-2 в клетках хронического лимфолейкоза способствует их резистентности к химиопрепаратам, быстрому развитию метастазов и неблагоприятному прогнозу [55]. У пациентов с неоперабельной и метастатической формой почечно-клеточной карциномы отмечалось резкое увеличение концентрации FGF-2 в плазме крови [56]. Таким образом, повышенный уровень FGF-2 в плазме больных различными ЗНО (лейкозы, лимфомы, рак молочной железы, легкого, колоректальный рак и др.) является признаком прогрессирования заболевания и высокого риска развития метастазов [34, 57, 58].

АКТИВАЦИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ РЕЦЕПТОРОВ ФАКТОРОВ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Факторы роста эндотелия сосудов представляют собой семейство гликопротеинов, состоящее из 6 основных представителей: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и VEGF-F. У плода обнаруживается активность 7-го представителя данного семейства – плацентарного фактора роста (placental growth factor, PLGF) [59, 60]. Наибольшим количеством биологических эффектов обладает белок VEGF-A, являющийся лигандом рецепторов 1-го и 2-го типов (VEGFR1–2), которые экспрессируются на различных клетках организма человека – эндотелиальных клетках кровеносных и лимфатических сосудов, гемопоэтических стволовых клетках, моноцитах, макрофагах и нейронах [59, 60]. От VEGFR1–2 сигнал передается на внутриклеточные белки, участвующие в активации сигнальных путей RAS-RAF-MAPK и PI3K-AKT-mTOR, за счет которых возникают пролиферация и дифференцировка клеток [61, 62]. Наибольшую роль в реализации эффектов VEGF-A играет его рецептор 2-го типа (VEGFR2). В литературе описан также рецептор 3-го типа (VEGFR3), экспрессия которого представлена главным образом на эндотелии лимфатических сосудов. С этим рецептором связываются преимущественно VEGF-C и VEGF-D, которые обеспечивают развитие лимфоангиогенеза [60, 63].

Фактор роста эндотелия сосудов А является ключевым фактором для развития ангиогенеза в организме человека: он участвует в формировании кровеносных и лимфатических сосудов в эмбриональном периоде, усиливает пролиферацию и дифференцировку эндотелиальных клеток с целью ангиогенеза в процессе регенерации тканей после травматического повреждения, стимулирует ангиогенез в скелетных мышцах вследствие их гипертрофии, вызванной физическими нагрузками. Концентрация VEGF-A в плазме крови также увеличивается при развитии генерализованной гипоксии, возникающей вследствие хронических воспалительных заболеваний дыхательной системы (бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких), хронической сердечной недостаточности (последствия артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца), эндокринной патологии (сахарный диабет) [61, 62, 64].

Активация VEGFR-сигнального пути отмечается при развитии большинства ЗНО человека. Опухолевые клетки способны продуцировать VEGF-A, кроме того, указанный лиганд вырабатывается клетками микроокружения опухоли, например макрофагами M2-фенотипа и фибробластами [24, 65, 66]. Последующая активация VEGFR-сигналинга в эндотелиальных клетках способствует ангиогенезу для обеспечения пластических процессов в опухолевой ткани. Важно отметить, что этот сигнальный путь может быть активирован непосредственно в опухолевых клетках за счет аутокринной продукции VEGF-A и гиперэкспрессии VEGFR1–2. В результате активизируется дополнительный механизм пролиферации, который может играть большую роль в поддержании жизнеспособности опухолевых клеток, их лекарственной резистентности и формировании метастазов [67–69].

Повышение в сыворотке концентрации VEGF-A является неблагоприятным прогностическим признаком, указывающим на прогрессирование заболевания [68, 70, 71]. Высокий уровень VEGF-A, обнаруживаемый в плазме больных с ГИСО на фоне терапии ИМ, является маркером приобретенной резистентности опухолевых клеток к указанному препарату [72, 73]. В процессе канцерогенеза белок VEGF-A, вырабатываемый опухолевыми клетками, а также клетками их микроокружения (макрофагами M2-фенотипа, фибробластами), способствует росту опухоли за счет ингибирования функций дендритных клеток и цитотоксических $CD8^{+}$T-лимфоцитов, т. е. путем блокировки противоопухолевого иммунного ответа [24, 71].

СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ РЕЦЕПТОРОВ ФАКТОРОВ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И РЕЦЕПТОРОВ ФАКТОРОВ РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Следует отметить, что при развитии ЗНО возможна одновременная активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в опухолевых клетках, что указывает на наличие между ними структурно-функциональной взаимосвязи [34]. Например, в клетках рака молочной железы лиганд FGF-2, связываясь с FGFR1, усиливал продукцию VEGF-A и повышал экспрессию VEGFR1 [74]. Кроме того, показано, что FGF-2, связываясь с внутриклеточными белками ERK1 и ERK2, являющимися компонентами MAPK-каскада, увеличивал экспрессию VEGFR2 на мембране эндотелиальных клеток кровеносных сосудов и клетках меланомы [75]. Продемонстрировано, что за счет аутокринной продукции опухолевыми клетками FGF-2 и VEGF-A в опухолевой ткани усиливается рост новых сосудов. Добавление к опухолевой ткани моноклональных IgG-антител, нейтрализующих VEGF-A, подавляет развитие ангиогенеза [76]. Показано, что FGF-2, секретируемый эндотелиальными клетками и перицитами, играет большую роль в поддержании роста сосудов, питающих опухоль, и способствует развитию ее резистентности к ингибиторам VEGFR-сигналинга [77]. За счет аутокринной продукции FGF-2 и VEGF-A опухолевыми клетками в ткани создается специфическое микроокружение, которое препятствует формированию противоопухолевого иммунного ответа. В частности, происходит накопление макрофагов преимущественно M2-фенотипа, а также опухолеассоциированных фибробластов, которые, выделяя цитокины (интерлейкин 10, трансформирующий фактор роста β и др.), подавляют активность дендритных клеток, цитотоксических $CD8^{+}$T-лимфоцитов, макрофагов M1-фенотипа и NK-клеток (NK – естественные киллеры) [78–80]. При ингибировании FGFR- и VEGFR-сигнальных путей резко усиливается противоопухолевый иммунный ответ в отношении клеток гепатоцеллюлярной карциномы [23, 81]. Взаимосвязь FGFR- и VEGFR-сигнальных путей реализуется с участием нескольких механизмов. Обнаружено, что адаптерный белок FGFR-сигнального пути FRS-2 индуцировал в эндотелиальных клетках кровеносных и лимфатических сосудов продукцию факторов роста эндотелия сосудов (VEGF-A и VEGF-C). Кроме того, белок FRS-2 способен стимулировать активацию внутриклеточного белка GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2), который является компонентом различных сигнальных путей, в том числе VEGFR-сигналинга. В экспериментах на крысах установлено, что нокдаун гена *FRS-2* в эндотелиальных клетках индуцировал нарушение секреции VEGF-A с последующим угнетением эмбрионального ангиогенеза [81].

ЗНАЧЕНИЕ АКТИВАЦИИ СИГНАЛИНГА РЕЦЕПТОРОВ ФАКТОРОВ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И РЕЦЕПТОРОВ ФАКТОРОВ РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ ДЛЯ РАЗВИТИЯ ВТОРИЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ К ТАРГЕТНЫМ ПРЕПАРАТАМ

В ИМ-резистентных клетках ГИСО обнаружена активация FGFR-сигнального пути. В частности, результаты исследования F. Li и соавт. демонстрируют, что в этих клетках отмечаются аутокринная продукция лиганда FGF-2 и гиперэкспрессия FGFR1 [82]. В работе N. Javidi-Sharifi и соавт. показано, что в ИМ-резистентных клетках ГИСО аутокринная продукция лиганда FGF-2 сопровождается гиперэкспрессией FGFR3 [83].

Мы обнаружили, что приобретенная резистентность клеток ГИСО к таргетному препарату ИМ, не связанная с возникновением вторичных мутаций в гене *KIT*, обусловлена активацией FGFR- и VEGFR-сигнальных путей. В ИМ-резистентных клетках ГИСО отмечались аутокринная продукция FGF-2 и VEGF-A, гиперэкспрессия FGFR1-2 и VEGFR1-2, а также FGRS-2 [84–87]. Активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в ИМ-резистентных клетках ГИСО сопровождалась уменьшением активности KIT-сигнального пути, что свидетельствует об изменении киназо-опосредованного сигналинга, участвующего в механизмах жизнеспособности и пролиферации опухолевых клеток. За счет развития альтернативного механизма пролиферации клеток ГИСО, обусловленного активацией FGFR- и VEGFR-сигнальных путей, снижалась их чувствительность к таргетным препаратам 2-й и 3-й линий (сунитинибу, регорафенибу). Аутокринная активация FGFR-сигналинга в ИМ-резистентных клетках ГИСО способствовала формированию взаимодействия между рецепторами c-KIT и FGFR1–2 на структурном и функциональном уровнях (колокализация рецепторов и их коиммунопреципитация). В результате комбинация ИМ с селективными ингибиторами FGFR-сигналинга (BGJ398, AZD4547, TAS-120) индуцировала гибель ИМ-резистентных клеток ГИСО по механизму апоптоза [86–88].

В процессе изучения механизмов резистентности ГИСО к таргетным препаратам было обнаружено, что ИМ-резистентные клетки представляют собой гетерогенную популяцию, состоящую из клонов с различным уровнем экспрессии тирозинкиназного рецептора c-KIT. В ИМ-резистентных *KIT*-отрицательных клетках ГИСО отмечались признаки активации FGFR-сигнального пути, что способствовало их повышенной чувствительности к ингибиторам FGFR-сигналинга (BGJ398, AZD4547, TAS-120) [89].

Важно отметить, что активация VEGFR-сигналинга в ИМ-резистентных клетках ГИСО, по мнению авторов, была следствием активации FGFR-сигнального пути. Данный вывод основан на обнаружении способности лиганда FGF-2 индуцировать продукцию VEGF-A клетками ГИСО, а также на способности селективного ингибитора FGFR1–4 (BGJ398) индуцировать снижение экспрессии маркеров не только FGFR-, но и VEGFR-сигналинга в ИМ-резистентных клетках ГИСО [86]. Следствием аутокринного механизма активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей явилось структурное и функциональное взаимодействие рецепторов FGFR1-2 и VEGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО (колокализация рецепторов и их коиммунопреципитация). Поэтому комбинированное применение селективного ингибитора FGFR1–4 (BGJ398) и ингибитора VEGFR-сигналинга (сунитиниба, регорафениба) оказывало выраженный синергетический эффект в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО [86, 87].

Таким образом, развитие активации FGFR- и VEGFR-сигналинга в клетках ГИСО обусловлено ингибирующим эффектом таргетного препарата ИМ в отношении KIT-сигнального пути (рис. 1).

На основании результатов нашего исследования можно сделать вывод о целесообразности комбинированного использования ИМ с ингибиторами FGFR-сигналинга, а также комбинаций ингибиторов FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в качестве потен-

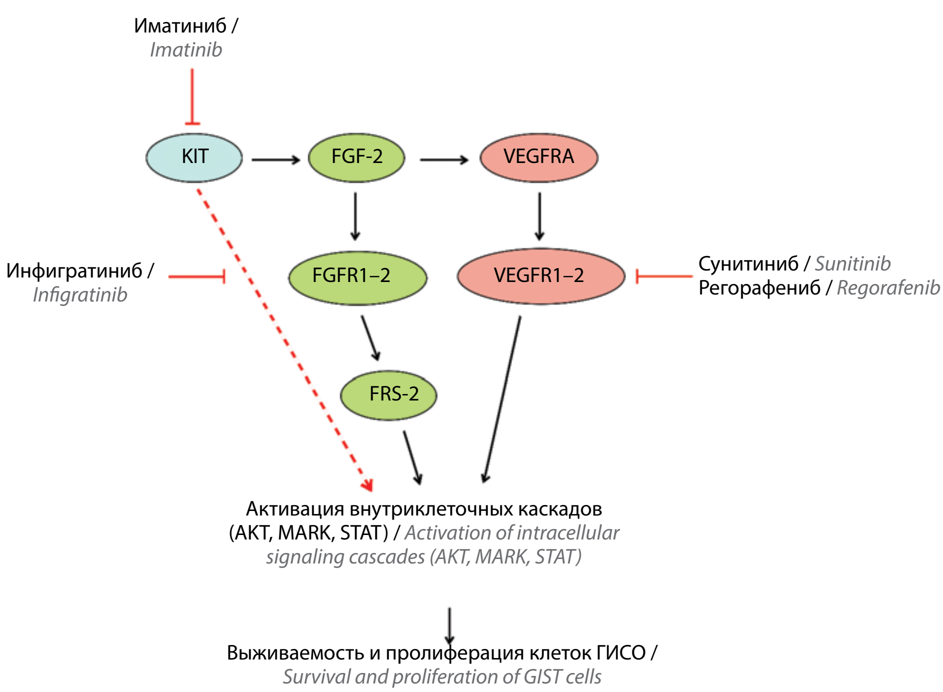


Рис. 1. *Механизмы активации сигнальных путей рецепторов факторов роста эндотелия сосудов (VEGFR) и рецепторов факторов роста фибробластов (FGFR) в клетках гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) без вторичных мутаций в гене KIT. FGF – рецепторы факторов роста фибробластов; VEGF – факторы роста эндотелия сосудов*

Fig. 1. *Mechanisms of activation of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and fibroblast growth factor receptor (FGFR) signaling pathways in gastrointestinal stromal tumor (GIST) cells without secondary mutations in the KIT gene. FGF – fibroblast growth factors; VEGF – vascular endothelial growth factors*

циальных новых схем таргетной терапии ИМ-резистентных ГИСО.

Представленные данные согласуются с результатами доклинических и клинических исследований, направленных на изучение роли ингибиторов FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в качестве 2-й и 3-й линий таргетной терапии ИМ-резистентных ГИСО. Например, в ходе клинического исследования NCT02257541 (I и II фаз) выявлено, что комбинация ИМ и инфигратиниба (селективный ингибитор FGFR1–4) способствовала стабилизации клинической картины ГИСО на срок более 32 нед у 25 % больных с метастатической формой заболевания [90]. Кабозантиниб – мультикиназный ингибитор, блокирующий в том числе KIT- и VEGFR-сигнальные пути, показал свою эффективность в отношении диссеминированных ГИСО, резистентных к ИМ и сунитинибу (клиническое исследование NCT02216578, I и II фазы). У 60 % пациентов через 12 нед терапии кабозантинибом отмечалась стабилизация клинической картины ГИСО, а медиана выживаемости без прогрессирования составила 5,5 мес [91]. Продемонстрировано, что апатиниб – ингибитор c-KIT, RET, c-Src и VEGFR2 – способствует стабилизации клинической картины метастатической формы ГИСО, резистентной к ИМ и сунитинибу, на срок более 7 мес [92]. Кроме того, у пациента с нерезектабельной ИМ-резистентной ГИСО желудка, сочетающейся с аденокарциномой желудка, на фоне терапии апатинибом медиана выживаемости без прогрессирования составила 10 мес [93]. В настоящее время апатиниб проходит клинические испытания I фазы (NCT05751733) в качестве потенциального таргетного препарата 2-й линии терапии ИМ-резистентных ГИСО [94]. В 2008 г. начато клиническое исследование эффективности комбинации ИМ и бевацизумаба (моноклональные IgG-антитела, нейтрализующие VEGF-A) в отношении неоперабельных и метастатических форм ГИСО (NCT00324987, I фаза). К сожалению, несмотря на оригинальную концепцию исследования, данный проект был закрыт через 1 год в связи с отсутствием достаточного количества пациентов с ГИСО (обследованы только 12 больных из 178 предполагаемых) [95]. В литературе отсутствуют данные о клинических испытаниях комбинации ИМ с препаратами на основе моноклональных антител, нейтрализующих FGF-лиганды и их рецепторы, в отношении ИМ-резистентных ГИСО. Тем не менее проведены клинические испытания I фазы (NCT01363024) эффективности анти-FGFR3-моноклональных IgG-антител (препарат MGFR1877S) при поздних стадиях различных солидных опухолей. Под влиянием препарата MGFR1877S отмечалась стабилизация клинической картины у 5 из 10 пациентов с нерезектабельной уротелиальной карциномой [96, 97]. Кроме того, проводятся клинические испытания II фазы (NCT03694522) эффективности бемаритузумаба, представляющего собой моноклональные IgG-антитела, блокирующие FGFR2, при гастроэзофагеальной аденокарциноме [98].

В настоящее время активно изучаются препараты, способные одновременно ингибировать FGFR- и VEGFR-сигнальные пути. В частности, P. Schöffski и соавт. на ксенографтных моделях ГИСО продемонстрировали, что препарат довитиниб – ингибитор KIT-, FGFR- и VEGFR-сигнальных путей – оказывал *in vitro* более выраженное цитотоксическое действие, чем ИМ [99]. Результаты клинических исследований I фазы (NCT02268435) свидетельствуют о синергетическом и аддитивном эффектах довитиниба и ИМ в отношении нерезектабельных ГИСО, резистентных к ИМ, сунитинибу и регорафенибу [100]. Анлотиниб (AL3818), являющийся ингибитором рецепторных тирозинкиназ c-KIT, PDGFRα, FGFR1–4 и VEGFR1–3, был одобрен в качестве кандидата для клинических испытаний с целью разработки новых стратегий терапии ИМ-резистентных ГИСО [101, 102]. Ленватиниб – ингибитор KIT-, PDGFR-, FGFR- и VEGFR-сигнальных путей – проходит клинические испытания фазы II (NCT04193553) в качестве препарата таргетной терапии пациентов с ГИСО, резистентных к ИМ и сунитинибу [104]. Сведения о применении ингибиторов FGFR- и VEGFR-сигнальных путей при диссеминированных формах ГИСО представлены в табл. 2.

Таблица 2. *Использование ингибиторов сигнальных путей рецепторов факторов роста эндотелия сосудов (VEGFR) и рецепторов факторов роста фибробластов (FGFR) для терапии диссеминированных форм гастроинтестинальных стромальных опухолей*

Table 2. *Use of inhibitors of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and fibroblast growth factor receptor (FGFR) signaling pathways for therapy of disseminated forms of gastrointestinal stromal tumors*

Препарат Drug	Мишень Target	Стадия разработки Development stage	Источник Source
Сунитиниб Sunitinib	c-KIT, PDGFRβ, FLT-3, CSF-1R, RET, **VEGFR1–3**	Применяется в клинической практике Used in clinical practice	[17, 18]
Регорафениб Regorafenib	c-KIT, PDGFRβ, RET, RAF-1, **VEGFR1–3**	Применяется в клинической практике Used in clinical practice	[16–18]

Окончание табл. 2
End of table 2

Препарат Drug	Мишень Target	Стадия разработки Development stage	Источник Source
Инфигратиниб (BGJ398) Infigratinib (BGJ398)	**FGFR1-4**	Клинические испытания II фазы (комбинация с иматинибом) Phase II clinical trials (combination with imatinib)	[90]
Кабозантиниб (XL184) Cabozantinib (XL184)	c-KIT, c-Met, Axl, RET, FLT1/3/4, Tie2, **VEGFR2**	Клинические испытания II фазы Phase II clinical trials	[91]
Апатиниб (YN968D1) Apatinib (YN968D1)	c-KIT, RET, c-Src, **VEGFR2**	Клинические испытания I фазы Phase I clinical trials	[94]
Бевацизумаб (rhuMab VEGF) Bevacizumab (rhuMab VEGF)	**VEGF-A**	Клинические испытания I фазы (комбинация с иматинибом) Phase I clinical trials (combination with imatinib)	[95]
Довитиниб (TKI-258) Dovitinib (TKI-258)	c-KIT, PDGFRβ, FLT3, CSF-1R, **FGFR1/3**, **VEGFR1-3**	Клинические испытания I фазы (комбинация с иматинибом) Phase I clinical trials (combination with imatinib)	[100]
Ленватиниб (E7080) Lenvatinib (E7080)	c-KIT, PDGFRα/β, RET, **FGFR1-4**, **VEGFR1-3**	Клинические испытания II фазы Phase II clinical trials	[103]

Примечание. *Жирным шрифтом выделены мишени, относящиеся к FGFR- и VEGFR-сигналингу.*
Note. *Targets associated with FGFR and VEGFR signaling are shown in bold.*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей является важным механизмом, обеспечивающим пролиферацию опухолевых клеток и их резистентность к таргетной и химиотерапии. Развитие приобретенной резистентности ГИСО к таргетному препарату ИМ, не связанной с возникновением вторичных мутаций в гене *KIT*, может быть обусловлено активацией указанных сигнальных путей. На фоне терапии ИМ при ухудшении общего состояния пациентов с диссеминированной формой ГИСО целесообразно исследовать концентрации FGF-2- и VEGF-A-лигандов в плазме крови, а также в образцах опухолевой ткани. Высокие уровни лигандов FGF-2 и VEGF-A в первичных ГИСО будут являться предпосылкой для проведения повторного молекулярно-генетического исследования опухолевого материала с целью последующей коррекции таргетной терапии.

Наличие в образцах ГИСО повышенной экспрессии FGFR1–2 и адаптерного белка FRS-2 указывает на возможную активацию VEGFR-сигнального пути в опухолевых клетках и может быть основанием для последующего назначения препаратов 2-й и 3-й линий таргетной терапии – сунитиниба и регорафениба (ингибиторы VEGFR-сигналинга). Для таргетной терапии ИМ-резистентных ГИСО без вторичных мутаций в гене *KIT* и активацией FGFR-сигнального пути перспективным является использование комбинации ИМ с селективными ингибиторами FGFR1–4 (инфигратиниб).

Таким образом, изучение клинической эффективности ингибиторов FGFR- и VEGFR-сигнальных путей является актуальным направлением научных исследований, способствующих разработке новых схем таргетной терапии для пациентов с нерезектабельными, метастатическими и рецидивирующими формами ГИСО.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Jakhetiya A., Garg P.K., Prakash G. et al. Targeted therapy of gastrointestinal stromal tumours. World J Gastrointest Surg 2016;8(5):345–52. DOI: 10.4240/wjgs.v8.i5.345
2. Hirota S., Isozaki K., Moriyama Y. et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. Science 1998;279(5350):577–80. DOI: 10.1126/science.279.5350.577
3. Sakurai S., Fukasawa T., Chong J.M. et al. C-kit gene abnormalities in gastrointestinal stromal tumors (tumors of interstitial cells of Cajal). Jpn J Cancer Res 1999;90(12):1321–8. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1999.tb00715.x
4. Fu X., Wang X., Xiong J. et al. Surgical strategies for duodenal gastrointestinal stromal tumors. Langenbecks Arch Surg 2022;407(2):835–44. DOI: 10.1007/s00423-022-02460-5.
5. Королева А.М., Когония Л.М. Вторая линия терапии гастроинтестинальных стромальных опухолей: ожидает ли нас выбор? Медицинский совет 2019;10:28–36. DOI: 10.21518/2079-701X-2019-10-28-36
Koroleva A.M., Kogonia L.M. Second line of therapy for gastrointestinal stromal tumors: is there a choice? Meditsinskiy sovet = Medical Council 2019;10:28–36. (In Russ.). DOI: 10.21518/2079-701X-2019-10-28-36
6. Schaefer I.M., DeMatteo R.P., Serrano C. The GIST of advances in treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor. Am Soc Clin Oncol Educ Book 2022;42:1–15. DOI: 10.1200/EDBK_351231
7. Corless C.L., Heinrich M.C. Molecular pathobiology of gastrointestinal stromal sarcomas. Annu Rev Pathol 2008;3:557–86. DOI: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151538
8. Martín-Broto J., Rubio L., Alemany R. et al. Clinical implications of KIT and PDGFRA genotyping in GIST. Clin Transl Oncol 2010;12(10):670–6. DOI: 10.1007/s12094-010-0576-7
9. Li J., Guo S., Sun Z. et al. Noncoding RNAs in drug resistance of gastrointestinal stromal tumor. Front Cell Dev Biol 2022;10:808591. DOI: 10.3389/fcell.2022.808591
10. Liu P., Tan F., Liu H. et al. The use of molecular subtypes for precision therapy of recurrent and metastatic gastrointestinal stromal tumor. Onco Targets Ther 2020;13:2433–47. DOI: 10.2147/OTT.S241331
11. Югай В.В., Никулин М.Р., Козлов Н.А. и др. Клинико-морфологические характеристики пациентов с гастроинтестинальной стромальной опухолью с дефицитом сукцинатдегидрогеназы. Вопросы онкологии 2022;68(5):614–21. DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-5-614-621
Yugai V.V., Nikulin M.R., Kozlov N.A. et al. Clinical and morphological characteristics of patients of gastrointestinal stromal tumor with deficiency of succinate dehydrogenase. Voprosy Onkologii = Oncology issues 2022;68(5):614–21. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-5-614-621
12. Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В. Молекулярно-генетические особенности и маркеры гастроинтестинальных стромальных опухолей. Успехи молекулярной онкологии 2015;2(2):29–40. DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.2.29-40
Mazurenko N.N., Tsyganova I.M. Molecular features and genetic markers of gastrointestinal stromal tumors. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2015;2(2):29–40. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.2.29-40
13. Ibrahim A., Montgomery E.A. Gastrointestinal stromal tumors: variants and some pitfalls that they create. Adv Anat Pathol 2024;31(6):354–63. DOI: 10.1097/PAP.0000000000000463
14. Gramza A.W., Corless C.L., Heinrich M.C. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors. Clin Cancer Res 2009;15(24):7510–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0190
15. Zhou S., Abdihamid O., Tan F. et al. KIT mutations and expression: current knowledge and new insights for overcoming IM resistance in GIST. Cell Commun Signal 2024;22(1):153. DOI: 10.1186/s12964-023-01411-x
16. Boichuk S., Rausch J., Duensing A. New developments in management of gastrointestinal stromal tumors: regorafenib, the new player in the team. Gastrointestinal Cancer Targets Ther 2014;4:1–10. DOI: 10.2147/GICTT.S20679
17. Blay J.Y., Kang Y.K., Nishida T. et al. Gastrointestinal stromal tumours. Nat Rev Dis Primers 2021;7(1):22. DOI: 10.1038/s41572-021-00254-5
18. Kelly C.M., Gutierrez Sainz L., Chi P. The management of metastatic GIST: current standard and investigational therapeutics. J Hematol Oncol 2021;14(1):2. DOI: 10.1186/s13045-020-01026-6
19. Clinical trials NCT03673501 – a study of ripretinib vs sunitinib in advanced gist patients after treatment with imatinib (INTRIGUE). Available at: https://clinicaltrials.gov/study/NCT03673501
20. Strauss G., George S. Gastrointestinal stromal tumors. Curr Oncol Rep 2025;27(3):312–21. DOI: 10.1007/s11912-025-01636-8
21. Takahashi T., Serada S., Ako M. et al. New findings of kinase switching in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic analysis. Int J Cancer 2013;133(11):2737–43. DOI: 10.1002/ijc.28282
22. Fu J., Su X., Li Z. et al. HGF/c-MET pathway in cancer: from molecular characterization to clinical evidence. Oncogene 2021;40(28):4625–51. DOI: 10.1038/s41388-021-01863-w
23. Peng M., Li H., Cao H. et al. Dual FGFR and VEGFR inhibition synergistically restrain hexokinase 2-dependent lymphangiogenesis and immune escape in intrahepatic cholangiocarcinoma. J Gastroenterol 2023;58(9):908–24. DOI: 10.1007/s00535-023-02012-8
24. Fukumura D., Kloepper J., Amoozgar Z. et al. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. Nat Rev Clin Oncol 2018;15(5):325–40. DOI: 10.1038/nrclinonc.2018.29
25. Miao J.L., Zhou J.H., Cai J.J. et al. The association between fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification and lung cancer: a meta-analysis. Arch Med Sci 2019;16(1):16–26. DOI: 10.5114/aoms.2020.91284
26. Pecqueux C., Arslan A., Heller M. et al. FGF-2 is a driving force for chromosomal instability and a stromal factor associated with adverse clinico-pathological features in prostate cancer. Urol Oncol 2018;36(8):365.e15–365.e26. DOI: 10.1016/j.urolonc.2018.05.020
27. Clark J.F., Soriano P. FRS2-independent GRB2 interaction with FGFR2 is not required for embryonic development. Biol Open 2023;12(7):bio059942. DOI: 10.1242/bio.059942
28. Xie Y., Su N., Yang J. et al. FGF/FGFR signaling in health and disease. Signal Transduct Target Ther 2020;5(1):181. DOI: 10.1038/s41392-020-00222-7
29. Gędaj A., Gregorczyk P., Żukowska D. et al. Glycosylation of FGF/FGFR: an underrated sweet code regulating cellular signaling programs. Cytokine Growth Factor Rev 2024;77:39–55. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2024.04.001
30. Ornitz D.M., Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 2015;4(3):215–66. DOI: 10.1002/wdev.176
31. Katoh M., Nakagama H. FGF receptors: cancer biology and therapeutics. Med Res Rev 2014;34(2):280–300. DOI: 10.1002/med.21288
32. Helsten T., Elkin S., Arthur E. et al. The FGFR landscape in cancer: analysis of 4,853 tumors by next-generation sequencing. Clin Cancer Res 2016;22(1):259–67. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3212
33. Zhang P., Yue L., Leng Q. et al. Targeting FGFR for cancer therapy. J Hematol Oncol 2024;17(1):39. DOI: 10.1186/s13045-024-01558-1
34. Федянин М.Ю., Хмелькова Д.Н., Серебрийская Т.С. и др. Перспективы терапевтического воздействия на сигнальный путь FGFR. Успехи молекулярной онкологии 2015;2(1):27–38. DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.027-038
Fedyanin M.Yu., Khmelkova D.N., Serebriyskaya T.S. et al. Prospects of therapeutic action on FGFR signaling pathway.

Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2015;2(1):27–38. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.027-038

35. Федянин М.Ю., Хмелькова Д.Н., Серебрийская Т.С. и др. Рецепторы фактора роста фибробластов при злокачественных опухолях. Злокачественные опухоли 2014;(4):19–34. DOI: 10.18027/2224-5057-2014-4-19-34
Fedyanin M.Yu., Hmel'kova D.N., Serebriyskaya T.S. et al. Fibroblast growth factor receptors in malignant tumors. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumours 2014;(4):19–34. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2014-4-19-34

36. De Luca A., Esposito Abate R., Rachiglio A.M. et al. FGFR fusions in cancer: from diagnostic approaches to therapeutic intervention. Int J Mol Sci 2020;21(18):6856. DOI: 10.3390/ijms21186856

37. Liu G., Chen T., Ding Z. et al. Inhibition of FGF-FGFR and VEGF-VEGFR signalling in cancer treatment. Cell Prolif 2021;54(4):e13009. DOI: 10.1111/cpr.13009

38. Wang Z., Anderson K.S. Therapeutic targeting of FGFR signaling in head and neck cancer. Cancer J 2022;28(5):354–62. DOI: 10.1097/PPO.0000000000000615

39. Chudasama P., Renner M., Straub M. et al. Targeting fibroblast growth factor receptor 1 for treatment of soft-tissue sarcoma. Clin Cancer Res 2017;23(4):962–73. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0860

40. Kawamata F., Patch A.M., Nones K. et al. Copy number profiles of paired primary and metastatic colorectal cancers. Oncotarget 2017;9(3):3394–405. DOI: 10.18632/oncotarget.23277

41. Turner N., Lambros M.B., Horlings H.M. et al. Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. Oncogene 2010;29(14):2013–23. DOI: 10.1038/onc.2009.489

42. Catenacci D.V., Tesfaye A., Tejani M. et al. Bemarituzumab with modified FOLFOX6 for advanced FGFR2-positive gastroesophageal cancer: FIGHT phase III study design. Future Oncol 2019;15(18):2073–82. DOI: 10.2217/fon-2019-0141

43. Facchinetti F., Loriot Y., Brayé F. et al. Understanding and overcoming resistance to selective FGFR inhibitors across FGFR2-driven malignancies. Clin Cancer Res 2024;30(21): 4943–56. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-24-1834

44. Koole K., van Kempen P.M., Swartz J.E. et al. Fibroblast growth factor receptor 3 protein is overexpressed in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Cancer Med 2016;5(2):275–84. DOI: 10.1002/cam4.595

45. Fromme J.E., Schmitz K., Wachter A. et al. FGFR3 mRNA overexpression defines a subset of oligometastatic colorectal cancers with worse prognosis. Oncotarget 2018;9(63):32204–18. DOI: 10.18632/oncotarget.25941

46. Mahipal A., Tella S.H., Kommalapati A. et al. FGFR2 genomic aberrations: achilles heel in the management of advanced cholangiocarcinoma. Cancer Treat Rev 2019;78:1–7. DOI: 10.1016/j.ctrv.2019.06.003

47. Ho H.K., Pok S., Streit S. et al. Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation, anti-apoptosis and alpha-fetoprotein secretion during hepatocellular carcinoma progression and represents a potential target for therapeutic intervention. J Hepatol 2009;50(1):118–27. DOI: 10.1016/j.jhep.2008.08.015

48. Li X., Wang C., Xiao J. et al. Fibroblast growth factors, old kids on the new block. Semin Cell Dev Biol 2016;53:155–67. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.12.014

49. Korc M., Friesel R.E. The role of fibroblast growth factors in tumor growth. Curr Cancer Drug Targets 2009;9(5):639–51. DOI: 10.2174/156800909789057006

50. Wang K., Ji W., Yu Y. et al. FGFR1-ERK1/2-SOX2 axis promotes cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis in FGFR1-amplified lung cancer. Oncogene 2018;37(39):5340–54. DOI: 10.1038/s41388-018-0311-3

51. Santolla M.F., Vivacqua A., Lappano R. et al. GPER mediates a feedforward FGF2/FGFR1 paracrine activation coupling CAFs to cancer cells toward breast tumor progression. Cells 2019;8(3):223. DOI: 10.3390/cells8030223

52. Knuchel S., Anderle P., Werfelli P. et al. Fibroblast surface-associated FGF-2 promotes contact-dependent colorectal cancer cell migration and invasion through FGFR-SRC signaling and integrin αvβ5-mediated adhesion. Oncotarget 2015;6(16):14300–17. DOI: 10.18632/oncotarget.3883

53. Song S., Wientjes M.G., Gan Y. et al. Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97(15):8658–63. DOI: 10.1073/pnas.140210697

54. Liu D., Liu H., Gan J. et al. LY2874455 and abemaciclib reverse FGF3/4/19/CCND1 amplification mediated gefitinib resistance in NSCLC. Front Pharmacol 2022;13:918317. DOI: 10.3389/fphar.2022.918317

55. Menzel T., Rahman Z., Calleja E. et al. Elevated intracellular level of basic fibroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to fludarabine. Blood 1996;87(3):1056–63.

56. Szerlip N.J., Pedraza A., Chakravarty D. et al. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. Proc Natl Acad Sci USA 2012;109(8):3041–6. DOI: 10.1073/pnas.1114033109.

57. Ruotsalainen T., Joensuu H., Mattson K. et al. High pretreatment serum concentration of basic fibroblast growth factor is a predictor of poor prognosis in small cell lung cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002;11(11):1492–5.

58. Salven P., Orpana A., Teerenhovi L. et al. Simultaneous elevation in the serum concentrations of the angiogenic growth factors VEGF and bFGF is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin lymphoma: a single-institution study of 200 patients. Blood 2000;96(12):3712–8.

59. Álvarez-Aznar A., Muhl L., Gaengel K. VEGF receptor tyrosine kinases: key regulators of vascular function. Curr Top Dev Biol 2017;123:433–482. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2016.10.001

60. Wiszniak S., Schwarz Q. Exploring the intracrine functions of VEGF-A. Biomolecules 2021;11(1):128. DOI: 10.3390/biom11010128

61. Mac Gabhann F., Popel A.S. Dimerization of VEGF receptors and implications for signal transduction: a computational study. Biophys Chem 2007;128(2-3):125–39. DOI: 10.1016/j.bpc.2007.03.010

62. Simons M., Gordon E., Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2016;17(10):611–25. DOI: 10.1038/nrm.2016.87

63. Leppänen V.M., Tvorogov D., Kisko K. et al. Structural and mechanistic insights into VEGF receptor 3 ligand binding and activation. Proc Natl Acad Sci USA 2013;110(32):12960–5. DOI: 10.1073/pnas.1301415110

64. Olsson A.K., Dimberg A., Kreuger J. et al. VEGF receptor signalling – in control of vascular function. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7(5):359–71. DOI: 10.1038/nrm1911

65. Бабышкина Н.Н., Завьялова М.В., Брагина О.Д. и др. Оценка предсказательной значимости рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста VEGFR-2 у больных тройным негативным раком молочной железы. Сибирский онкологический журнал 2016;15(5):9–17. DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-5-9-17
Babyshkina N.N., Zavyalova M.V., Bragina O.D. et al. Predictive significance of vascular endothelial growth factor receptor VEGF-2 in triple-negative breast cancer patients. Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology 2016;15(5):9–17. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-5-9-17

66. Корчагина А.А., С. Шеин С.А., Гурина О.И. и др. Роль рецепторов VEGFR в неопластическом ангиогенезе и перспективы терапии опухолей мозга. Вестник Российской академии медицинских наук 2013;68(11):104–14. DOI: 10.15690/vramn.v68i11.851

Korchagina A.A., Shein S.A., Gurina O.I. et al. VEGFRS in neoplastic angiogenesis and prospects for therapy of brain tumors. Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences 2013;68(11):104–14. (In Russ.). DOI: 10.15690/vramn.v68i11.851
67. Palazon A., Tyrakis P.A., Macias D. et al. An HIF-1α/VEGF-A axis in cytotoxic T cells regulates tumor progression. Cancer Cell 2017;32(5):669–83.e5. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.10.003
68. Mabeta P., Steenkamp V. The VEGF/VEGFR axis revisited: implications for cancer therapy. Int J Mol Sci 2022;23(24):15585. DOI: 10.3390/ijms232415585
69. Lorenc P., Sikorska A., Molenda S. et al. Physiological and tumor-associated angiogenesis: key factors and therapy targeting VEGF/VEGFR pathway. Biomed Pharmacother 2024;180:117585. DOI: 10.1016/j.biopha.2024.117585
70. Apte R.S., Chen D.S., Ferrara N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development. Cell 2019;176(6):1248–64. DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.021
71. Ghalehbandi S., Yuzugulen J., Pranjol M.Z.I. et al. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. Eur J Pharmacol 2023;949:175586. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.175586
72. McAuliffe J.C., Lazar A.J., Yang D. et al. Association of intratumoral vascular endothelial growth factor expression and clinical outcome for patients with gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib mesylate. Clin Cancer Res 2007;13(22 Pt 1):6727–34. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0895
73. Imamura M., Yamamoto H., Nakamura N. et al. Prognostic significance of angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. Mod Pathol 2007;20(5):529–37. DOI: 10.1038/modpathol.3800767
74. Golfmann K., Meder L., Koker M. et al. Synergistic anti-angiogenic treatment effects by dual FGFR1 and VEGFR1 inhibition in FGFR1-amplified breast cancer. Oncogene 2018;37(42):5682–93. DOI: 10.1038/s41388-018-0380-3
75. Murakami M., Nguyen L.T., Hatanaka K. et al. FGF-dependent regulation of VEGF receptor 2 expression in mice. J Clin Invest 2011;121(7):2668–78. DOI: 10.1172/JCI44762
76. Xue L., Greisler H.P. Angiogenic effect of fibroblast growth factor-1 and vascular endothelial growth factor and their synergism in a novel in vitro quantitative fibrin-based 3-dimensional angiogenesis system. Surgery 2002;132(2):259–67. DOI: 10.1067/msy.2002.125720
77. Ichikawa K., Watanabe Miyano S., Minoshima Y. et al. Activated FGF2 signaling pathway in tumor vasculature is essential for acquired resistance to anti-VEGF therapy. Sci Rep 2020;10(1):2939. DOI: 10.1038/s41598-020-59853-z
78. Deng H., Kan A., Lyu N. et al. Dual vascular endothelial growth factor receptor and fibroblast growth factor receptor inhibition elicits antitumor immunity and enhances programmed cell death-1 checkpoint blockade in hepatocellular carcinoma. Liver Cancer 2020;9(3):338–57. DOI: 10.1159/000505695
79. Glabman R.A., Choyke P.L., Sato N. Cancer-associated fibroblasts: tumorigenicity and targeting for cancer therapy. Cancers 2022;14(16):3906. DOI: 10.3390/cancers14163906
80. Yang J., Yan J., Liu B. Targeting VEGF/VEGFR to modulate antitumor immunity. Front Immunol 2018;9:978. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00978
81. Chen P.Y., Qin L., Zhuang Z.W. et al. The docking protein FRS2α is a critical regulator of VEGF receptors signaling. Proc Natl Acad Sci USA 2014;111(15):5514–9. DOI: 10.1073/pnas.1404545111
82. Li F., Huynh H., Li X. et al. FGFR-mediated reactivation of MAPK signaling attenuates antitumor effects of imatinib in gastrointestinal stromal tumors. Cancer Discov 2015;5(4):438–51. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0763
83. Javidi-Sharifi N., Traer E., Martinez J. et al. Crosstalk between KIT and FGFR3 promotes gastrointestinal stromal tumor cell growth and drug resistance. Cancer Res 2015;75(5):880–91. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0573
84. Дунаев П.Д., Бойчук С.В., Галембикова А.Р. и др. Получение иматиниб-резистентного субклона клеток гастроинтестинальной стромальной опухоли и исследование его чувствительности к химиопрепаратам. Казанский медицинский журнал 2017;98(6):993–7. DOI: 10.17750/KMJ2017-993
Dunaev P.D., Boichuk S.V., Galembikova A.R. et al. Establishment of imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor cell subline and investigation of its sensitivity to the chemomotherapeutic agents. Kazanskiy medicinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal 2017;98(6):993–7. (In Russ.). DOI: 10.17750/KMJ2017-993
85. Boichuk S., Galembikova A., Dunaev P. et al. A novel receptor tyrosine kinase switch promotes gastrointestinal stromal tumor drug resistance. Molecules 2017;22(12):2152. DOI: 10.3390/molecules22122152
86. Boichuk S., Dunaev P., Galembikova A. et al. Fibroblast growth factor 2 (FGF2) activates vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in gastrointestinal stromal tumors (GIST): an autocrine mechanism contributing to imatinib mesylate (IM) resistance. Cancers 2024;16(17):3103. DOI: 10.3390/cancers16173103
87. Boichuk S., Galembikova A., Mikheeva E. et al. Inhibition of FGF2-mediated signaling in GIST-promising approach for overcoming resistance to imatinib. Cancers 2020;12(6):1674. DOI: 10.3390/cancers12061674
88. Boichuk S., Galembikova A., Dunaev P. et al. Targeting of FGF-signaling re-sensitizes gastrointestinal stromal tumors (GIST) to imatinib *in vitro* and *in vivo*. Molecules 2018;23(10):2643. DOI: 10.3390/molecules23102643
89. Boichuk S., Dunaev P., Skripova V. et al. Unraveling the mechanisms of sensitivity to anti-FGF therapies in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors (GIST) lacking secondary KIT mutations. Cancers 2023;15(22):5354. DOI: 10.3390/cancers15225354
90. Clinical trials NCT02257541 – BGJ398 in combination with imatinib mesylate in patients with untreated advanced gastrointestinal stromal tumor (GIST). Available at: https://clinicaltrials.gov/study/NCT02257541?cond=GIST%20-%20Gastrointestinal%20Stromal%20Tumor&intr=Infigratinib&rank=1
91. Schöffski P., Mir O., Kasper B. et al. Activity and safety of the multi-target tyrosine kinase inhibitor cabozantinib in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumour after treatment with imatinib and sunitinib: European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase II trial 1317 'CaboGIST'. Eur J Cancer 2020;134;62–74. DOI: 10.1016/j.ejca.2020.04.021
92. Cai Z., Chen X., Zhang B. et al. Apatinib treatment in metastatic gastrointestinal stromal tumor. Front Oncol 2019;9:470. DOI: 10.3389/fonc.2019.00470
93. Xu H., Zhou S., Hu Q. et al. Apatinib treatment for unresectable gastrointestinal stromal tumor with synchronous gastric cancer. Precis Clin Med 2020;3(1):67–70. DOI: 10.1093/pcmedi/pbaa005
94. Clinical trials NCT05751733 – apatinib mesylate versus standard second-line TKI in the treatment of advanced GIST. Available at: https://clinicaltrials.gov/study/NCT05751733
95. Blanke C.D., Rankin C., Corless C. et al. S0502: a SWOG phase III randomized study of imatinib, with or without bevacizumab, in patients with untreated metastatic or unresectable gastrointestinal stromal tumors. Oncologist 2015;20(12):1353–4. DOI: 10.1634/theoncologist.2015-0295
96. Clinical trials NCT01363024 – trial evaluating the safety and pharmacokinetics of MFGR1877S in patients with advanced solid tumors. Available at: https://clinicaltrials.gov/study/NCT01363024
97. Babina I.S., Turner N.C. Advances and challenges in targeting FGFR signalling in cancer. Nat Rev Cancer 2017;17(5):318–32. DOI: 10.1038/nrc.2017.8
98. Xiang H., Liu L., Gao Y. et al. Population pharmacokinetic analysis of phase 1 bemarituzumab data to support phase 2 gastroesophageal adenocarcinoma FIGHT trial. Cancer Chemother Pharmacol 2020;86(5):595–606. DOI: 10.1007/s00280-020-04139-4

99. Schöffski P., Gebreyohannes Y., Van Looy T. et al. *In vivo* evaluation of fibroblast growth factor receptor inhibition in mouse xenograft models of gastrointestinal stromal tumor. Biomedicines 2022;10(5):1135. DOI: 10.3390/biomedicines10051135
100. Clinical trials NCT02268435 – dovitinib in combination with imatinib in patients with gastrointestinal stromal tumors. Available at: https://clinicaltrials.gov/study/NCT02268435?a=1
101. Shen G., Zheng F., Ren D. et al. Anlotinib: a novel multi-targeting tyrosine kinase inhibitor in clinical development. J Hematol Oncol 2018;11(1):120. DOI: 10.1186/s13045-018-0664-7
102. Zhou Y., Zeng C., Sun X. et al. Activity of anlotinib in the second-line therapy of metastatic gastrointestinal stromal tumors: a prospective, multicenter, in vitro study. Oncologist 2023;28(4):e191–7. DOI: 10.1093/oncolo/oyac271
103. Clinical trials NCT04193553 – multicentre placebo-controlled double-blinded phase II study of lenvatinib efficacy in patients with locally advanced or metastatic GIST (gastrointestinal stromal tumor) after imatinib/sunitinib failure (LENVAGIST). Available at: https://clinicaltrials.gov/study/NCT04193553#study-overview

Вклад авторов
П.Д. Дунаев, С.В. Бойчук: обобщение данных, написание текста статьи, редактирование;
Ф.И. Мухутдинова, П.Б. Копнин: обобщение данных, редактирование;
М.С. Шашина: подбор литературы по теме статьи.
Authors’ contributions
P.D. Dunaev, S.V. Boichuk: summarizing data, article writing, editing;
F.I. Mukhutdinova, P.B. Kopnin: summarizing data, editing;
M.S. Shashina: selection of literature on the topic of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors
П.Д. Дунаев / P.D. Dunaev: https://orcid.org/0000-0002-5449-4435
Ф.И. Мухутдинова / F.I. Mukhutdinova: https://orcid.org/0009-0004-9666-0130
М.С. Шашина / M.S. Shashina: https://orcid.org/0009-0009-3945-8653
П.Б. Копнин/ / P.B. Kopnin: https://orcid.org/0000-0002-2078-4274
С.В. Бойчук / S.V. Boichuk: https://orcid.org/0000-0003-2415-1084

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 25-45-01008).
Funding. The study was carried out with the support of the Russian Science Foundation (grant No. 25-45-01008).

Статья поступила: 15.08.2025. **Принята к публикации:** 15.09.2025. **Опубликована онлайн:** 10.12.2025.
Article submitted: 15.08.2025. **Accepted for publication:** 15.09.2025. **Published online:** 10.12.2025.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-51-61

Семейство AID/APOBEC и его роль в канцерогенезе

Г.М. Волгарева

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

Контакты: Галина Михайловна Волгарева *galina.volgareva@ronc.ru*

Семейство генов *AID/APOBEC* возникло в ходе эволюции для осуществления функций защиты организма. Современные гены *AID/APOBEC* кодируют белки, сходные по строению, но значительно различающиеся функционально. Большинство белков AID/APOBEC обладают дезаминазной активностью в отношении цитидиловых нуклеотидов в составе однонитевой ДНК и РНК. Помимо дезаминирования цитозина в составе геномов вирусов, что приводит к ограничению (рестрикции) инфекции, эти цитидиндезаминазы способны вызывать мутации в геноме человека. APOBEC-ассоциированные мутации представляют собой один из наиболее распространенных видов мутаций в злокачественных новообразованиях, они выявлены приблизительно в 75 % типов рака, более чем в 50 % всех новообразований.

Цель обзора – анализ роли мутаций, индуцированных цитидиндезаминазами AID/APOBEC, в генезе злокачественных новообразований человека.

Ключевые слова: ген семейства *AID/APOBEC*, белок семейства AID/APOBEC, мутация, канцерогенез

Для цитирования: Волгарева Г.М. Семейство AID/APOBEC и его роль в канцерогенезе. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(4):51–61.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-51-61

AID/APOBEC family and its role in carcinogenesis

G.M. Volgareva

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

Contacts: Galina Mikhailovna Volgareva *galina.volgareva@ronc.ru*

The *AID/APOBEC* gene family originated during evolution to perform functions related to organismal defense. At present, *AID/APOBEC* genes encode proteins that are structurally similar but functionally diverse. Most AID/APOBEC proteins exhibit deaminase activity toward cytidyl nucleotides in single-stranded DNA and RNA. In addition to cytidine deamination within viral genomes – which restricts infection – these deaminases are also capable of inducing mutations in the human genome. APOBEC-associated mutations represent one of the most common mutational signatures in cancer: they have been detected in approximately 75 % of cancer types and in more than 50 % of all tumors.

The aim of this review is to analyze the role of AID/APOBEC-induced mutations in the genesis of human malignancies.

Keywords: *AID/APOBEC* family gene, AID/APOBEC family protein, mutation, carcinogenesis

For citation: Volgareva G.M. AID/APOBEC family and its role in carcinogenesis. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(4):51–61. (In Russ.).
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-51-61

ВВЕДЕНИЕ

Исследования, посвященные выяснению роли мутаций в генезе злокачественных новообразований (ЗНО), значительно продвинулись вперед благодаря использованию технологии полногеномного секвенирования; представилась возможность не только обнаруживать ранее неизвестные мутации в кодирующих и некодирующих областях генома, но во многих случаях также определять фактор, вызвавший конкретную мутацию (ультрафиолетовое облучение, компоненты табачного дыма, сбой в работе ферментов, контролирующих целостность ДНК, и др.). Одним из таких факторов, как оказалось, являются клеточные цитидиндезаминазы семейства AID/APOBEC [1, 2].

Целью обзора является анализ современных представлений о роли мутаций, индуцируемых цитидиндезаминазами семейства AID/APOBEC, в генезе ЗНО человека.

СЕМЕЙСТВО AID/APOBEC

Гены группы *AID/APOBEC* (Activation Induced Deaminase/Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic polypeptide-like) кодируют у млекопитающих белки, участвующие как во врожденном, так и в адаптивном (*AID*) иммунитете. Неоднократно отмечалась парадоксальность их роли – одновременно и препятствовать (быть факторами рестрикции) вирусной инфекции, и способствовать вызванному канцерогенными вирусами онкогенезу [3–5].

Семейство генов *AID/APOBEC* ответственно за контроль над многими функциями организма в норме и при различных патологиях. Многие кодируемые этими генами Zn-зависимые цитидиндезаминазы связываются как с РНК, так и с однонитевой ДНК, конвертируя цитидин в уридин (рис. 1) [6, 7]. Их способность редактировать клеточные РНК впервые была показана на матричной РНК (мРНК) аполипопротеина B, в которой присутствовала не закодированная в геноме замена C → U. Редактором оказалась цитидиндезаминаза APOBEC1; в результате образования стоп-кодона синтезируется укороченная форма аполипопротеина B, необходимая для транспорта триглицеридов в тонком кишечнике [8, 9].

Предполагается, что семейство AID/APOBEC произошло около 500 млн лет назад от гена *AID*, экспрессировавшегося в лимфоцитах бесчелюстных рыб, обеспечивая адаптивный иммунитет за счет множественных рекомбинационных событий в генах-рецепторах антигенов [10, 11]. Последующие дупликации и дивергенция генов, возникших из прародительского *AID*, предположительно, привели к появлению генов, кодирующих цитидиндезаминазы современных позвоночных.

У человека семейство *AID/APOBEC* представлено 11 генами, кодирующими дезаминазы APOBEC1 (A1), AID, APOBEC2 (A2), APOBEC3A-H (A3A, A3B, A3C, A3D, A3F, A3G и A3H), а также APOBEC4 (A4). О роли этих белков в формировании в ходе эволюции защитных механизмов от ретровирусов и ретротранспозонов свидетельствует тот факт, что, в отличие от приматов, у мыши имеется единственный ген в данном семействе, а количество активных ретроэлементов в геноме мыши в 50–60 раз превосходит их количество у человека [6]. Еще одним фактом, свидетельствующим о жестком отборе в ходе эволюции, стало обнаружение у летучих мышей, являющихся резервуарами и распространителями многих вирусных инфекций, но остающихся толерантными к этим инфекциям, 18 генов в подсемействе *APOBEC3*, 13 из которых транскрипционно активны [12]. Эволюция этих генов у позвоночных характеризовалась не только изменениями в их количестве, но также накоплением точковых мутаций, приводивших к заменам в белковой молекуле, и преобладанием их над мутациями типа same-sense [13].

Хромосомная локализация этих генов такова: *APOBEC1* и *AID* – 12p13, *APOBEC2* – 6p21, все 7 генов подсемейства *APOBEC*3 – 22q13.1, *APOBEC4* – 1q25.3; гены содержат от 2 до 8 экзонов; кодируемые ими белки имеют 1 или 2 (APOBEC3B, APOBEC3DEFG) каталитических дезаминазных домена. Эти гены экспрессируются во многих тканях организма человека, дезаминазы подсемейства APOBEC3 с разной степенью эффективности рестрицируют ретротранспозоны и вирусы. Наиболее подробно среди них изучена APOBEC3G,

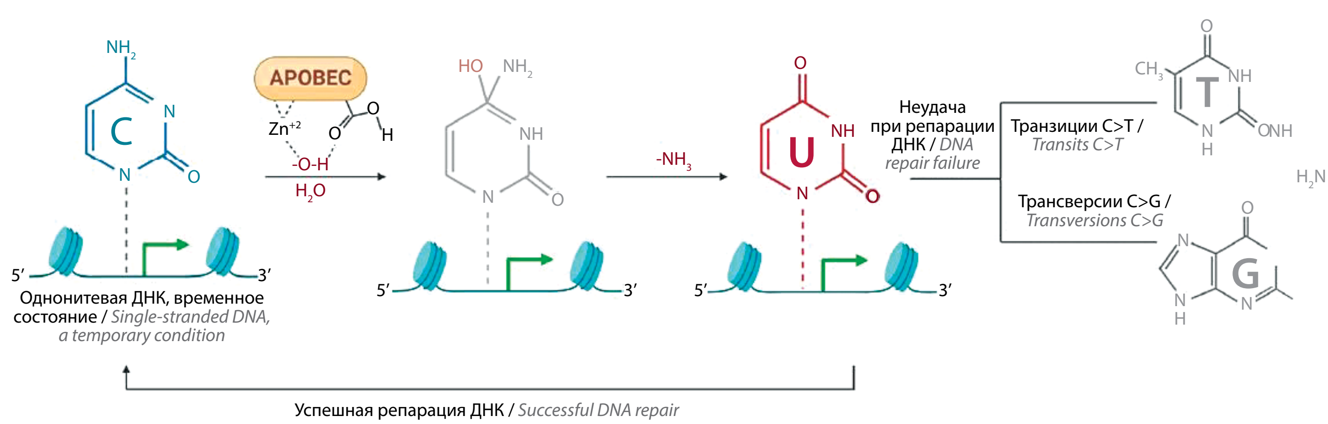


Рис. 1. *Дезаминирование цитидинов. В результате гидролиза аминогруппы (NH_2) в положении 4 дезоксицитидина образуется дезоксиуридин (C>U); процесс происходит под действием APOBEC. В случае успешной репарации образовавшийся уридин может быть возвращен в первоначальное состояние (U>C – левая часть схемы). Если репарация безуспешна, возникшие повреждения далее приводят к транзициям (C>T) или трансверсиям (C>G), которые в следующем цикле репликации фиксируются в виде мутаций (правая часть схемы)*

Fig. 1. *Deamination of cytidines. The hydrolysis of the amino group (NH_2) at position 4 of deoxycytidine, resulting in the formation of deoxyuridine (C>U), catalyzed by the APOBEC enzyme. The uridine formed after deamination, with efficient repair, can return to its original state (U>C – left part of the scheme). When DNA repair fails, abasic sites are generated, promoting transitions (C>T) and transversions (C>G) that are perpetuated in mutations in the following replication cycle (right part of the scheme)*

защищающая организм от вируса иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) [11].

Функции этих цитидиндезаминаз в организме человека зависят среди прочего от их внутриклеточной локализации. Описаны несколько механизмов, с помощью которых регулируется перемещение белков семейства AID/APOBEC между ядром и цитоплазмой [6]. Локализацию белков подсемейства APOBEC3 в разные моменты митотического цикла исследовали L. Lackey и соавт. [14]. В интерфазе разные представители этого подсемейства характеризовались разнообразием внутриклеточной локализации: по всей клетке, только в цитоплазме или исключительно в ядре. Однако только APOBEC3B по завершении цитокинеза ассоциировалась с ядерной ДНК, что, по мнению авторов, давало этому белку возможность реализовывать функцию мутатора. С учетом результатов проведенной работы и данных, полученных этой группой на клеточных линиях и первичных карциномах молочной железы [15], авторы выделили APOBEC3B как основной фермент, ответственный за индукцию мутаций в ЗНО. В дальнейшем K. Chan и соавт., обнаружив различия в субстратных предпочтениях APOBEC3A и APOBEC3B, указали в дополнение к APOBEC3B и на APOBEC3A как на важный источник мутационных сигнатур в канцерогенезе [16].

В упомянутом выше случае защиты организма человека от ВИЧ-1 находящаяся в цитоплазме клетки дезаминаза APOBEC3G, связываясь с РНК вируса, попадает вместе с ней в вирусный капсид; оказавшись в новой клетке-мишени в составе вирусной частицы, APOBEC3G во время обратной транскрипции модифицирует остатки цитозина в урацил в первой цепи вирусной комплементарной ДНК (кДНК), что в дальнейшем ведет к многочисленным мутациям во второй цепи вирусной ДНК – к появлению стоп-кодонов или к аминокислотным заменам в вирусных белках, снижая тем самым жизнеспособность вируса [17].

У 2 тканеспецифичных представителей семейства APOBEC – APOBEC2 и APOBEC4 – дезаминазная активность выявлена не была. APOBEC2 экспрессируется в сердечной и скелетной мускулатуре и, не обладая активностью дезаминазы ни в отношении ДНК, ни в отношении РНК, взаимодействует с ДНК некоторых промоторов и ингибирует транскрипцию соответствующих генов. Наименее изучены функции APOBEC4. Этот белок экспрессируется в семенниках млекопитающих и, предположительно, является модулятором промоторов [18]. В табл. 1 с небольшими дополнениями представлена информация о представителях семейства *AID/APOBEC*, обобщенная S.G. Conticello [11].

Таблица 1. *Паралоги AID/APOBEC у человека*

Table 1. *Human AID/APOBEC paralogs*

Ген Gene	Локализация в геноме Genomic location	Экзоны Exons	Дезаминазный домен Deaminase domain	Экспрессия Expression	Редактирующая активность Editing activity	Мишень Target	Источник Source
AID	12p13	5	1	Активированные В-клетки, семенники Activated B cells, testes	ДНК DNA	Гены иммуноглобулинов Immunoglobulin genes	[19]
APOBEC1	12p13.1	5	1	Тонкий кишечник Small intestine	РНК, ДНК RNA, DNA	Матричная РНК аполипопротеина В Apolipoprotein B messenger RNA	[20, 21]
APOBEC2	6p21	3	1	Скелетные мышцы, сердце Skeletal muscles, heart	Неизвестна Unknown	Неизвестна Unknown	[22, 23]
APOBEC3A	22q13.1	5	1	Кератиноциты, кровь Keratinocytes, blood	ДНК, РНК DNA, RNA	Аденоассоциированный вирус, ретротранспозоны Adeno-associated virus, retrotransposons	[24, 25]

Окончание табл. 1
End of table 1

Ген Gene	**Локализация в геноме** Genomic location	**Экзоны** Exons	**Дезаминазный домен** Deaminase domain	**Экспрессия** Expression	**Редактирующая активность** Editing activity	**Мишень** Target	**Источник** Source
APOBEC3B	22q13.1	8	2	Многие ткани Many tissues	ДНК DNA	Ретровирусы, ретротранспозоны, вирус гепатита В (HBV) Retroviruses, retrotransposons, hepatitis B virus (HBV)	[24]
APOBEC3C	22q13.1	4	1	Многие ткани Many tissues	ДНК DNA	Ретровирусы, ретротранспозоны, HBV Retroviruses, retrotransposons, HBV	[24]
APOBEC3DE	22q13.1	7	2	Щитовидная железа, селезенка, кровь Thyroid, spleen, blood	ДНК DNA	Ретровирусы Retroviruses	[24]
APOBEC3F	22q13.1	8	2	Многие ткани Many tissues	ДНК DNA	Ретровирусы, ретротранспозоны, HBV Retroviruses, retrotransposons, HBV	[24]
APOBEC3G	22q13.1	8	2	Многие ткани, Т-клетки Many tissues, T cells	ДНК, РНК DNA, RNA	Ретровирусы, ретротранспозоны, HBV Retroviruses, retrotransposons, HBV	[7, 24, 25]
APOBEC3H	22q13.1	5	1	Кровь, тимус, щитовидная железа Blood, thymus, thyroid	ДНК DNA	Ретровирусы Retroviruses	[10, 26]
APOBEC4	1q25.3	2	1	Семенники Testes	Неизвестна Unknown	Неизвестна Unknown	[27]

ЦИТИДИНДЕЗАМИНАЗЫ AID/APOBEC В ИММУННОЙ ЗАЩИТЕ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

Цитидиндезаминазы AID/APOBEC у позвоночных являются важными звеньями иммунитета. AID участвует в адаптивном иммунитете, обеспечивая гипермутабельность генов иммуноглобулинов, а также переключение классов антител [28]. Цитидиндезаминазы подсемейства APOBEC3 обеспечивают механизмы врожденного иммунитета, защищая организм от инфицирования экзогенными РНК- и ДНК-содержащими вирусами, а также ограничивая репликацию эндогенных ретротранспозонов. Противовирусный эффект одного из представителей подсемейства APOBEC3 в отношении ВИЧ-1 был установлен в экспериментах по гибридизации клеток, пермиссивных и непермиссивных для его размножения; вирус в этих опытах был лишен фактора Vif (virus infectivity factor) – белка, важного для поддержания репликации вируса. Конкретный клеточный ген, продукт которого препятствовал размножению ВИЧ-1, был определен как *APOBEC3G*. Кодируемый им белок в присутствии Vif деградирует [29–31]. После обнаружения у белка APOBEC3G цитидиндезаминазной активности был прояснен механизм дезаминирования вирусной кДНК [32, 33].

Помимо дезаминазазависимого описаны также дезаминазанезависимые механизмы рестрикции ВИЧ-1, которые могут реализовываться с участием каталитически неактивных APOBEC3G и APOBEC3F; в этих случаях цитидиндезаминазы тем или иным способом препятствуют обратной транскрипции – связываются с геномной РНК, взаимодействуют с обратной транскриптазой и т. д. [13].

Противовирусную активность цитидиндезаминазы проявляют в отношении не только ВИЧ-1, но и других экзогенных ретровирусов, а также в отношении эндогенных ретровирусов и ретротранспозонов. Реализуют эти эффекты кроме APOBEC3G и некоторые другие представители семейства AID/APOBEC. Помимо Vif описаны разнообразные механизмы, с помощью которых осуществляется противодействие вирусов этим защитным системам клетки. Противовирусная функция ферментов данного семейства реализуется также в отношении некоторых ДНК-содержащих вирусов, в частности, вирусов папилломы человека, вируса гепатита В [4, 7, 13].

ЦИТИДИНДЕЗАМИНАЗЫ AID/APOBEC В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Что касается роли цитидиндезаминаз AID/APOBEC в канцерогенезе, то до сравнительно недавнего времени эти работы были ограничены методически: исследователи сосредотачивались на мутациях одного или немногих генов, чаще всего – *TP53*. В последние десятилетия открылась перспектива изучения генома в целом и фиксации изменений опухолевых геномов, так называемых мутационных сигнатур.

Activation-induced cytidine deaminase (AID) в норме является участником процесса созревания антител: в ходе соматического гипермутирования она индуцирует мутации в парах нуклеотидов C: G в мотивах WRC (где W = A или T; R = A или G). Кластеры мутаций, связанных с активностями AID, часто обнаруживаются в вариабельных областях генов тяжелых цепей иммуноглобулинов в клетках ЗНО, связанных с кроветворной системой, – хронического миелоидного лейкоза, множественной миеломы, диффузных В-крупноклеточных лимфом [9].

Одно из первых сообщений о мутациях в опухолевых геномах, выявленных с помощью методов секвенирования нового поколения, опубликовали L.B. Alexandrov и соавт. [1]. Оперируя информацией из нескольких электронных баз данных, включая Атлас ракового генома (The Cancer Genome Atlas, TCGA), эти авторы проанализировали геномы 30 типов ЗНО, всего 7042 случая, для которых обнаружили более 20 разных мутационных сигнатур, в общей сложности 4 938 362 мутационных события. Некоторые из сигнатур встречались во многих типах новообразований, другие – только в одном. К первой группе были отнесены сигнатуры, вызываемые дезаминазами APOBEC. Эти сигнатуры (так называемые сигнатуры 2 и 13, см. далее) были обнаружены в 16 разных формах новообразований: остром лимфобластном лейкозе, раке мочевого пузыря, молочной железы (РМЖ), шейки матки, хроническом лимфобластном лейкозе, раке пищевода, головы и шеи, почки, плоскоклеточном и аденогенном раке легкого, В-клеточной лимфоме, миеломе, раке поджелудочной железы, желудка, щитовидной железы, матки. Позднее в рамках Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes (PCAWG) Consortium были охарактеризованы сигнатуры в общей сложности для 84 729 690 соматических мутаций из 4645 полногеномных и 19 184 экзомных сиквенсов, охватывавших большинство типов новообразований. Было установлено, что APOBEC-ассоциированные мутации представляют собой один из наиболее распространенных видов мутаций в злокачественных опухолях, они выявлены приблизительно в 75 % типов рака, более чем в 50 % всех новообразований. Сигнатура 2 была обнаружена более чем в 50 % проанализированных опухолевых образцов рака мочевого пузыря, РМЖ, рака шейки матки, пищевода, плоскоклеточного рака головы и шеи, рака почки, печени, плоскоклеточного и аденогенного рака легкого, аденокарцином желудка, рака поджелудочной железы и матки; сигнатура 13 встречалась более чем в 50 % образцов рака мочевого пузыря, РМЖ, рака шейки матки, колоректального рака, рака пищевода, плоскоклеточного рака головы и шеи, плоскоклеточного и аденогенного рака легкого, рака яичников, аденокарцином матки [2].

Детекция APOBEC-ассоциированных мутационных сигнатур при анализе сиквенсов предполагает учет субстрат-специфичности действия каждой из этих дезаминаз. Все представители подсемейства APOBEC3 дезаминируют цитидин, однако имеет место избирательность: динуклеотид 5'-CC является предпочтительной мишенью для APOBEC3G, тогда как APOBEC3A и APOBEC3B предпочтительно дезаминируют цитидин в составе нуклеотида, которому предшествует тимидиловый нуклеотид (5'-TC) [34]. Установлено также, что APOBEC3A предпочтительно дезаминирует цитидин, если мотиву 5'-TC предшествует пиримидин, а APOBEC3B – в случаях, когда предшественником является пурин [16].

По мере увеличения количества просеквенированных опухолей были выявлены 2 мутационные сигнатуры, связанные с дезаминирующим действием APOBEC: «сигнатура 1» и «сигнатура 2»; их обозначают также как SBS1 и SBS2 (от single base substitution) или «сигнатура 2» и «сигнатура 13». Это транзиции C>T и трансверсии C>G и C>A соответственно. Конкретная мутация, инициированная актом дезаминирования, возникает в результате процессов репликации и репарации [35]. В отдельных новообразованиях эти сигнатуры встречаются обычно совместно, хотя их соотношение может значительно варьировать [1, 2].

Помимо рассеянных по геному APOBEC-ассоциированных мутаций в опухолях описаны также кластеры нуклеотидных замен в парах C: G, возникшие на одной нити ДНК и получившие название катаэгис (kataegis, греч. καταιγίς – шторм, мутационный душ);

катаэгис определяется как 6 или более мутаций, где соседние мутации отстоят друг от друга не более чем на 1000 п. н.; он нередко колокализуется с областями хромосомных перестроек [1, 35, 36]. Мишени, которые предпочитают APOBEC3A и APOBEC3B, различаются не только по последовательности нуклеотидов вокруг дезаминируемого основания, но и по вторичной структуре ДНК в этой области. Так, APOBEC3A проявляет дезаминазную активность в отношении шпилек в ДНК (DNA hairpin loops), и в составе этих шпилек вторичная структура может «пересиливать» (override) первичную, – APOBEC3A способна дезаминировать в этих случаях цитидин в сайтах VpC (где V – любое основание кроме T: GpC, ApC, CpC) [37, 38]. Эти данные расширили представление об APOBEC3A-специфичных мутационных сигнатурах: ранее VpC-сайты рассматривались как мишени при возрастном мутагенезе [1]. A. Sanchez и соавт. показали, что и APOBEC3B реализует свою цитидиндезаминазную активность преимущественно в отношении цитидина, находящегося в составе шпилечных структур, но эти структуры отличаются от шпилек, цитидин в составе которых предпочитает APOBEC3A: они состоят из 5 нуклеотидов (а в случае APOBEC3A – из 3) [39]. Было сделано заключение, что в составе геномов опухолевых клеток дезаминазы APOBEC3A и APOBEC3B вызывают мутации в разных сайтах – каждая из них обладает избирательностью в отношении субстрата; в совокупности они могут генерировать разные мутационные ландшафты в опухолевых геномах.

Ответ на вопрос, какой именно фермент из APOBEC3 – APOBEC3A или APOBEC3B – является главным генератором мутаций в опухолевых клетках, важен как для понимания механизмов прогрессии новообразований, так и для того, чтобы определить перспективную мишень для химиотерапии. Этому вопросу посвящена работа M. Petljak и соавт., создавших клеточные линии РМЖ, мочевого пузыря и лимфомы (в общей сложности 251 линию), из которых удалили гены *APOBEC3A* и *APOBEC3B* [40]. Линии неоднократно клонировали, отделяя мутационные сигнатуры, возникшие после нокаута соответствующего гена, от предсуществовавших. Использовали полногеномное секвенирование. Было установлено, что делеция *APOBEC3A* приводила к уменьшению количества APOBEC-специфичных сигнатур; совместная делеция *APOBEC3A* и *APOBEC3B* дополнительно снижала количество этих сигнатур, но не приводила к их полному исчезновению; кроме того, делеция *APOBEC3B* вызывала повышение содержания белка APOBEC3A, а также повышение его активности в ряде клеточных линий. Совокупность этих результатов свидетельствовала, что эндогенные APOBEC3-дезаминазы генерируют основную часть мутационных сигнатур в раковых клетках человека; APOBEC3A является главным драйвером этих мутаций; APOBEC3B тоже вносит свой вклад, но меньший, в этот процесс.

Для прояснения роли в канцерогенезе индивидуальных членов подсемейства *APOBEC3* представляют интерес случаи генеративной делеции в 22q13.1, где локализованы гены подсемейства *APOBEC3*. J.M. Kidd и соавт. в популяционно-генетическом исследовании показали, что распространенная среди людей делеция в хромосоме 22 (в среднем она обнаруживается у 22,5 % индивидуумов) размером 29,5 кб в разных регионах мира встречается с сильно варьирующей частотой: в Африке и Европе – редко, в 0,9 и 6 % случаев соответственно; в Восточной Азии и среди американских индейцев чаще – в 36,9 и 56,7 % соответственно, и с очень высокой постоянной частотой среди аборигенов Океании – в 92,9 % случаев [41]. При этой делеции утрачивается генетический материал между 5-м экзоном *APOBEC3A* и 8-м экзоном *APOBEC3B*, в результате возникает гибридный транскрипт, а при трансляции возникает белок, по аминокислотной последовательности идентичный APOBEC3A; *APOBEC3B* и соответствующий белок утрачиваются (рис. 2).

В исследовании D. Xuang и соавт., выполненном по схеме случай–контроль, включавшем 1671 пациентку с карциномами молочной железы и 1602 здоровые женщины, изучалось влияние этой делеции на риск возникновения опухоли. Делецию *APOBEC3* авторы обнаружили у 12,4 % больных и 10,4 % женщин контрольной группы. Риск развития РМЖ значимо возрастал в случае делеции: отношение шансов (ОШ) в случае утраты 1 копии составило 1,21 (1,02–1,43) при 95 % доверительном интервале, а в случае утраты 2 копий – 2,29 (1,04–5,06) [42]. APOBEC-ассоциированные мутационные сигнатуры 2 и 13 в РМЖ у женщин-носителей делеции обнаруживались чаще, чем в карциномах тех пациенток, у которых делеция отсутствовала [43]. Наиболее вероятным объяснением того, что у женщин-носительниц делеции риск возникновения РМЖ возрастал, является изменение у таких пациенток посттранскрипционной регуляции *APOBEC3A*, проявляющееся в многократном повышении у них стабильности соответствующего транскрипта вследствие утраты нескольких сайтов связывания с малыми интерферирующими РНК (миРНК), ингибирующими данный ген-мутатор в присутствии интактного *APOBEC3B* [5].

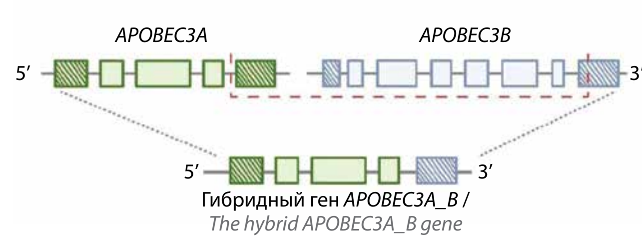


Рис. 2. *Структура делеции APOBEC3A_B*
Fig. 2. *Structure of the APOBEC3A_B deletion*

Ассоциация наличия рассматриваемой делеции с увеличением частоты заболеваемости РМЖ была выявлена помимо китайских женщин у иранских и малазийских женщин; вместе с тем в ряде стран (Швеция, Индия, Марокко) она не подтвердилась [5]. Очевидно, что помимо полиморфизма популяций по данной делеции на частоту заболеваемости РМЖ влияют иные этнические особенности, которые прояснятся в ходе дальнейших исследований.

Совместное участие APOBEC3A и APOBEC3B в возникновении большинства мутационных сигнатур в опухолевых клетках человека *in vitro* и в первичных опухолях молочной железы *in vivo* подтвердили M.A. Carpenter и соавт. [44].

В течение ряда лет господствующей среди исследователей была точка зрения, впоследствии уточненная, что главным генератором мутаций в клетках ЗНО является APOBEC3B; основанием для нее явились результаты исследования M.B. Burns и соавт. [15].

M.B. Burns и соавт. изучили экспрессию всех 11 представителей семейства *AID/APOBEC* в количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в 38 клеточных линиях РМЖ; гиперэкспрессировался только *APOBEC3B*: в 28 из 38 линий – на ≥3 s.d., а в 12 линиях – на ≥10 s.d относительно соответствующих контролей (s.d. – standard deviation, стандартное отклонение). Ядерные фракции этих клеточных линий обладали дезаминазной активностью в отношении TC-динуклеотидов, при введении коммерческого препарата shRNA к *APOBEC3B* наблюдался нокдаун, что коррелировало со снижением содержания урацила в геноме и уменьшением частоты транзиций C → T. Продолжив исследование на 52 образцах первичного РМЖ и условно-нормальных (контрольных) тканях от этих больных, авторы зафиксировали в 20 из опухолевых образцов усиление экспрессии *APOBEC3B* на ≥3 s.d. Данные из электронных баз, свидетельствовавшие о положительной корреляции между уровнем экспрессии *APOBEC3B*, мутационной нагрузкой от замен C → T и инактивацией *TP53*, позволили авторам сделать заключение о том, что APOBEC3B – важный источник мутаций в РМЖ.

О положительной корреляции транскрипционной активности *APOBEC3B* с количеством мутационных сигнатур, а также с рядом клинических характеристик ЗНО сообщили несколько исследовательских групп [45–47].

Позднее L.M. Cortez и соавт. принципиально уточнили результаты M.B. Burns и соавт. [48]. На 28 клеточных линиях РМЖ, используя данные полноэкзомного секвенирования и количественной ОТ-ПЦР, L.M. Cortez и соавт. показали, что в присутствии клеточной РНК (при постановке тестов без РНКазы А) APOBEC3A обладала цитидиндезаминазной активностью, более чем в 100 раз превосходившей активность APOBEC3B. Следовательно, более выраженная экспрессия *APOBEC3B* по сравнению с *APOBEC3A* была ответственна за индукцию мутаций в клетках РМЖ в меньшей степени, нежели экспрессия *APOBEC3A*. Эти различия между APOBEC3A и APOBEC3B в проявлении ими цитидиндезаминазной активности были обусловлены небольшими структурными особенностями строения N-концевого домена молекул, благодаря которым APOBEC3B, в отличие от APOBEC3A, обладает способностью связываться с однонитевой РНК. L.M. Cortez и соавт. пришли к выводу, что именно APOBEC3A является главным источником цитидиндезаминазой активности в клетках РМЖ и, по-видимому, главным генератором APOBEC-специфичных мутационных сигнатур. Оказалось также, что короткая РНК, образующая шпильку (shRNA), с помощью которой M.B. Burns и соавт. вызывали нокдаун *APOBEC3B*, неспецифично многократно (в 4–14 раз) угнетала также транскрипцию *APOBEC3A*.

Продолжив исследование на 229 образцах первичного РМЖ, L.M. Cortez и соавт. показали вовлеченность в мутагенез в этих карциномах как APOBEC3A, так и APOBEC3B, но при большей роли APOBEC3A. Достоверную корреляцию между уровнями экспрессии обеих цитидиндезаминаз и количеством APOBEC-специфичных мутаций они зафиксировали также для опухолей других локализаций, охарактеризованных в TCGA: для 410 образцов рака мочевого пузыря, 197 образцов рака шейки матки и 549 случаев рака головы и шеи. В образцах рака шейки матки уровень экспрессии *APOBEC3A* лучше коррелировал с количеством мутаций, чем уровень экспрессии *APOBEC3B*; в случае рака мочевого пузыря, напротив, с количеством APOBEC-специфичных мутаций коррелировал только уровень экспрессии *APOBEC3B*. Итак, определив APOBEC3A как основной генератор мутаций в РМЖ и других карциномах, L.M. Cortez и соавт. показали, что некоторую роль в возникновении APOBEC-специфичных мутаций играет также APOBEC3B и что в разных опухолях активность этих цитидиндезаминаз может варьировать.

APOBEC-ассоциированные мутационные сигнатуры и попытки обнаружения мутаций в генах-драйверах и супрессорах опухолевого роста

Тот факт, что дезаминазная активность ферментов группы APOBEC реализуется только на однонитевой ДНК, давал повод допускать, что гены, мутации в которых являются драйверами или супрессорами канцерогенеза, могут избежать воздействия этих мутаторов. S.A. Roberts и соавт. проверили, вовлекаются ли драйверные гены в мутационный процесс, индуцируемый этими белками [49]. Результаты полногеномного и полноэкзомного секвенирования для 14 разных типов опухолей, в общей сложности для 2680 новообразований, позволили выявить 954 247 APOBEC-специфичных мутаций из TCGA и из ряда отдельных исследований.

В 6 типах новообразований (раке шейки матки, головы и шеи, мочевого пузыря, РМЖ, плоскоклеточном и аденогенном раке легкого) такие мутации в некоторых образцах составляли до 68 % всех выявленных мутаций. Авторы обнаружили четкую корреляцию повышенной частоты APOBEC-индуцированных мутаций и с уровнями мРНК *APOBEC3B*, *APOBEC3A* и *APOBEC3H*; уровень экспрессии генов оценивали, сравнивая с показателями для соответствующих нормальных тканей. Далее был проведен анализ того, как перекрываются APOBEC-специфичные мутации и мутации в генах – потенциальных драйверах опухолевого роста. Драйверные гены идентифицировали с помощью одного из трех источников: 1) электронной базы данных CRAVAT [50], 2) электронной базы данных COSMIC [51] и 3) перечня генов из The Cancer Gene Census [52]. APOBEC-специфичные мутационные сигнатуры в генах-драйверах опухолевого роста встречались среди канцерогенных мутаций с более высокой частотой именно в тех опухолевых образцах, для которых в целом была установлена высокая частота APOBEC-специфичных мутаций по сравнению с теми, где APOBEC-специфичные мутации не обнаруживались. Результаты работы свидетельствовали, что APOBEC-специфичные мутации могут вносить лепту в канцерогенез там, где вызванных APOBEC мутаций много.

Что касается APOBEC-специфичных мутаций в генах-супрессорах опухолевого роста, то имеется сообщение о достоверном учащении таких мутаций, ассоциированных с APOBEC3A, в *TP53* при раке легкого у курильщиков [53].

APOBEC-СПЕЦИФИЧНЫЕ МУТАЦИОННЫЕ СИГНАТУРЫ И КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПУХОЛЕЙ

Обнаружена связь между такими характеристиками ЗНО, как развитие резистентности к таргетным препаратам, способность к метастазированию, общая выживаемость больных, и APOBEC-специфичными мутациями в их клетках [46, 47, 54, 55].

В работе на немелкоклеточном раке легкого H. Isozaki и соавт., используя полногеномное и полноэкзомное секвенирование, показали *in vivo* и *in vitro*, что лечение часто используемыми в клинической практике таргетными препаратами вызывает индукцию экспрессии *APOBEC3A*, но не других *APOBEC*, в тех клетках опухоли, которые переживают химиотерапевтические воздействия [54]. Индуцированная терапией *APOBEC3A* стимулирует образование двунитевых разрывов ДНК и геномную нестабильность в виде мутационных сигнатур 2 и 13 в этих клетках. Так, в опухоли от больного, прошедшего лечение последовательно несколькими ингибиторами тирозинкиназ, APOBEC-специфичные сигнатуры составили 73,9–93,5 %, тогда как до лечения они выявлялись с частотой 5,5 %. Экспериментальная делеция *APOBEC3A* вела к снижению частоты APOBEC3A-специфичных мутационных сигнатур и структурных перестроек генома, при этом замедлялось наступление резистентности к таргетной терапии. Индукция *APOBEC3A* под действием таргетных препаратов происходила при участии транскрипционного ядерного фактора κB (NFκB). Показав, что индукция *APOBEC3A* под действием таргетной терапии ведет к эволюции переживших это воздействие опухолевых клеток, авторы предположили, что подавление экспрессии *APOBEC3A* или активности соответствующего фермента может стать способом предупреждения или отсрочки резистентности немелкоклеточного рака легкого к таргетным препаратам.

Сходные результаты опубликовали N.M.G. Garcia и соавт., наблюдавшие значительное усиление экспрессии APOBEC3A и APOBEC3B под действием ингибиторов рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), что приводило к увеличению выживаемости клеток немелкоклеточного рака легкого после лечения этими ингибиторами [55].

Сочетание эффектов эндогенного (APOBECs) и экзогенного (табачный дым) мутагенов в случае рака легкого исследовали T. Zhang и соавт. [53]. На материалах от 309 курящих больных этой формой рака по результатам полногеномного и транскриптомного анализов они выделили группы с высоким и низким уровнями APOBEC-специфичных мутационных сигнатур. Оказалось, что у больных 1-й группы, у которых в раковых клетках преобладали APOBEC3A-специфичные сигнатуры, начало развития рака фиксировалось достоверно позже, и клональная экспансия у них шла медленнее, чем у больных 2-й группы, где в клетках опухоли преобладали APOBEC3B-индуцированные сигнатуры. Эти результаты указывают на важность продолжения изучения комбинированных воздействий разных мутагенов при развитии злокачественных опухолей.

Результаты исследования M. Tsuboi и соавт. свидетельствовали о том, что уровень экспрессии *APOBEC3B* может служить индикатором агрессивности РМЖ [46]. Авторы использовали операционный материал от 93 больных с первичными опухолями, а также нормальную ткань молочной железы от 37 из этих больных; экспрессию *APOBEC3B* оценивали в ОТ-ПЦР в реальном времени; транскрипционную активность других *APOBEC* не исследовали. Оказалось, что по сравнению с нормальными тканями молочной железы в опухолях имела место гиперэкспрессия *APOBEC3B*; она коррелировала с метастазами опухолей в лимфатических узлах, а также со степенью патологии клеточных ядер (pathological nuclear grade).

Транскрипционная активность APOBEC3B в отдаленных метастазах РМЖ была достоверно выше, чем в первичных опухолях; для метастазов в регионарных лимфатических узлах различий обнаружено не было [47]. Анти-APOBEC3B-терапия, по мнению этих исследователей, может оказаться перспективной при лечении поздних стадий РМЖ.

Рак мочевого пузыря, как и рак легкого и РМЖ, принадлежит к числу злокачественных опухолей, во многих из которых APOBEC-специфичные мутационные сигнатуры обнаруживаются с высокой частотой [1, 2]. A.P. Glaser и соавт. изучили общую выживаемость больных раком мочевого пузыря, используя несколько баз данных, в том числе TCGA. Опухоли разбили на 2 группы: с высоким содержанием APOBEC-специфичных сигнатур (324 случая) и с низким их содержанием (64 случая) [56]. Общая выживаемость пациентов с опухолями 1-й группы оказалась достоверно выше, чем общая выживаемость пациентов с опухолями 2-й группы (38,2 мес по сравнению с 18,5 мес; $p = 0{,}005$). Опухоли 1-й группы часто содержали мутации в генах, реагирующих на повреждение ДНК (*TP53*, *ATR*, *BRCA2*), а также в генах, регулирующих состояние хроматина (*ARID1A*, *MLL*, *MLL3*), тогда как в опухолях 2-й группы мутации чаще затрагивали онкогены (*FGFR3, KRAS*). Экспрессия *APOBEC 3A* и *APOBEC3B* коррелировала с мутационной нагрузкой в раке мочевого пузыря независимо от молекулярного подтипа опухолей. Опухоли 1-й группы, в отличие от опухолей 2-й группы, характеризовались повышенной экспрессией многочисленных генов, ответственных за иммунную защиту. Итак, дезаминазы APOBEC, обусловливая появление новых эпитопов в опухолевых клетках и иммунный ответ на эти клетки, в случае рака мочевого пузыря улучшают прогноз заболевания.

Факты, свидетельствующие о вероятном участии APOBEC-ассоциированных мутационных сигнатур в приобретении злокачественными опухолями большей гетерогенности клеток, резистентности к химиотерапевтическим препаратам, а также способности к метастазированию, позволили выдвинуть на первый план вопрос о целесообразности искусственного ингибирования этих ферментов у онкологических больных [47, 54]. Разработки в данном направлении ведутся, однако ряд обстоятельств служит предупреждением о недостаточной обоснованности и преждевременности таких попыток. Так, M. Petljak и соавт. отмечают, что механизмы регуляции этих ферментов в нормальных и опухолевых тканях изучены недостаточно и побочные эффекты от их искусственного подавления неочевидны; предсказания последствий от воздействия на определенную цитидиндезаминазу в конкретном типе опухоли противоречивы из-за недостатка наблюдений [57]. Эти авторы не исключают, что, напротив, активация этих мутаторов в опухолях при современном уровне знаний в данной области может приводить к благоприятному терапевтическому результату благодаря индукции гибели опухолевых клеток, приобретших повреждения ДНК с участием APOBEC3, или благодаря появлению в опухолевых клетках новых эпитопов, что повысит эффективность иммунотерапии. Высказано предположение о возможной результативности использования APOBEC-специфичных мутационных сигнатур в качестве предиктивных маркеров ответа на ингибиторы иммунных чекпойнтов в химиотерапии РМЖ [58].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

APOBEC-ассоциированные мутации представляют собой один из наиболее распространенных видов мутаций в ЗНО, они выявлены приблизительно в 75 % типов опухолей, более чем в 50 % всех новообразований. Основными генераторами мутаций в опухолевых клетках являются цитидиндезаминазы APOBEC3A и APOBEC3B. Оба эти фермента предпочтительно дезаминируют цитидин в составе нуклеотида, которому предшествует тимидиловый нуклеотид (5’-TC), при этом APOBEC3A дезаминирует цитидин, если мотиву 5’-TC предшествует пиримидин, а APOBEC3B – в случаях, когда предшественником является пурин. В РМЖ большинство APOBEC-специфичных мутационных сигнатур вызваны APOBEC3A; вместе с тем в опухолях разных локализаций активность этих цитидиндезаминаз может варьировать. В ЗНО, в которых APOBEC-специфичных мутаций много, эти мутации, по-видимому, могут вносить лепту в канцерогенез. Установлена связь между некоторыми клиническими характеристиками ЗНО, такими как развитие резистентности к таргетным препаратам, способность к метастазированию, общая выживаемость больных, и имеющимися в их клетках APOBEC-специфичными мутационными сигнатурами.

Имеются основания ожидать новых открытий в этой области, учитывая большой интерес исследователей к семейству AID/APOBEC. Двумя направлениями, на которых это произойдет, представляются, во-первых, прояснение участия представителей этого семейства в генезе распространенных форм рака (молочной и предстательной желез, легкого и др.) совместно с онкогенными вирусами, включая вирус папилломы человека, и, во-вторых, анализ перспективности искусственного воздействия на экспрессию этих белков для лечения онкологических больных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. Nature 2013;500(7463):415–21. DOI: 10.1038/nature12477
2. Alexandrov L.B., Kim J., Haradhvala N. et al. The repertoire of mutational signatures in human cancer. Nature 2020;578(7793):94–101. DOI: 10.1038/s41586-020-1943-3
3. Yang B., Lei L., Chen J.J. APOBEC: from mutator to editor. Genet Genomics 2017;44(9):423–37. DOI: 10.1016/j.jgg.2017.04.009
4. Warren C.J., Santiago M.L., Pyeon D. APOBEC3: friend or foe in human papillomavirus infection and oncogenesis? Annu Rev Virol 2022;9(1):375–95. DOI: 10.1146/annurev-virology-092920-030354
5. Castilha E.P., Biondo R., Trugilo K.P. et al. APOBEC3 proteins: from antiviral immunity to oncogenic drivers in HPV-positive cancers. Viruses 2025;17(3):436. DOI: 10.3390/v17030436
6. Salter J.D., Bennett R.P., Smith H.C. The APOBEC protein family: united by structure, divergent in function. Trends Biochem Sci 2016;41(7):578–94. DOI: 10.1016/j.tibs.2016.05.001
7. Шилова О.Н., Цыба Д.Л., Шилов Е.С. Мутагенная активность дезаминаз AID/APOBEC в противовирусной защите и канцерогенезе. Молекулярная биология 2022;56(1):55–68. DOI: 10.1134/S002689332201006X
   Shilova O.N., Tsyba D.L., Shilov E.S. Mutagenic activity of AID/APOBEC deaminases in antiviral defense and carcinogenesis. Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology 2022;56(1):55–68. (In Russ.). DOI: 10.1134/S002689332201006X
8. Chen S.H., Habib G., Yang C.Y. et al. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. Science 1987;238(4825):363–6. DOI: 10.1126/science.3659919
9. Dananberg A., Striepen J., Rozowsky J.S., Petljak M. APOBEC mutagenesis in cancer development and susceptibility. Cancers (Basel) 2024;16(2):374. DOI: 10.3390/cancers16020374
10. Conticello S.G., Thomas C.J.F., Petersen-Mahrt S.K., Neuberger M.S. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy) cytidine deaminases. Mol Biol Evol 2005;22(2):367–77. DOI: 10.1093/molbev/msi026
11. Conticello S.G. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. Genome Biol 2008;9(6):229. DOI: 10.1186/gb-2008-9-6-229
12. Hayward J.A., Tachedjian M., Cui J. et al. Differential evolution of antiretroviral restriction factors in pteropid bats as revealed by APOBEC3 gene complexity. Mol Biol Evol 2018;35(7):1626–37. DOI: 10.1093/molbev/msy048
13. Harris R.S., Dudley J.P. APOBECs and virus restriction. Virology 2015:479-480:131–45. DOI: 10.1016/j.virol.2015.03.012
14. Lackey L., Law E.K., Brown W.I. et al. Subcellular localization of the APOBEC3 proteins during mitosis and implications for genomic DNA deamination. Cell Cycle 2013;12(5):762–72. DOI: 10.4161/cc.23713
15. Burns M.B., Lackey L., Carpenter M.K. et al. APOBEC3B is an enzymatic source of mutations in breast cancer. Nature 2013;494(7437):366–70. DOI: 10.1038/nature11881
16. Chan K., Roberts S.A., Klimczak L.J. et al. An APOBEC3A hypermutation signature is distinguishable from the signature of background mutagenesis by APOBEC3B in human cancers. Nat Genet 2015;47(9):1067–72. DOI: 10.1038/ng.3378
17. Тихонов А.С., Минтаев Р.Р., Глазкова Д.В. и др. Фактор рестрикции ВИЧ APOBEC3G и перспективы его использования в генной терапии ВИЧ-инфекции. Молекулярная биология 2022;56(4):546–56. DOI: 10.31857/S0026898422040115
    Tikhonov A.S., Mintaev R.R., Glazkova D.V. et al. HIV restriction factor APOBEC3G and prospects for its use in gene therapy for HIV. Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology 2022;56(4):546–56. (In Russ.). DOI: 10.31857/S0026898422040115
18. Pecori R., Di Giorgio S., Lorenzo J.P., Papavasiliou F.N. Functions and consequences of AID/APOBEC-mediated DNA and RNA deamination. Nat Rev Genet 2022;23(8):505–18. DOI: 10.1038/s41576-022-00459-8
19. Muramatsu M., Kinoshita K., Fagarasan S. et al. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. Cell 2000;102(5):553–63. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)00078-7
20. Navaratnam N., Morrison J.R., Bhattacharya S. et al. The p27 catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme is a cytidine deaminase. J Biol Chem 1993;268(28):20709–12.
21. Teng B., Burant C.F., Davidson N.O. Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. Science 1993;260(5115):1816–9. DOI: 10.1126/science.8511591
22. Liao W., Hong S.H., Chan B.H. et al. APOBEC-2, a cardiac- and skeletal muscle-specific member of the cytidine deaminase supergene family. Biochem Biophys Res Commun 1999;260(2):398–404. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0925
23. Anant S., Henderson J.O., Mukhopadhyay D. et al. Novel role for RNA-binding protein CUGBP2 in mammalian RNA editing. CUGBP2 modulates C to U editing of apolipoprotein B mRNA by interacting with apobec-1 and ACF, the apobec-1 complementation factor. J Biol Chem 2001;276(50):47338–51. DOI: 10.1074/jbc.M104911200
24. Jarmuz A., Chester A., Bayliss J. et al. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNAediting enzymes on chromosome 22. Genomics 2002;79(3):285–96. DOI: 10.1006/geno.2002.6718
25. Zhang D., Zhu L., Gao Y. et al. RNA editing enzymes: structure, biological functions and applications. Cell Biosci 2024;14(1):34. DOI: 10.1186/s13578-024-01216-6
26. Wedekind J.E., Dance G.S., Sowden M.P., Smith H.C. Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. Trends Genet 2003;19(4):207–16. DOI: 10.1016/S0168-9525(03)00054-4
27. Rogozin I.B., Basu M.K., Jordan I.K. et al. APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy) cytidine deaminases predicted by computational analysis. Cell Cycle 2005;4(9):1281–5. DOI: 10.4161/cc.4.9.1994
28. Kinishita K., Honjo T. Linking class-switch recombination with somatic hypermutation. Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2(7): 493–503. DOI: 10.1038/35080033
29. Madani N., Kabat D. An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein. J Virol 1998;72:10251–5. DOI: 10.1128/JVI.72.12.10251-10255.1998
30. Simon J.H., Gaddis N.C., Fouchier R.A., Malim M.H. Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. Nat Med 1998;4(12):1397–400. DOI: 10.1038/3987
31. Sheehy A.M., Gaddis N.C., Choi J.D., Malim M.H. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. Nature 2002;418:646–50. DOI: 10.1038/nature00939
32. Harris R.S., Petersen-Mahrt S.K., Neuberger M.S. RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. Mol Cell 2002;10(5):1247–53. DOI: 10.1016/s1097-2765(02)00742-6
33. Harris R.S., Bishop K.N., Sheehy A.M. et al. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. Cell 2003;113(6):803–9. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00423-9
34. Warren C.J., Westrich J.A., Doorstaer K., Pyeon D. Roles of APOBEC3A and APOBEC3B in human papillomavirus infection and disease progression. Viruses 2017;9(8):233. DOI: 10.3390/v9080233

35. Petljak M., Maciejowski J. Molecular origins of APOBEC-associated mutations in cancer. DNA Repair (Amst) 2020;94:102905. DOI: 10.1016/j.dnarep.2020.102905
36. Nik-Zainal S., Alexandrov L.B., Wedge D.C. et al. Mutational processes molding genomes of 21 breast cancers. Cell 2012;149(5):979–93. DOI: 10.1016/j.cell.2012.04.024
37. Buisson R., Langenbucher A., Bowen D. et al. Passenger hotspot mutations in cancer driven by APOBEC3A and mesoscale genomic features. Science 2019;364(6447):eaaw2872. DOI: 10.1126/science.aaw2872
38. Langenbucher A., Bowen D., Sakhteman R. et al. An extended APOBEC3A mutation signature in cancer. Nat Commun 2021;12(1):1602. DOI: 10.1038/s41467-021-21891-0
39. Sanchez A., Ortega P., Sakhtelmani R. et al. Mesoscale DNA features impact APOBEC3A and APOBEC3B deaminase activity and shape tumor mutational landscapes. Nat Commun 2024;15(1):2370. DOI: 10.1038/s41467-024-45909-5
40. Petljak M., Dananberg A., Chu K. et al. Mechanisms of APOBEC3 mutagenesis in human cancer cells. Nature 2022;607(7920):799–807. DOI: 10.1038/s41586-022-04972-y
41. Kidd J.M., Newman T.L., Tuzun E. et al. Population stratification of a common APOBEC gene deletion polymorphism. PLoS Genet 2007;3(4):e63. DOI: 10.1371/journal.pgen.0030063
42. Xuan D., Li G., Cai Q. et al. APOBEC3 deletion polymorphism is associated with breast cancer risk among women of European ancestry. Carcinogenesis 2013;34(10):2240–3. DOI: 10.1093/carcin/bgt185
43. Nik-Zainal S., Wedge D.C., Alexandrov L.B. et al. Association of a germline copy number polymorphism of APOBEC3A and APOBEC3B with burden of putative APOBEC-dependent mutations in breast cancer. Nat Genet 2014;46(5):487–91. DOI: 10.1038/ng.2955
44. Carpenter M.A., Temiz N.A., Ibrahim M.A. et al. Mutational impact of APOBEC3A and APOBEC3B in a human cell line and comparisons to breast cancer. PLoS Genet 2023;19(11):e1011043. DOI: 10.1371/journal.pgen.1011043
45. Burns M.B., Temiz N.A., Harris R.S. Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. Nat Genet 2013;45(9):977–83. DOI: 10.1038/ng.2701
46. Tsuboi M., Yamane A., Horiguchi J. et al. APOBEC3B high expression status is associated with aggressive phenotype in Japanese breast cancers. Breast Cancer 2016;23(5):780–8. DOI: 10.1007/s12282-015-0641-8
47. Sieuwerts A.M., Schrijver W.A., Dalm S.U. et al. Progressive APOBEC3B mRNA expression in distant breast cancer metastases. PLoS One 2017;12(1):e0171343. DOI: 10.1371/journal.pone.0171343
48. Cortez L.M., Brown A.L., Dennis M.A. et al. APOBEC3A is a prominent cytidine deaminase in breast cancer. PLoS Genet 2019;15(12):e1008545. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008545
49. Roberts S.A., Lawrence M.S., Klimczak L. et al. An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. Nat Genet 2013;45(9):970–6. DOI: 10.1038/ng.2702
50. Douville C., Carter H., Kim R. et al. CRAVAT: cancer-related analysis of variants toolkit. Bioinformatics 2013;29(5):647–8. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt017
51. Forbes S.A., Bhamra G., Bamford S. et al. The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). Curr Protoc Hum Genet 2008 Apr:Chapter 10:Unit 10.11. DOI: 10.1002/0471142905.hg1011s57
52. Futreal P.A., Coin L., Marshall M. et al. A census of human cancer genes. Nat Rev Cancer 2004;4(3):177–83. DOI: 10.1038/nrc1299
53. Zhang T., Sang J., Hoang P.H. et al. APOBEC affects tumor evolution and age at onset of lung cancer in smokers. Nat Commun 2025;16(1):4711. DOI: 10.1038/s41467-025-59923-8
54. Isozaki H., Sakhtemani R., Abbasi A. et al. Therapy-induced APOBEC3A drives evolution of persistent cancer cells. Nature 2023;620(7973):393–401. DOI: 10.1038/s41586-023-06303-1
55. Garcia N.M.G., Becerra J.N., Srinivasan S. et al. APOBEC3 activity promotes the survival and evolution of drug-tolerant persister cells during EGFR inhibitor resistance in lung cancer. Cancer Res Commun 2025;5(5):825–40. DOI: 10.1158/2767-9764.CRC-24-0442
56. Glaser A.P., Fantini D., Wang Y. et al. APOBEC-mediated mutagenesis in urothelial carcinoma is associated with improved survival, mutations in DNA damage response genes, and immune response. Oncotarget 2018;9(4):4537–48. DOI: 10.18632/oncotarget.23344
57. Petljak M., Green A.M., Maciejowski J., Weitzman M.D. Addressing the benefits of inhibiting APOBEC3-dependent mutagenesis in cancer. Nat Genet 2022;54(11):1599–608. DOI: 10.1038/s41588-022-01196-8
58. Lu H., Lu Z., Wang Y. et al. APOBEC in breast cancer: a dual player in tumor evolution and therapeutic response. Front Mol Biosci 2025;12:1604313. DOI: 10.3389/fmolb.2025.1604313

ORCID автора / ORCID of author
Г.М. Волгарева / G.M. Volgareva: https://orcid.org/0000-0002-6817-2103

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

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

Статья поступила: 18.02.2025. **Принята к публикации:** 24.09.2025. **Опубликована онлайн:** 10.12.2025.
Article submitted: 18.02.2025. **Accepted for publication:** 24.09.2025. **Published online:** 10.12.2025.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-62-72

Вирус Эпштейна–Барр и рак носоглотки: современный взгляд на проблему Часть 1. Вирус Эпштейна–Барр и его свойства

В.Э. Гурцевич[1], Н.Б. Сенюта[1], К.В. Смирнова[1–3]

[1]Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;
[2]ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117513 Москва, ул. Островитянова, 1;
[3]ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Контакты: Владимир Эдуардович Гурцевич *gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru*

Вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ) инфицировано практически все население планеты. Заражение происходит в детском возрасте и, как правило, без каких-либо клинических манифестаций у инфицированных лиц. В то же время, обладая трансформирующим потенциалом, при наличии неблагоприятных факторов ВЭБ может включиться в патологический процесс, приводящий к развитию опухоли. Изучение свойств этого вируса и условий проявления его онкогенного потенциала представляет важный раздел науки об онкогенных вирусах и опухолях человека вирусного происхождения.
Цель работы – обобщение и систематизация данных литературы, посвященных изучению ВЭБ – первого онкогенного вируса человека.
Проанализированы публикации по теме, поиск которых осуществляли в базах данных Scopus, Web of Science, eLibrary, PubMed, Российский индекс научного цитирования (РИНЦ) и др. В первой части обзора представлены краткая история открытия ВЭБ, его структура, пути передачи и циркуляция в организме, типы латенции и функции латентных генов вируса, а также приведен спектр ВЭБ-ассоциированных новообразований лимфоидного и эпителиального происхождения. Особое внимание уделено раку носоглотки, факторам риска его возникновения и роли ВЭБ в канцерогенезе.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, структура вируса Эпштейна–Барр, хроническая инфекция, латентный белок, сигнальный путь, рак носоглотки, фактор риска

Для цитирования: Гурцевич В.Э., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В. Вирус Эпштейна–Барр и рак носоготки: современный взгляд на проблему. Часть 1. Вирус Эпштейна–Барр и его свойства. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(4):62–72.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-62-72

Epstein–Barr virus and nasopharyngeal carcinoma: current view at the problem Part 1. Epstein–Barr virus and its properties

V.E. Gurtsevitch[1], N.B. Senyuta[1], K.V. Smirnova[1–3]

[1]Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;
[2]N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117513, Russia;
[3]Russian Peoples’ Friendship University; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

Contacts: Vladimir Eduardovich Gurtsevitch *gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru*

Almost the entire population of the planet is infected with the Epstein–Barr virus. Infection occurs in childhood and, as a rule, without any clinical manifestations in infected individuals. At the same time, having a transformation potential, the virus, in the presence of unfavorable factors, can become involved in the pathological process leading to the development of a tumor. The study of the properties of EBV and the conditions for the manifestation of its oncogenic potencies represents an important branch of the science of oncogenic viruses and human tumors of viral origin.
Aim. To summarize and systematize literature data, including those that have appeared recently and devoted to the study of EBV, the first human oncogenic virus.

The work was carried out based on the analysis of published works, the search for which was carried out in the databases Web of Science, Scopus, eLibrary, PubMed, Russian Index of Science Citation (RISC), etc.
The review provides a brief history of the discovery of EBV, describes its structural organization, analyzes the transmission routes and EBV circulation in the body, analyzes the types of latency and functions of latent virus genes, and also provides a spectrum of EBV-associated neoplasms of lymphoid and epithelial origin. Particular attention was paid to nasopharyngeal carcinoma, risk factors for its occurrence and the role of EBV in the carcinogenesis.

Keywords: Epstein–Barr virus, Epstein–Barr virus structure, chronic infection, latent protein, signaling pathway, nasopharyngeal cancer, risk factor

For citation: Gurtsevitch V.E., Senyuta N.B., Smirnova K.V. Epstein–Barr virus and nasopharyngeal carcinoma: current view at the problem. Part 1. Epstein–Barr virus and its properties. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(4):62–72. (In Russ.).
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-62-72

ВВЕДЕНИЕ

Среди онкогенных вирусов человека вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) обладает уникальными свойствами. Этот широко распространенный среди населения планеты вирус одновременно является лидером по числу ассоциированных с ним доброкачественных и злокачественных новообразований лимфоидного и эпителиального происхождения. Онкогенный потенциал ВЭБ связан с его способностью инфицировать и трансформировать различные клетки человека. В тех случаях, когда взаимодействие между размножением ВЭБ, его латентным состоянием и иммунным контролем со стороны организма нарушается, создаются условия для длительной пролиферации инфицированных ВЭБ клеток и их злокачественной трансформации. По мнению ряда исследователей, молекулярные механизмы связанного с ВЭБ канцерогенеза обусловлены способностью вирусного генома стимулировать экспрессию серии продуктов, имитирующих ряд факторов роста, транскрипции и оказывающих антиапоптотическое действие. Эти кодируемые ВЭБ продукты нарушают сигнальные пути, которые регулируют различные клеточные функции гомеостаза, наделяя клетку способностью к неограниченной пролиферации. Тем не менее точный механизм, с помощью которого ВЭБ инициирует онкогенез, остается невыясненным. В первой части обзора приводится обобщающая информация о структуре и онкогенном потенциале ВЭБ, а также его роли в патогенезе связанных с этим вирусом новообразований.

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР

История открытия ВЭБ связана с обнаружением в 1950-х годах ирландским хирургом Денисом Беркиттом (рис. 1) ранее неизвестной формы детской В-клеточной лимфомы в эндемичных по заболеваемости малярией странах Экваториальной Африки. Он предположил, что этиологическим агентом наблюдаемых им лимфом может быть вирус, передаваемый членистоногими переносчиками, в частности комаром *Anopheles* [1]. Результаты экспедиций и свою гипотезу Д. Беркитт в 1961 г. изложил на заседании хирургического отделения лондонской больницы Миддлсекс, на котором случайно оказался английский вирусолог Энтони Эпштейн (см. рис. 1). Молодого исследователя, ведущего поиски онкогенных вирусов человека, очень заинтересовало это сообщение. По его просьбе из следующей экспедиции Д. Беркитта в лондонскую лабораторию Э. Эпштейна доставили фрагмент опухоли. Опухолевая ткань была распадающейся, для исследования непригодной, но на всякий случай Э. Эпштейн и его аспирантка Ивонна Барр (см. рис. 1) решили посмотреть под электронным микроскопом содержание питательной среды, в которой находилась опухоль.

Д. Беркитт / *D. Burkitt* (1911–1993) Э. Эпштейн / *E. Epstein* (1921–2024) И. Барр / *I. Barr* (1932–2016)

Рис. 1. *Первооткрыватели лимфомы Беркитта и первого онкогенного вируса человека – вируса Эпштейна–Барр*
Fig. 1. *Discoverers of Burkitt's lymphoma and the first oncogenic human virus – Epstein–Barr virus*

Исследователи были удивлены, обнаружив среди плавающих клеток присутствие герпес-вирусоподобных частиц. Так был открыт вирус, названный в честь ученых, его нашедших, – вирус Эпштейна–Барр. К 1965 г. Э. Эпштейн и И. Барр создали клеточные линии лимфомы, названной в честь Д. Беркитта лимфомой Беркитта (ЛБ), а американские исследователи Вернер и Гертруда Хенле после всестороннего изучения этого вируса доказали, что он биологически и антигенно отличается от других известных герпетических вирусов [2]. Однако высокая серологическая распространенность ВЭБ в человеческих популяциях во всем мире заставила исследователей отказаться от предположения, что данный вирус является непосредственным этиологическим агентом африканской ЛБ. Причинно-следственная связь между ВЭБ и ЛБ все же была позже подтверждена более высокими титрами антител к антигенам ВЭБ у больных ЛБ по сравнению с титрами этих антител у здоровых лиц. Также было обнаружено, что ЛБ, кроме ассоциации с ВЭБ, характеризуется специфической хромосомной транслокацией t(8;14)(q24;q32), при которой ген *MYC* транслоцируется в активный локус гена иммуноглобулина – это событие, предшествующее развитию ЛБ. Результаты последующих исследований показали, что ВЭБ является своего рода триггером сигнала выживания, поддерживающего рост и клональную экспансию инфицированных им клеток на ранней стадии канцерогенеза [3]. Позже было обнаружено, что ВЭБ ассоциирован не только с ЛБ, но и с широким спектром злокачественных новообразований (ЗНО) лимфоидного и эпителиального происхождения.

ВИРУС ЭПШТЕЙНА–БАРР: СТРОЕНИЕ, ПУТИ ПЕРЕДАЧИ И ЦИРКУЛЯЦИЯ В ОРГАНИЗМЕ

Открытый в 1964 г. ВЭБ стал первым онкогенным вирусом человека, которым инфицировано более 90 % населения планеты [4]. Россия в этом отношении не стала исключением [5]. Результаты исследований показали, что с ВЭБ связаны более 200 тыс. случаев различных патологий и 1,8 % случаев смерти от ЗНО. По заключению Всемирной организации здравоохранения ВЭБ отнесен к канцерогенам человека класса I [6].

Согласно данным Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses) ВЭБ относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Gammaherpesvirinae*, роду *Lymphocryptovirus*, виду *Human herpesvirus 4* [7]. Геном ВЭБ представляет собой двуспиральную молекулу ДНК длиной 170–185 тыс. пар нуклеотидов, включающую около 90 возможных кодирующих областей и множество некодирующих РНК [8, 9] (рис. 2).

Вирионная ДНК представлена в линейной форме. В инфицированных клетках вирусная ДНК, как правило, не встроена в клеточный геном, а находится в ядре экстрахромосомно в виде замкнутого кольца (эписомы), которое образуется в результате циркуляции вирусного генома по его терминальным повторам. Считается, что эписомальная ДНК необходима для реализации полноценной репликации ВЭБ, завершающейся формированием вирусных частиц. Характерная черта вируса – наличие в нем большого числа повторов, различающихся в его разных штаммах и определяющих структурное и функциональное многообразие ряда кодируемых вирусом белков. Спектр хозяев для *Lymphocryptovirus* ограничивается отрядом приматов Старого Света; единственным природным хозяином ВЭБ является человек.

Вирус Эпштейна–Барр обычно инфицирует носителя в раннем детстве и сохраняется на протяжении всей жизни у >90 % людей в латентном состоянии, которое сопровождается хроническим течением вирусной инфекции [10]. В то же время, обладая большим количеством адаптивных механизмов для предотвращения литической реактивации и снижения враждебности иммунных клеток хозяина [11], у части инфицированных лиц под влиянием неблагоприятных факторов вирус приобретает способность индуцировать опухоли эпителиального и лимфоидного происхождения [12].

Позднее первичное заражение ВЭБ у подростков или молодых людей может привести к развитию инфекционного мононуклеоза, который характеризуется пролиферацией В-клеток, инфицированных ВЭБ и активным Т-клеточным ответом [13]. Доказано, что возникновение инфекционного мононуклеоза, в свою очередь, связано с повышенным риском развития лимфомы Ходжкина и рассеянного склероза [14, 15]. Передача ВЭБ происходит воздушно-капельным путем, главным образом через слюну (вирус поцелуя). При попадании в ротоглотку вирус инфицирует миндалины хозяина, где в первую очередь проникает в покоящиеся (наивные) В-клетки и эпителиальные клетки. В большинстве покоящихся В-клеток ВЭБ вызывает латентную инфекцию, хотя небольшая их часть может быть инфицирована продуктивно и перейти в стадию литической инфекции в результате экспрессии латентных генов при получении стресс-сигналов или из-за неблагоприятных условий внеклеточной среды. При экспрессии латентных генов вируса латентно инфицированные наивные В-клетки активируются и проходят этап быстрого размножения, а затем, попадая в зародышевый центр, переходят к более ограниченной форме вирусной латентности, дифференцируясь в покоящиеся В-клетки памяти (рис. 3).

На данном этапе в покоящихся В-клетках памяти ВЭБ почти полностью прекращает экспрессию своих генов, сохраняя все же персистенцию, а инфицированные В-клетки памяти рециркулируют в периферической крови на протяжении всей жизни хозяина. При воздействии определенных факторов покоящиеся В-клетки памяти могут дифференцироваться в плазматические клетки, снова входить в состояние литической инфекции и продуцировать инфекционные вирионы. Эти вирионы лишены мембранного белка gp42 (незаменимого члена триггерного комплекса для проникновения ВЭБ в В-клетки) и более тропны к эпителию. После заражения эпителиальных клеток вирус размножается и лизирует эпителиальные клетки, высвобождая в слюну вирионы уже с высоким уровнем gp42, тропные к В-клеткам, и запуская новый цикл передачи ВЭБ-инфекции [17].

ЛАТЕНТНЫЕ ГЕНЫ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР И ФУНКЦИИ ИХ БЕЛКОВ

В ходе эволюции ВЭБ приобрел уникальный набор латентных, так называемых рост-трансформирующих генов, вовлеченных в процесс канцерогенеза.

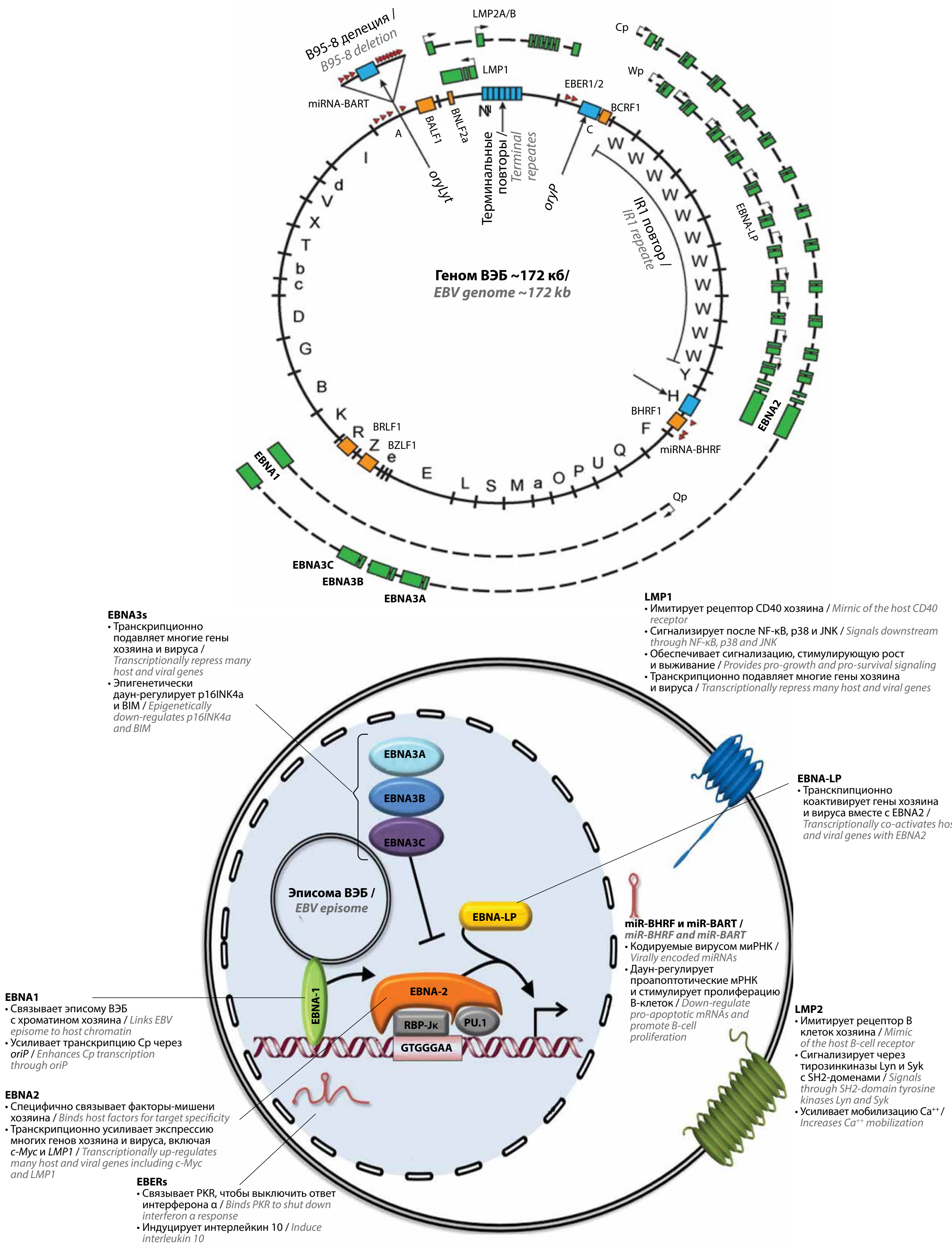


Рис. 2. *Структурная организация генома вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) и кодируемые им белки. NF-κB – транскрипционный ядерный фактор κB; мРНК – матричная РНК*

Fig. 2. *Structural organization of the Epstein–Barr virus (EBV) genome and the proteins it encodes. NF-κB – nuclear factor kappa B; mRNA – messenger RNA*

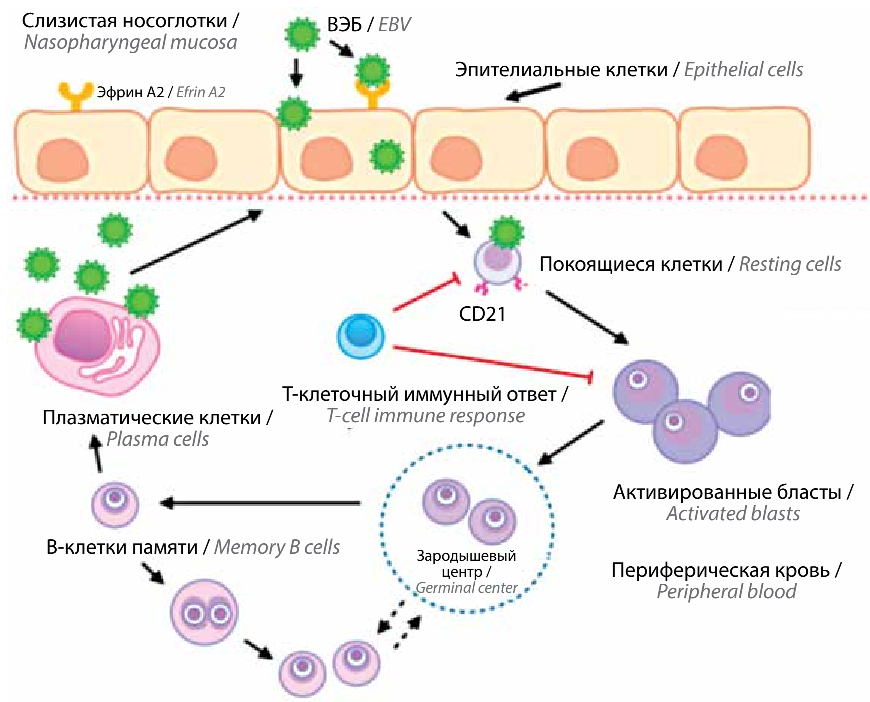


Рис. 3. *Жизненный цикл вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) [16]. Первичная ВЭБ-инфекция начинается в слизистой оболочке носоглотки. ВЭБ использует различные гликопротеины для инфицирования эпителиальных клеток через эфрин А2 и рецептор CD21 для проникновения в наивные В-клетки. При этом геном ВЭБ внедряется в ядро В-клетки, где начинается процесс репликации вируса. Вирусные белки вируса активируют программу роста В-клеток, что приводит к пролиферации бластных В-клеток. При попадании в кровообращение ранее активированные В-клетки памяти могут подвергаться литической репликации. Если же ВЭБ отключает большинство своих генов, кодирующих белки, он может перейти в латентное состояние. Позже В-клетки памяти способны активироваться, что приводит к реактивации и выделению вирусных частиц в кровоток*

Fig. 3. *Life cycle of Epstein–Barr virus (EBV) [16]. Primary EBV infection begins in the mucous membrane of the nasopharynx. EBV uses various glycoproteins to infect epithelial cells via ephrin A2 and naive B cells via the CD21 receptor. The penetration of the virus is accompanied by the transport of the EBV genome into the nucleus of the B cell, where the process of viral replication begins. EBV gene products activate the B cell growth program, resulting in the proliferation of blast B cells. Previously activated memory B cells may continue to undergo lytic replication or, if EBV turns off most of its protein-coding genes, it enters a latent state. Later, memory B cells may be activated, leading to reactivation and viral release.*

Спектр их активации в разных инфицируемых клетках включает несколько вариантов, обозначаемых типами латенции (так называемые программы роста) (рис. 4) [18] Для содержащих вирусный геном лимфобластоидных клеточных линий характерен III тип латенции, включающий экспрессию кодируемых вирусом ядерных антигенов EBNA-1 (поддерживает среди прочего эписомальное состояние генома ВЭБ), EBNA-2, -3A, -3B, -3C и EBNA-LP (активаторы/регуляторы транскрипции), а также латентных мембранных белков LMP1, LMP2A и LMP2B (лиганднезависимые сигнальные рецепторы).

На низком уровне латенции экспрессируются EBER ВЭБ, малые некодирующие РНК и 2 блока микроРНК (BHRF1- и BART-miRNAs).

Для рака носоглотки (РНГ) и лимфомы Ходжкина характерна латенция II типа, сопровождаемая экспрессией EBNA-1, LMP1, LMP2A/2B, а также EBER и BART-miRNAs, которые в инфицированных ВЭБ клетках раздельно индуцируют дальнейшие генетические и эпигенетические изменения.

Последние способствуют приобретению нескольких признаков рака, которые включают бесконтрольный пролиферативный потенциал, уклонение от действия супрессоров роста, устойчивость к апоптозу, бессмертную репликацию, ангиогенез, инвазию и метастазирование, метаболическое перепрограммирование и уклонение от иммунного надзора [20]. Латентность, ограниченная промотором Wp, обнаружена в 15 % ВЭБ-положительных ЛБ (Wp-BL). Наконец, определяемый в клетках ВЭБ-положительной ЛБ вариант относится к латенции I типа, который характеризуется экспрессией EBNA-1, EBER и BART-miRNAs [19].

Среди латентных белков ВЭБ, в разной степени ответственных за трансформирующий потенциал вируса, большую роль играет LMP1, стимулирующий переход ВЭБ-инфицированных предраковых клеток в злокачественные [21]. Углубленное изучение LMP1 выявило трансформирующие свойства этого вирусного белка, проявляющиеся в активации множества клеточных сигнальных путей, таких как транскрипционный ядерный фактор κB (NF-κB), AP-1, фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и др. (рис. 5) [22].

Принципиальная важность сигнального пути NF-κB для канцерогенеза обусловлена его связью с такими процессами, как избегание апоптоза, клеточного

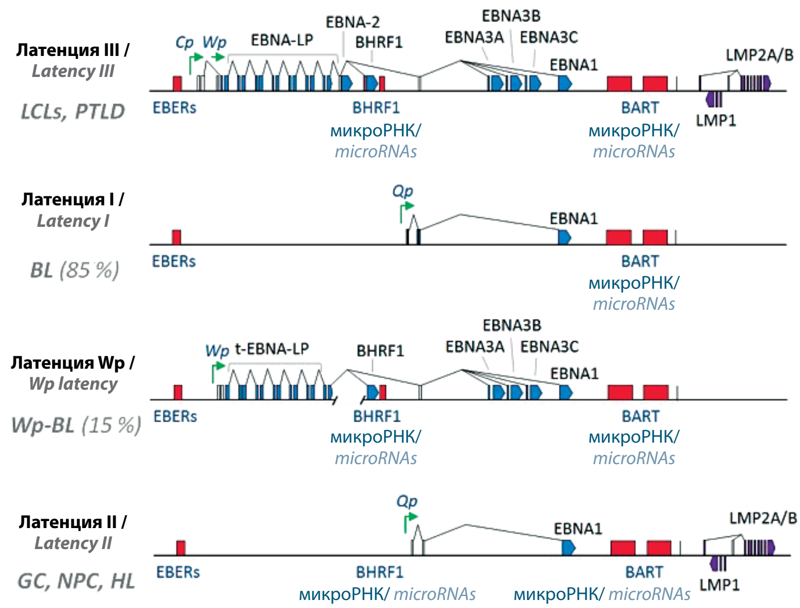


Рис. 4. *Паттерны экспрессии генов злокачественных новообразований, связанных с вирусом Эпштейна–Барр [19]. Латенция Wp – альтернативный режим экспрессии вирусных генов, при которой активен W-промотор (Wp), стимулирующий экспрессию всех EBNAs, кроме EBNA2; LCLs – лифобластоидные клеточные линии; PTLD – посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание; BL – лимфома Беркитта; Wp-BL – промотор экспрессии генов вируса Эпштейна–Барр в клетках лимфомы Беркитта; GC – рак желудка; NPC – рак носоглотки; HL – лимфома Ходжкина*

Fig. 4. *Gene expression patterns of Epstein–Barr virus associated malignancies [19]. Wp latency – alternative mode of viral gene expression in which the W-promoter (Wp) is active, stimulating the expression of all EBNAs except EBNA2; LCLs – lymphoblastic cell lines клеточные линии; PTLD – post-transplant lymphoproliferative disease; BL – Burkitt lymphoma; Wp-BL – promotor of Epstein–Barr virus gene expression in Burkitt lymphoma cells; GC – gastric cancer; NPC – nasopharyngeal cancer; HL – Hodgkin lymphoma*

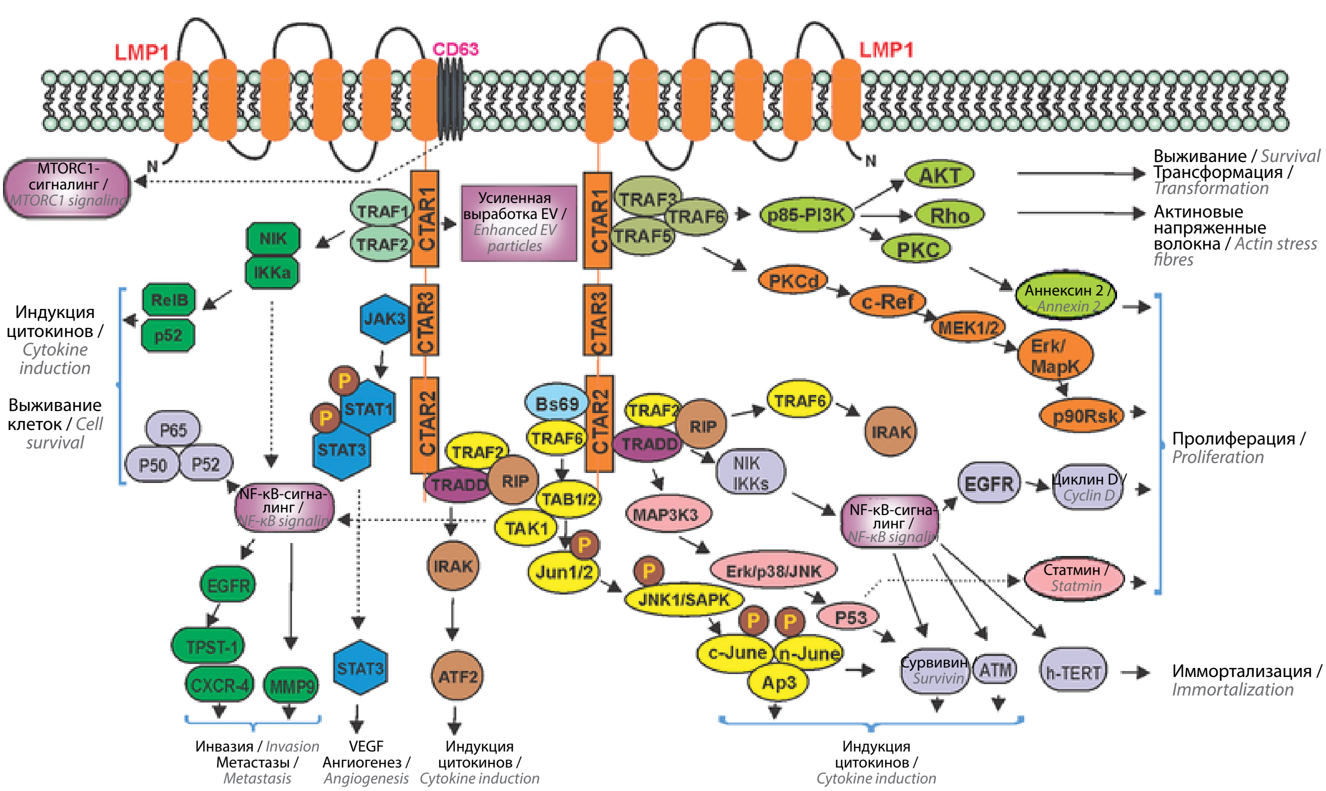


Рис. 5. *Схема передачи сигналов онкобелка LMP1 через С-концевые активирующие участки (CTAR), расположенные в цитоплазматическом С-концевом домене белка [22]. NF-κB – транскрипционный ядерный фактор κB; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; MMP9 – матриксная металлопротеиназа 9; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; EV – внеклеточные везикулы*

Fig. 5. *The signaling scheme of the LMP1 cancer protein through C-terminal activating sites (CTARs) located in the cytoplasmic C-terminal domain of the protein [22]. NF-κB – transcription nuclear factor κB; EGFR – epidermal growth factor receptor; MMP9 – matrix metalloproteinase 9; VEGF – vascular endothelial growth factor; EV – extracellular vesicles*

стресса, модификация метаболизма, приобретение опухолевыми клетками стволовости, уклонение от иммунных атак [23–25]. LMP1 ответственен за метастатические свойства опухолей, связанные с подавлением клеточной адгезии, усилением деструкции окружающей стромы и ангиогенезом [26].

Наиболее известными изоформами белка LMP1 являются LMP2A и LMP2B. В изоформе LMP2B отсутствует N-концевой домен из 19 аминокислот, обнаруженный в LMP2A, который модулирует клеточную передачу сигналов, что приводит к базовой активации В-клеток, деградации клеточных киназ и вызывает подавление нормальных сигнальных путей В-клеток. Эти 2 противоречивых процесса позволяют ВЭБ устанавливать и поддерживать латентную стадию. LMP2 экспрессируется во многих ЗНО, связанных с ВЭБ [27]. Транскрипционные белки-трансактиваторы ZEBRA и BRLF1, регулирующие латентную и литические фазы инфекции, также относятся к вирусным белкам, влияющим на канцерогенез. BZLF1 обладает функцией триггера – стимулирует переход ВЭБ от латентной фазы к литической, вызывая литический каскад вируса [28], не заканчивающийся, однако, формированием зрелых вирусных частиц [29]. ZEBRA представляет собой вирусный транскрипционный фактор, имитирующий клеточный транскрипционный фактор AP-1. ZEBRA участвует в трансактивации генов ВЭБ и различных генов клеток хозяина, связанных с пролиферацией, воспалением, ангиогенезом и метастазированием, подавляет гены, ассоциированные с апоптозом, главным комплексом гистосовместимости II класса и регуляторными факторами интерферона, обеспечивая устойчивость клеток к гибели и их уклонение от иммунного надзора [30]. ZEBRA также взаимодействует с различными клеточными белками, в том числе с NF-κB, и изменяет их функции [31]. Этот белок имеет и клиническую ценность. Экспрессия ZEBRA в тканях РНГ и повышение концентрации анти-ZEBRA IgG-антител в сыворотке крови являются биомаркерами неблагоприятного прогноза больных РНГ, а также ранней стадии заболевания [32].

ПАТОЛОГИИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА–БАРР

В отличие от других онкогенных вирусов человека, таких как вирусы папиллом (*Papillomaviridae*: *Alphapapillomavirus*: Human papillomavirus), полиомавирус клеток Меркеля (*Polyomaviridae*: *Alphapolyomavirus:* Human polyomavirus) 5, вирус Т-клеточного лейкоза взрослых 1-го типа (*Retroviridae*: *Deltaretrovirus*: Primate T-lymphotropic virus 1: Human T-lymphotropic virus 1) (HTLV-1), вирус гепатита В (*Hepadnaviridae*: *Orthohepadnavirus*: Hepatitis B virus) (HBV), проявляющих свой онкогенный потенциал только по отношению к определенным клеткам-мишеням, ВЭБ обладает широким клеточным тропизмом [33]. Благодаря этому свойству с ВЭБ связано возникновение целого спектра ЗНО лимфоидного и эпителиального происхождения. В частности, данный вирус является этиологическим агентом для 2 В- и T/NK-клеточных злокачественных лимфопролиферативных патологий – В-клеточных лимфопролиферативных расстройств и лимфопролиферативных нарушений NK-клеток (NK – естественные киллеры) – и причастен к возникновению, по крайней мере, 9 патогенетически различающихся солидных опухолей. К ним относятся ЛБ и Ходжкинская лимфома, диффузная В-крупноклеточная, плазмобластическая лимфомы, лимфома T/NK-клеток РНГ, рак желудка, лейомиосаркома и первичная выпотная лимфома, в которой всегда присутствует вирус саркомы Капоши [34]. Пять из этих 9 опухолей, в том числе первичная выпотная лимфома, происходят из В-клеточной популяции. Другие же опухоли возникают из популяции инфицированных Т-клеток и/или NK-клеток, а также эпителия носоглотки, желудка и гладких мышц у лиц с иммунодефицитным синдромом. Представляется очевидным, что развитие ассоциированной с вирусом опухоли – многоэтапный процесс, начинающийся с первичного инфицирования клеток-мишеней, переходящий при наличии необходимых условий в хроническое инфицирование, сопровождающееся появлением морфологически, а затем и злокачественно трансформированных клеток, отбором клетки или пула наиболее злокачественных клеток, формирующих опухоль.

ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ РАКА НОСОГЛОТКИ

Среди опухолей эпителиального происхождения, ассоциированных с ВЭБ, особое место занимает РНГ, являющийся одним из наиболее распространенных ЗНО в южных провинциях Китая и странах Юго-Восточной Азии (25–30 случаев на 100 тыс. человек в год). Менее часто данная патология встречается среди арабов Северной Африки, коренных народов Гренландии, Аляски и довольно редко – в большинстве европейских стран и США [35]. В России, как и в западноевропейских странах, относящихся к неэндемичным регионам, распространенность РНГ низкая – менее 1 случая на 100 тыс. населения [36].

Географическая неравномерность распространения РНГ предполагает влияние на развитие патологического процесса генетических факторов и факторов окружающей среды. Установленными факторами риска развития данного ЗНО, кроме факта раннего инфицирования вирусом, являются генотип хозяина, мужской пол, наличие данной патологии в семейном анамнезе, активное и пассивное курение табака, употребление консервированных пищевых продуктов и алкоголя, а также недостаточная гигиена полости рта. К факторам риска относят также наличие определенных аллелей лейкоцитарного антигена (HLA) классов I и II [37, 38]. Генетический полиморфизм комплекса HLA, расположенного в области главного

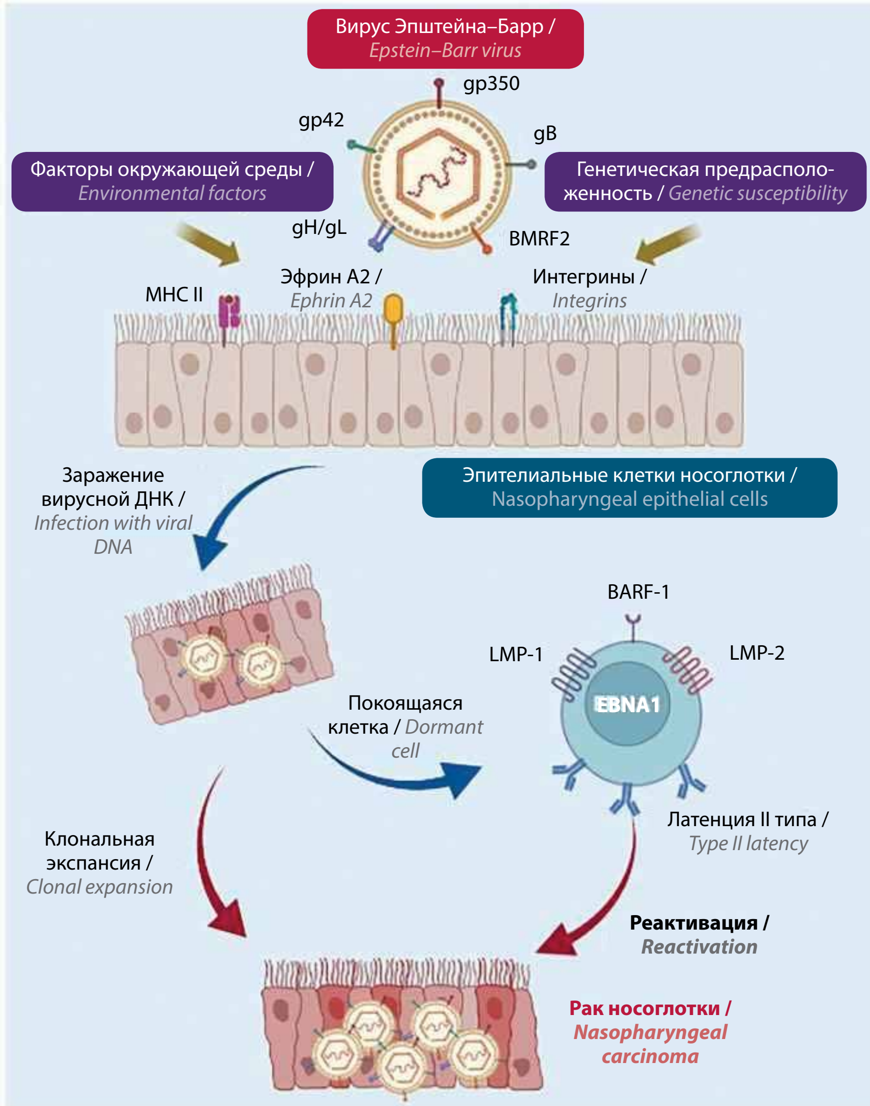


Рис. 6. *Патогенез рака носоглотки [23]. Генетически чувствительные эпителиальные клетки носоглотки подвергаются злокачественной трансформации при заражении персистирующей латентной вирусной инфекцией Эпштейна–Барр и воздействии канцерогенов окружающей среды, что обеспечивает клеточную трансформацию и клональную экспансию. MHC II – главный комплекс гистосовместимости II класса*

Fig. 6. *Pathogenesis of nasopharyngeal cancer [23]. Genetically sensitive epithelial cells of the nasopharynx undergo malignant transformation when infected with persistent latent Epstein–Barr virus infection and exposed to environmental carcinogens, which ensures cellular transformation and clonal expansion. MHC II – main histocompatibility complex of class II*

комплекса гистосовместимости на хромосоме 6p21, может привести к повышению риска развития РНГ из-за нарушения антигенной презентации ВЭБ цитотоксическим клеткам, что способствует этнической предрасположенности к ВЭБ-ассоциированному РНГ [39] (рис. 6).

К факторам риска, вероятно, можно отнести и наличие недавно обнаруженных вариантов ВЭБ азиатского происхождения с полиморфизмом в локусах генов *BALF2* и *EBER2 (EBER-del)*, обладающих высоким риском развития РНГ [40, 41]. Кроме того, полногеномное секвенирование образцов ДНК ВЭБ из плазмы больных РНГ и здоровых вирусоносителей также позволило выявить в этих группах различающиеся профили однонуклеотидных вариантов вирусного генома (single nucleotide variant profile, SNV profile), среди которых обнаружены варианты, характерные только для РНГ. Эти данные свидетельствуют о существовании штаммов ВЭБ с повышенной способностью вызывать такой тип опухоли [42]. Действительно, обнаружено, что определенные подтипы ВЭБ, так называемые штаммы высокого риска, которые несут характерные однонуклеотидные полиморфизмы (single-nucleotide polymorphism, SNP) в генах ВЭБ, тесно связаны с более высокой вероятностью возникновения РНГ [40, 41].

Одним из представителей таких штаммов является штамм M-81, изолированный от больного РНГ из

Гонконга, который продемонстрировал повышенный тропизм к эпителиальным клеткам и пониженный тропизм к В-лимфоцитам – свойства, предполагающие высокую вероятность инфицирования вирусом эпителия носоглотки и возникновения рака в этой анатомической области [43]. Другой штамм из Сингапура – Yu103 – обладал способностью одновременно инфицировать и трансформировать как В-лимфоциты, так и эпителиальные клетки и вызывать, таким образом, как гематологические, так и эпителиальные ЗНО [44].

Поиски географической и этнической корреляций различных штаммов ВЭБ привели к открытию 2 генотипов вируса – ВЭБ-1 и ВЭБ-2, – различающихся последовательностями генов *EBNA2* и *EBNA3* и трансформирующими свойствами, что стимулировало их изучение в различных популяциях с целью выяснения связи с ЗНО. К ВЭБ-1 относятся штаммы B95.8, Akata, Mutu, C666-1, M81, GD1 и GD2, широко распространенные в мире, а к ВЭБ-2 – AG876, Jijoye и Wewak, часто встречающиеся в Папуа – Новой Гвинее, на Аляске и в странах Африки к югу от Сахары [45]. Отсутствие преобладания одного из типов ВЭБ у больных РНГ – представителей разных этносов из географически и климатически различающихся регионов России позволяет предположить, что ни один из типов данного вируса не играет большой роли в канцерогенезе РНГ, но каждый из них (и ВЭБ-1, и ВЭБ-2) при возникновении определенных условий способен инициировать развитие этой опухоли [46].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение ВЭБ и его взаимодействия с клетками хозяина позволяет получить представление о механизмах онкогенного процесса, что открывает возможности для терапевтического и профилактического вмешательств, нацеленных на латентные/литические белки ВЭБ, микроРНК ВЭБ и микроокружение опухоли, которое включает местную цитокиновую среду. Есть еще много вопросов, на которые на данный момент нет ответа. Хотя ВЭБ остается наиболее распространенной персистирующей бессимптомной вирусной инфекцией человека, неясно, почему лишь у небольшой части людей развиваются вирусно-ассоциированные доброкачественные или злокачественные новообразования. Кроме того, необходимы дальнейшие исследования для выяснения онкогенного вклада специфических литических белков ВЭБ в контексте латентных инфекций при некоторых видах рака.

Точная роль ВЭБ в патогенезе эпителиального рака, в том числе РНГ и некоторых вариантов рака желудка, а также сложное взаимодействие ВЭБ и иммунной системы требуют дальнейшего изучения. При этом первоочередная задача исследователей состоит в том, чтобы использовать новые знания о механизмах канцерогенеза для более полного понимания биологии инфекции, вызванной вирусом ВЭБ, а также для разработки новых методов терапии патологий, связанных этим вирусом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Burkitt D.P. The discovery of Burkitt's lymphoma. Cancer 1983;51(10):1777–86. DOI: 10.1002/1097-0142(19830515)51:10<1777::aid-cncr2820511003>3.0.co;2-e
2. Henle W., Henle G. The relation of the Epstein–Barr virus to Burkitt's lymphoma. Zentralbl Bakteriol Orig A 1972;220(1):40–6.
3. Bornkamm G.W. Epstein–Barr virus and its role in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: an unresolved issue. Semin Cancer Biol 2009;19(6):351–65. DOI: 10.1016/j.semcancer.2009.07.002
4. Farrell P.J. Epstein–Barr virus and cancer. Annu Rev Pathol 2019;14:29–53. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013023
5. Гончарова Е.В., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В. и др. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена LMP1 у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц. Вопросы вирусологии 2015;60(2):11–7.
Goncharova E.V., Senyuta N.B., Smirnova K.V. et al. Epstein–Barr virus (EBV) in Russia: infection of the population and analysis of the LMP1 gene variants in patients with EBV-associated pathologies and healthy individuals. Voprosy Virusologii = Problems of Virology 2015;60(2):11–7. (In Russ.).
6. Khan G., Hashim M.J. Global burden of deaths from Epstein–Barr virus attributable malignancies 1990–2010. Infect Agent Cancer 2014;9(1):38. DOI: 10.1186/1750-9378-9-38
7. Davison A.J., Eberle R., Ehlers B. et al. The order Herpesvirales. Arch Virol 2009;154(1):171–7. DOI: 10.1007/s00705-008-0278-4
8. Dolan A., Addison C., Gatherer D. et al. The genome of Epstein–Barr virus type 2 strain AG876. Virology 2006;350(1):164–70. DOI: 10.1016/j.virol.2006.01.015
9. Notarte K.I., Senanayake S., Macaranas I. et al. MicroRNA and other non-coding RNAs in Epstein–Barr virus-associated cancers. Cancers (Basel) 2021;13(15):3909. DOI: 10.3390/cancers13153909
10. Соломай Т.В., Семененко Т.А., Акимкин В.Г. Особенности саморегуляции эпидемического процесса инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр (Herpesviridae: Lymphocryptovirus, HHV-4). Вопросы вирусологии 2023;68(4):343–54. DOI: 10.36233/0507-4088-170
Solomai T.V., Semenenko T.A., Akimkin V.G. Features of self-regulation of the epidemic process of infection caused by the Epstein–Barr virus (Herpesviridae: Lymphocryptovirus, HHV-4). Voprosy Virusologii = Problems of Virology 2023;68(4):343–54. (In Russ.). DOI: 10.36233/0507-4088-170
11. Якушина С.А., Кистенева Л.Б. Вирус Эпштейна–Барр (Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4): репликативные стратегии. Вопросы вирусологии 2020;65(4):191–202. DOI: 10.36233/0507-4088-2020-65-4-191-202
Yakushina S.A., Kisteneva L.B. Epstein–Barr virus (Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human . эgammaherpesvirus 4): replicative strategies. Voprosy Virusologii = Problems of Virology 2020;65(4):191–202. (In Russ.). DOI: 10.36233/0507-4088-2020-65-4-191-202

12. De-The G., Day N.E., Geser A. et al. Sero-epidemiology of the Epstein–Barr virus: preliminary analysis of an international study – a review. IARC Sci Publ (1971) 1975;(11 Pt 2):3–16.
13. Rostgaard K., Balfour H.H. Jr., Jarrett R. et al. Primary Epstein–Barr virus infection with and without infectious mononucleosis. PLoS One 2019;14(12):e0226436. DOI: 10.1371/journal.pone.0226436
14. Handel A.E., Ramagopalan S.V. Multiple sclerosis and risk of cancer: a meta-analysis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2010;81(12):1413–4. DOI: 10.1136/jnnp.2009.195776
15. Hjalgrim H., Smedby K.E., Rostgaard K. et al. Infectious mononucleosis, childhood social environment, and risk of Hodgkin lymphoma. Cancer Res 2007;67(5):2382–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3566.
16. Richardo T., Prattapong P., Ngernsombat C. et al. Epstein–Barr virus mediated signaling in nasopharyngeal carcinoma carcinogenesis. Cancers (Basel) 2020;12(9):2441. DOI: 10.3390/cancers12092441
17. Chiu Y.F., Sugden B. Epstein–Barr virus: the path from latent to productive infection. Annu Rev Virol 2016;3(1):359–72. DOI: 10.1146/annurev-virology-110615-042358
18. McGeoch D.J. Molecular evolution of the gamma-Herpesvirinae. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2001;356(1408):42. DOI: 10.1098/rstb.2000.0775.1-435.
19. El-Sharkawy A., Al Z.L., Malki A. Epstein–Barr virus-associated malignancies: roles of viral oncoproteins in carcinogenesis. Front Oncol 2018;8:265. DOI: 10.3389/fonc.2018.00265
20. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. Cancer Discov 2022;12(1):31–46. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059
21. Pathmanathan R., Prasad U., Sadler R. et al. Clonal proliferations of cells infected with Epstein–Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. N Engl J Med 1995;333(11):693–8. DOI: 10.1056/NEJM199509143331103
22. Cheerathodi M.R., Meckes D.G. Jr. The Epstein–Barr virus LMP1 interactome: biological implications and therapeutic targets. Future Virol 2018;13(12):863–87. DOI: 10.2217/fvl-2018-0120
23. Liu M.T., Chang Y.T., Chen S.C. et al. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 represses p53-mediated DNA repair and transcriptional activity. Oncogene 2005;24(16):2635–46. DOI: 10.1038/sj.onc.1208319
24. Henderson S., Rowe M., Gregory C. et al. Induction of bcl-2 expression by Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. Cell 1991;65(7):1107–15. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90007-l
25. Horikawa T., Yang J., Kondo S. et al. Twist and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res 2007;67(5):1970–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3933
26. Yoshizaki T., Kondo S., Endo K. et al. Modulation of the tumor microenvironment by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma. Cancer Sci 2018;109(2):272–8. DOI: 10.1111/cas.13473
27. Cen O., Longnecker R. Latent membrane protein 2 (LMP2). Curr Top Microbiol Immunol 2015;391:151–80. DOI: 10.1007/978-3-319-22834-1_5
28. Countryman J., Miller G. Activation of expression of latent Epstein–Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1985;82(12):4085–9. DOI: 10.1073/pnas.82.12.4085
29. Germini D., Sall F.B., Shmakova A. et al. Oncogenic properties of the EBV ZEBRA protein. Cancers (Basel) 2020;12(6):1479. DOI: 10.3390/cancers12061479
30. Ressing M.E., van G.M., Gram A.M. et al. Immune evasion by Epstein–Barr virus. Curr Top Microbiol Immunol 2015;391: 355–81. DOI: 10.1007/978-3-319-22834-1_12
31. Rosemarie Q., Sugden B. Epstein–Barr virus: how its lytic phase contributes to oncogenesis. Microorganisms 2020;8(11). DOI: 10.3390/microorganisms8111824
32. Yoshizaki T., Sato H., Murono S. et al. Matrix metalloproteinase 9 is induced by the Epstein–Barr virus BZLF1 transactivator. Clin Exp Metastasis 1999;17(5):431–6. DOI: 10.1023/a:1006699003525
33. Mohl B.S., Chen J., Sathiyamoorthy K. et al. Structural and mechanistic insights into the tropism of Epstein–Barr virus. Mol Cells 2016;39(4):286–91. DOI: 10.14348/molcells.2016.0066
34. Young L.S., Rickinson A.B. Epstein–Barr virus: 40 years on. Nat Rev Cancer 2004;4(10):757–68. DOI: 10.1038/nrc1452
35. Yu M.C., Yuan J.M. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. Semin Cancer Biol 2002;12(6):421–9. DOI: 10.1016/s1044579x02000858
36. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2023. 262 с. The state of oncological care for the Russian population in 2022. Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU "NMITS radiologii" Minzdrava Rossii, 2023. (In Russ.).
37. Ho H.C., Ng M.H., Kwan H.C., Chau J.C. Epstein–Barr-virus-specific IgA and IgG serum antibodies in nasopharyngeal carcinoma. Br J Cancer 1976;34(6):655–60. DOI: 10.1038/bjc.1976.228
38. Jia W.H., Qin H.D. Non-viral environmental risk factors for nasopharyngeal carcinoma: a systematic review. Semin Cancer Biol 2012;22(2):117–26. DOI: 10.1016/j.semcancer.2012.01.009
39. Wee J., Nei W.L., Yeoh K.W. et al. Why are East Asians more susceptible to several infection-associated cancers (carcinomas of the nasopharynx, stomach, liver, adenocarcinoma of the lung, nasal NK/T-cell lymphomas)? Med Hypotheses 2012;79(6):833–42. DOI: 10.1016/j.mehy.2012.09.003
40. Xu M., Yao Y., Chen H. et al. Genome sequencing analysis identifies Epstein–Barr virus subtypes associated with high risk of nasopharyngeal carcinoma. Nat Genet 2019;51(7):1131–6. DOI: 10.1038/s41588-019-0436-5
41. Hui K.F., Chan T.F., Yang W. et al. High risk Epstein–Barr virus variants characterized by distinct polymorphisms in the EBER locus are strongly associated with nasopharyngeal carcinoma. Int J Cancer 2019;144(12):3031–42. DOI: 10.1002/ijc.32049
42. Lam W.K.J., Ji L., Tse O.Y.O. et al. Sequencing analysis of plasma Epstein–Barr virus DNA reveals nasopharyngeal carcinoma-associated single nucleotide variant profiles. Clin Chem 2020;66(4):598–605. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa027
43. Tsai M.H., Raykova A., Klinke O. et al. Spontaneous lytic replication and epitheliotropism define an Epstein–Barr virus strain found in carcinomas. Cell Rep 2013;5(2):458–70. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.09.012
44. Yu F., Syn N.L., Lu Y. et al. Characterization and establishment of a novel EBV strain simultaneously associated with nasopharyngeal carcinoma and B-cell lymphoma. Front Oncol 2021;11:626659. DOI: 10.3389/fonc.2021.626659
45. Palser A.L., Grayson N.E., White R.E. et al. Genome diversity of Epstein–Barr virus from multiple tumor types and normal infection. J Virol 2015;89(10):5222–37. DOI: 10.1128/JVI.03614-14.
46. Смирнова К.В., Лубенская А.К., Сенюта Н.Б. и др. Вирус Эпштейна–Барр 1-го и 2-го типа (Herpesviridae: Lymphocryptovirus) и другие маркеры вируса у больных раком носоглотки в двух этнически и географически отличающихся регионах России. Вопросы вирусологии 2023;68(4):291–301. DOI: 10.36233/0507-4088-181
Smirnova K.V., Lubenskaya A.K., Senyuta N.B. et al. Epstein–Barr virus (Herpesviridae: Lymphocryptovirus) types 1 and 2 and other viral markers in patients with nasopharyngeal carcinoma in two geographically and ethnically distinct regions of Russia. Voprosy Virusologii = Problems of Virology 2023;68(4):291–301. DOI: 10.36233/0507-4088-181

Вклад авторов
В.Э. Гурцевич: идея, написание текста статьи;
Н.Б. Сенюта: сбор и систематизация данных;
К.В. Смирнова: анализ данных, редактирование.
Authors' contributions
V.E. Gurtsevitch: the idea, article writing;
N.B. Senyuta: data collection and systematization;
K.V. Smirnova: data analysis, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors
В.Э. Гурцевич / V.E. Gurtsevitch: https://orcid.org/0000-0003-1840-4364
Н.Б. Сенюта / N.B. Senyuta: https://orcid.org/0000-0001-8915-8274
К.В. Смирнова / K.V. Smirnova: https://orcid.org/0000-0001-6209-977X

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках экспериментального государственного задания Минздрава России при координации ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Минздрава России.
Funding. The work was performed within the framework of an experimental state assignment of the Ministry of Health of Russia under the coordination of the Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Ministry of Health of Russia.

Статья поступила: 26.09.2025. **Принята к публикации:** 03.11.2025. **Опубликована онлайн:** 10.12.2025.
Article submitted: 26.09.2025. **Accepted for publication:** 03.11.2025. **Published online:** 10.12.2025.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-73-80

Альтернативные пути регуляции экспрессии рецептора программируемой гибели клеток 1 в Т-лимфоцитах

Е.В. Баторов, П.В. Васильченко, Е.Р. Черных

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; Россия, 630099 Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

Контакты: Егор Васильевич Баторов *ebatorov@mail.ru*

Белок программируемой гибели клеток 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) – ингибиторный чек-поинт-рецептор – является мишенью для анти-PD-1-моноклональных антител, эффективно используемых в терапии многих опухолей. Цель анти-PD-1-терапии – предотвращение дисфункции Т-лимфоцитов, возникающей вследствие продолжающейся стимуляции через Т-клеточный рецептор и характеризующейся снижением пролиферативной, цитотоксической и цитокин-продуцирующей активности и экспрессией PD-1, а также и других чек-поинт-рецепторов. Однако антигеннезависимая стимуляция лимфоцитов цитокинами, действующая через сигнальные пути JAK/STAT, также может привести к экспрессии на них данной группы молекул. По-видимому, опосредованно на экспрессию чек-поинт-молекул могут влиять сигнальные пути PI3K/Akt/mTOR и Ras/MEK/ERK, регулирующие пролиферацию, активацию и метаболизм Т-клеток. Последствия блокады таргетными препаратами неистощенных Т-клеток в настоящее время не изучены. В публикации рассмотрены основные сигнальные пути экспрессии ингибиторных чек-поинт-рецепторов PD-1 в Т-клетках.

Ключевые слова: рецептор программируемой клеточной гибели 1, PD-1, Т-клеточное истощение, гомеостатическая пролиферация, NFAT, STAT5, STAT3

Для цитирования: Баторов Е.В., Васильченко П.В., Черных Е.Р. Альтернативные пути регуляции экспрессии рецептора программируемой гибели клеток 1 в Т-лимфоцитах. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(4):73–80.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-73-80

Alternative signaling pathways for regulation of programmed cell death 1 protein expression in T lymphocytes

E.V. Batorov, P.V. Vasilchenko, E.R. Chernykh

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; 14 Yadrintsevskaya St., Novosibirsk, 630099, Russia

Contacts: Egor Vasilyevich Batorov *ebatorov@mail.ru*

Programmed cell death protein 1 (PD-1), an inhibitory checkpoint receptor, is the target of anti-PD-1 monoclonal antibodies that are effectively used in the treatment of various malignancies. The goal of anti-PD-1 therapy is to prevent a state of T cell exhaustion that occurs as a result of ongoing stimulation via the T-cell receptor and is characterized by T cell dysfunction and surface expression of PD-1 and other checkpoint receptors. However, antigen-independent stimulation of lymphocytes by cytokines acting through the JAK/STAT signaling pathways can also up-regulate inhibitory checkpoint receptor expression. PI3K/Akt/mTOR and Ras/MEK/ERK signaling pathways regulate the proliferation, activation and metabolism of T cells and appear to indirectly influence the expression of checkpoint molecules. The consequences of blocking non-exhausted T cells with targeted therapies are currently not studied. The publication examines the main signaling pathways of PD-1 expression in T cells.

Keywords: programmed cell death 1, PD-1, T cell exhaustion, homeostatic proliferation, NFAT, STAT5, STAT3

For citation: Batorov E.V., Vasilchenko P.V., Chernykh E.R. Alternative signaling pathways for regulation of programmed cell death 1 protein expression in T lymphocytes. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(4):73–80. (In Russ.).
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-73-80

ВВЕДЕНИЕ

В 2011 и 2014 гг. Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (U. S. Food and Drug Administration, FDA) были допущены к применению ипилимумаб и пембролизумаб – моноклональные антитела, блокирующие антиген цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4, CTLA-4) и рецептор программируемой гибели клеток 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) соответственно. В онкологии наступила эра ингибиторов контрольных точек (чек-поинт, checkpoint) иммунного ответа. Применение зарегистрированных на сегодняшний день анти-CTLA-4-, анти-PD-1-, анти-PD-L1- и анти-LAG-3-препаратов позволяет добиться значительного регресса опухолевой массы и увеличения выживаемости даже на поздних стадиях меланомы, немелкоклеточного рака легкого, почечно-клеточного рака, рака молочной железы, яичников, плоскоклеточного рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, опухолей желудочно-кишечного тракта и других солидных опухолей. Частота объективного ответа на такую терапию варьирует от 15–30 % (при большинстве солидных опухолей) до 40–50 % (при меланоме) [1, 2].

Механизм действия ингибиторов чек-поинт-рецепторов принципиально отличается от традиционных противоопухолевых моноклональных антител, нацеленных на антигены опухолевых клеток (анти-HER2, анти-EGFR, анти-CD20, анти-CD38 и др.), и направлен на восстановление противоопухолевой активности Т-клеток, находящихся в состоянии Т-клеточного истощения.

Т-клетки экспрессируют ингибиторные рецепторы CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3, TIGIT и другие после активации через Т-клеточный рецептор (ТКР). В норме взаимодействие чек-поинт-рецепторов с соответствующими лигандами способствует защите окружающих тканей, ограничивая Т-клеточный иммунный ответ, а также в поддержанию периферической толерантности и контролю аутореактивных клонов лимфоцитов [3]. При продолжающейся стимуляции ТКР (хронические вирусные инфекции, рост опухоли, стимуляция Т-клеток моноклональными антителами анти-CD3/CD28 более 2 нед в условиях *in vitro*) активированные Т-клетки начинают переходить в состояние Т-клеточного истощения, которое характеризуется стойкой экспрессией ингибиторных чек-поинт-рецепторов, а также дисрегуляцией цитотоксичности, продукции цитокинов и пролиферативной активности. В процессе ухода из-под иммунного надзора клетки опухоли и микроокружения, экспрессирующие лиганды чек-поинт-рецепторов, подавляют функциональную активность инфильтрирующих опухоль Т-клеток [4]. Моноклональные антитела блокируют прием ингибирующего сигнала Т-лимфоцитами, что может привести к восстановлению их пролиферативной, цитокин-продуцирующей и цитотоксической функций, направленных против опухолевых клеток.

Следует подчеркнуть, что концепция таргетной терапии моноклональными антителами, блокирующими чек-поинт-рецепторы или их лиганды, направлена именно на вывод Т-клеток из состояния истощения, возникающего вследствие их продолжающейся стимуляции через ТКР. При этом антигеннезависимая стимуляция лимфоцитов цитокинами также может вызвать экспрессию на них данной группы молекул.

Цель работы – рассмотреть основные сигнальные пути экспрессии ингибиторных чек-поинт-рецепторов PD-1 в Т-клетках.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЦЕПТОРА ПРОГРАММИРУЕМОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК 1

Структура и функции PD-1 в норме и при патологии многократно описаны в литературе [5–7]. Здесь мы приведем лишь значимые для настоящей публикации данные.

Белок программируемой гибели клеток 1 (CD279, PD-1), кодируемый геном *PDCD1*, – рецептор суперсемейства иммуноглобулинов, который экспрессируется активированными Т-лимфоцитами, В-клетками, NK-клетками (NK – естественные киллеры) и различными популяциями клеток миелоидного ряда. Рецептор PD-1 взаимодействует со своими лигандами (PD-L1 и PD-L2), которые экспрессирует большинство популяций иммунокомпетентных клеток, эпителиоциты и эндотелиоциты, а также опухолевые клетки. Экспрессия лигандов PD-1 может быть конститутивной или запускается в ответ на стимуляцию провоспалительными цитокинами (интерферон γ, фактор некроза опухоли α) [5–7].

Активация PD-1 в Т-лимфоцитах приводит к дефосфорилированию протеинкиназы 70, ассоциированной с зета-цепью (ZAP-70), в комплексе ТКР и фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), передающей сигнал от костимуляторной молекулы CD28. В результате блокируются описанные ниже сигнальные пути Ras/MEK/ERK и PI3K/Akt/mTOR, регулирующие процессы пролиферации и активации Т-клеток, а также метаболизма. Метаболические изменения – снижение гликолиза и обмена аминокислот, усиление окислительного фосфорилирования – усугубляют дисфункцию лимфоцитов. Кроме того, PD-1 на посттрансляционном этапе может приводить к убиквитинированию ТКР и снижению его экспрессии [5, 7].

АНТИГЕНЗАВИСИМАЯ ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРА ПРОГРАММИРУЕМОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК 1 ПРИ ОСТРОМ ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ

Презентация специфического антигена через ТКР при участии корецепторов CD4 или CD8 и костимуляторных молекул CD28 запускает передачу активирующего сигнала и приводит к фосфорилированию фосфолипазы Cγ. Эта фосфолипаза гидролизует входящий в состав клеточной мембраны фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат с образованием вторичного посредника инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерола [8].

Растворимый в цитозоле инозитол-1,4,5-трифосфат, связываясь со своим рецептором на эндоплазматическом ретикулуме, высвобождает Ca^{2+} с последовательной активацией кальмодулина и кальциневрина. Серин-треониновая фосфатаза кальциневрин дефосфорилирует цитоплазматические белки семейства ядерных факторов активированных Т-клеток (NFAT1, NFAT2, NFAT4). Транскрипционный фактор антигензависимой активации Т-клеток NFAT транслоцируется в ядро, образует гетеродимер с активирующим белком-1 (activating protein-1, AP-1, фактор транскрипции, состоящий из белков семейств Fos и Jun) и запускает большое количество генетических программ, участвующих в реализации адоптивного иммунного ответа [6, 8, 9].

Параллельно с эффекторными генами активируется экспрессия ингибиторных чек-поинт-рецепторов. Сигнал от ТКР приводит к деметилированию консервативных участков B и C (conserved region B, C; CR-B, CR-C), сайтов связывания транскрипционных факторов в промоторе гена *PDCD1*. Транскрипционные факторы NFAT и AP-1 связываются с CR-C, запуская транскрипцию *PDCD1* и, соответственно, экспрессию PD-1 (рис. 1, схема 1) [6, 9].

Стимуляция ТКР также активирует ряд других транскрипционных факторов (interferon regulatory factor 4 (IRF4), basic leucine zipper ATF-like transcription factor (BATF) и др.), участвующих как в реализации эффекторных функций Т-клеток, так и экспрессии PD-1 и других ингибиторных рецепторов. Их взаимодействие с соответствующими лигандами на клетках в очаге воспаления препятствует внутриклеточной передаче активирующих сигналов (PD-1, TIM-3), конкурентно ингибирует костимуляцию (CTLA-4, TIGIT) или презентацию антигена (LAG-3), оказывая супрессорное действие на активированные Т-клетки. После разрешения острого инфекционного процесса в отсутствие антигенной стимуляции через ТКР происходит

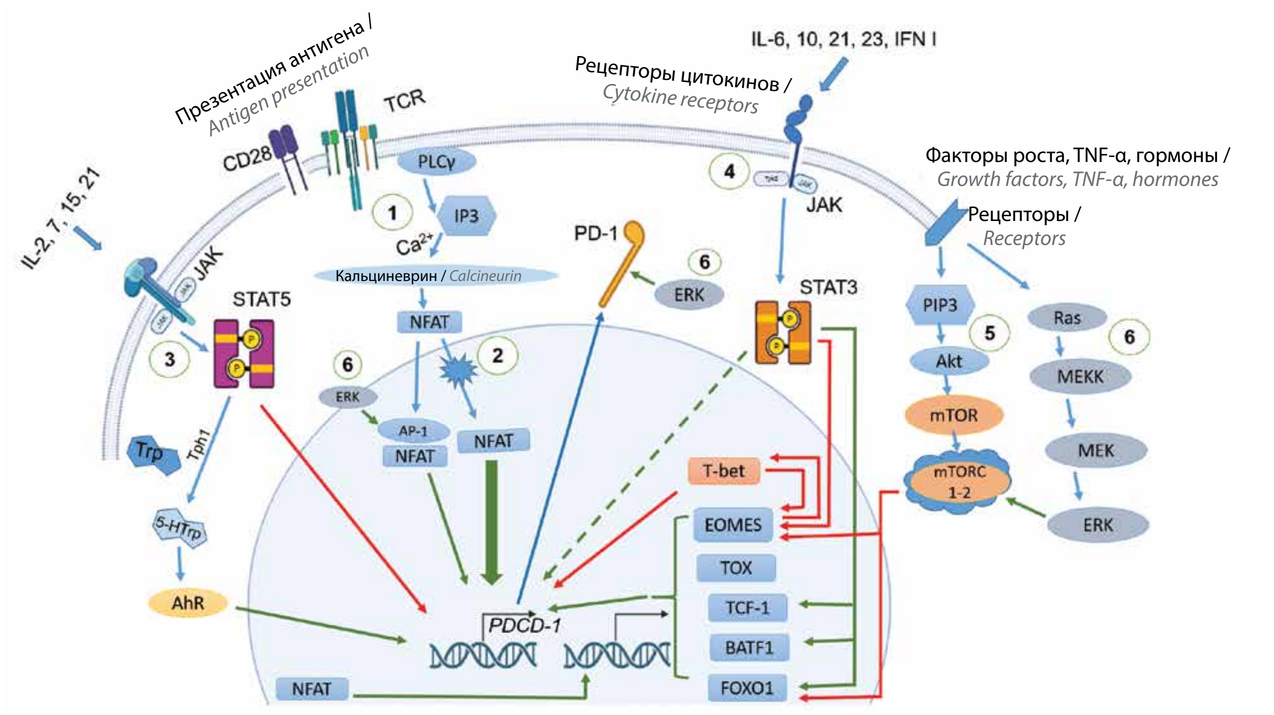


Рис. 1. *Сигнальные пути, регулирующие экспрессию рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1) в Т-лимфоцитах. Схематично представлены основные сигнальные пути и транскрипционные факторы, вовлеченные в экспрессию PD-1, при презентации антигена Т-клеткам (1), в том числе в условиях хронической антигенной стимуляции (2), при стимуляции гомеостатическими цитокинами с общей рецепторной γ-цепью (3), при активации цитокинами, ростовыми факторами и гормонами путей Jak/STAT3 (4), PI3K/Akt/mTOR (5) и Ras/MEK/ERK (6). Зелеными стрелками обозначено стимулирующее действие на транскрипцию генов PD-1 (PDCD-1) и транскрипционных факторов, а также ERK-опосредованная стабилизация PD-1, красными — ингибирование транскрипции PDCD-1 и транскрипционных факторов. IL — интерлейкин; TNF-α — фактор некроза опухоли α; mTOR — мишень рапамицина млекопитающих; mTORC — комплекс mTOR; IFN I — интерферон I типа*

Fig. 1. *Signaling pathways regulating programmed cell death 1 protein (PD-1) expression in T lymphocytes. The main signaling pathways and transcription factors involved in PD-1 expression are schematically represented: during antigen presentation to T cells (1), under conditions of chronic antigen stimulation (2), during stimulation by "homeostatic" cytokines with a common receptor γ-chain (3), during activation by cytokines, growth factors, and hormones of the Jak/STAT3 (4), PI3K/Akt/mTOR (5), and Ras/MEK/ERK (6) pathways. Green arrows indicate the stimulating effect on the transcription of PD-1 (PDCD-1) and transcription factor genes, as well as ERK-mediated stabilization of PD-1; red arrows indicate the inhibition of transcription of PDCD-1 and transcription factor genes. IL — interleukin; TNF-α — tumor necrosis factor α; mTOR — mammalian rapamycin target; mTORC — mTOR complex; IFN I — type I interferon*

реметилирование участков CR-B и CR-C, параллельно снижается поступление из цитоплазмы и *de novo* продукция NFAT, а также прекращается экспрессия PD-1 и других чек-поинт-рецепторов. Меньшая часть активированных Т-клеток переходит в состояние Т-клеток памяти, остальные подвергаются апоптозу [6–10].

Экспрессия рецептора программируемой гибели клеток 1 и Т-клеточное истощение

При продолжающейся непрерывной стимуляции ТКР (хронической вирусной инфекции, опухолевом росте, стимуляции Т-клеток моноклональными антителами анти-CD3/CD28 более 2 нед в условиях *in vitro*) сайт связывания CR-C остается деметилированным. Экспрессированные на активированных Т-клетках CTLA-4 и PD-1 вне- и внутриклеточно блокируют передачу сигнала от CD28, что приводит к снижению экспрессии белков комплекса AP-1, а транскрипционный фактор BATF нарушает его формирование [9, 11]. В отсутствие AP-1 NFAT образует гомодимеры NFAT-NFAT, которые связываются с CR-C и запускают экспрессию ряда транскрипционных факторов: TOX (thymocyte selection-associated high mobility group box protein), TCF-1 (T cell factor-1), T-bet (T-box expressed in T cells), эомесодермина (eomesodermin, EOMES), семейства NR4A (nuclear orphan receptor 4a) и др. Все они участвуют в регуляции программы Т-клеточного истощения, включающей стойкую экспрессию PD-1 и других чек-поинт-рецепторов (см. рис. 1, схема 2) [6, 9–12].

Следует отметить, что переход в состояние Т-клеточного истощения постепенен. В настоящее время с помощью оценки транскриптома одиночных клеток (single-cell RNA sequencing) принято выделять 2 стадии предшественников истощенных Т-клеток (progenitor exhausted T cells 1, progenitor exhausted T cells 2), промежуточные (intermediate) и терминальные (terminal) истощенные Т-клетки. Граница между этапами весьма условна, каждый несколько отличается от предыдущего и последующего уровнем экспрессии чек-поинт-рецепторов и транскрипционных факторов. Перечисленные факторы транскрипции могут определяться и в активированных Т-клетках (T-bet), и в клетках памяти (EOMES). При этом транскрипционный фактор T-bet, запускающий продукцию провоспалительных цитокинов и цитотоксических молекул, антагонистичен в отношении EOMES и TCF-1 и супрессирует экспрессию PD-1 [6, 10, 13].

На этапе предшественников истощения описано усиление пролиферации; высоко экспрессируется TCF-1, по-видимому, отсутствует или снижена экспрессия мембранного TIM-3. В промежуточных истощенных Т-клетках отмечаются выраженная экспрессия T-bet и относительное уменьшение экспрессии EOMES и TCF-1. Стадия терминального истощения характеризуется драматическим снижением пролиферации и продукции цитокинов; цитотоксический потенциал, по некоторым данным, может быть сохранен или увеличен. На данном этапе Т-клетки коэкспрессируют различные ингибиторные рецепторы (TIM-3, LAG-3, TIGIT и др.), отмечается высокая интенсивность экспрессии TOX и EOMES при одновременном снижении экспрессии T-bet и TCF-1. Уровень экспрессии PD-1, в отличие от других чек-поинт-рецепторов, сохраняется на всех этапах и усиливается по мере углубления Т-клеточной дисфункции [10, 13, 14].

Помимо длительного контакта с опухолевыми антигенами, развитию Т-клеточного истощения способствуют неблагоприятные для Т-клеток метаболические изменения в опухолевом микроокружении: дефицит глюкозы, избыток лактата, холестерина, жирных кислот, высокая концентрация супрессорных молекул (аргиназы-1, аденозина, индоламин 2,3-диоксигеназы) и иммунорегуляторных цитокинов (интерлейкина (IL) 10, IL-35, трансформирующего фактора роста β (TGFβ)). Опухолевые клетки и стромальное микроокружение экспрессируют лиганды ингибиторных рецепторов (PD-L1/PD-L2, галектин-9, галектин-3, CD155 и т. д.) с целью ухода из-под иммунного надзора. Процесс Т-клеточного истощения может быть прерван на ранних этапах, не достигая терминальной стадии. Одним из способов «перезагрузки» Т-клеточной активации является анти-PD-1/PD-L1-таргетная терапия. Терминальное истощение считается необратимым [10, 13–15].

Следует отметить, что описанное взаимодействие транскрипционных факторов справедливо для популяций эффекторных Т-клеток. Механизмы экспрессии чек-поинт-рецепторов и возможного истощения регуляторных Т-клеток (Treg), по-видимому, имеют различия [16, 17].

Гомеостатические цитокины, сигнальный путь JAK/STAT5 и экспрессия рецептора программируемой гибели клеток 1

Ранее мы и некоторые исследователи отмечали увеличение содержания Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3, при стимуляции цитокинами IL-2, -7, -15 и -21 *in vitro* и в условиях экспансии Т-лимфоцитов, индуцируемой этими цитокинами *in vivo* [17–21]. Перечисленные IL (а также IL-4 и IL-9) используют для передачи сигнала внутрь клетки общую γ-цепь (CD132) и являются ключевыми регуляторами гомеостаза популяций лимфоидных клеток. В частности, IL-2, -7 и -15 поддерживают восстановление пула зрелых Т-клеток в условиях лимфопении – гомеостатическую пролиферацию. В раннем периоде после высокодозной химиотерапии и трансплантации гемопоэтических клеток-предшественников PD-1 и другие ингибиторные чек-поинт-рецепторы были экспрессированы Т-клетками с сохранной функциональной активностью, что дало повод N. Marshall и соавт. назвать этот феномен гомеостатическим ингибированием [20, 21].

При этом данные о влиянии IL с общей рецепторной γ-цепью на экспрессию PD-1 противоречивы. Показано, что связывание гомеостатических цитокинов с рецепторами запускает несколько сигнальных путей в Т-лимфоцитах. Активируются Янус-1 и Янус-3 тирозинкиназы (JAK1, JAK3), которые в свою очередь фосфорилируют преобразователь сигнала и активатор транскрипции 5 (signal transducer and activator of transcription 5, STAT5). Фосфорилированные молекулы STAT5 (pSTAT5) образуют гомо- или гетеродимеры. Димеры транслоцируются к сайтам связывания промоторов генов-мишеней, в том числе *PDCD1*, за которые pSTAT5 конкурирует с NFAT. В мышиных моделях pSTAT5 ингибирует экспрессию PD-1, а также транскрипционных факторов TCF-1 и TOX в $CD8^+$-Т-клетках [22, 23]. Также нами показано, что $CD4^+$-Т-клетки, экспрессирующие α-цепь рецептора IL-2 (CD25), являются EOMES-отрицательными [17]. Коэкспрессия CD25 и рецепторов контрольных точек может быть индикатором пролиферации функциональных (не истощенных) $CD4^+$-Т-клеток и активированных естественных Treg, конститутивно экспрессирующих CD25.

В то же время, по нашим данным, значительная доля PD-1^+- и TIM-3^+-Т-лимфоцитов периферической крови экспрессирует pSTAT5 [17]. Некоторые авторы подчеркивают участие стимуляции IL-2 и/или IL-15 через β-цепь общего рецептора (CD122) в гиперэкспрессии PD-1 и развитии Т-клеточного истощения [24, 25]. Y. Liu и соавт. продемонстрировали, что длительная активация сигнального пути JAK1/JAK3/STAT5 в $CD8^+$-Т-лимфоцитах высокими дозами IL-2 приводит к запуску транскрипции гена триптофангидроксилазы 1 (*Tph1*), катализирующей триптофан до 5-гидрокситриптофана. Последний является одним из эндогенных лигандов для арил-гидрокарбонового рецептора (AhR) – цитоплазматического транскрипционного фактора, участвующего в распознавании ксенобиотиков и токсичных метаболитов. Активированный AhR транслоцируется в ядро и связывается с промоторами генов *PDCD1* и других чек-поинт-рецепторов, а также снижает продукцию провоспалительных цитокинов и цитотоксических молекул, т. е. инициирует состояние Т-клеточного истощения (см. рис. 1, схема 3) [25].

Следует подчеркнуть, что в условиях гомеостатической пролиферации пролиферативное преимущество получают аутореактивные клоны Т-лимфоцитов. Их экспансия приводит к снижению репертуара ТКР, увеличивает риск возникновения аутоиммунных реакций и в перспективе снижает эффективность противоинфекционного и противоопухолевого иммунного ответа [26–28]. Поэтому гомеостатическое ингибирование путем экспрессии чек-поинт-рецепторов представляется физиологичным механизмом контроля пула зрелых Т-клеток.

В настоящее время IL-2 ограниченно используется в лечении отдельных опухолей, однако по мере создания длительно циркулирующих препаратов этот цитокин рассматривается как перспективное дополнение к анти-PD-1-терапии [29, 30]. Новые данные о неканоничных генах-мишенях и взаимоисключающих эффектах усложняют прогнозирование результатов подобной комбинированной терапии.

STAT3 как фактор экспрессии рецептора программируемой гибели клеток 1 Т-лимфоцитами

Иммунорегуляторные цитокины IL-6, -10, -21, -23 и интерфероны 1-го типа реализуют свои эффекты на Т-лимфоциты через активацию сигнальных путей PI3K/Akt/mTOR, Ras/MEK/ERK (см. ниже) и JAK1-3/STAT3. Последний необходим для дифференцировки Т-хелперов 17-го типа и фолликулярных Т-хелперов, в экспериментальных моделях он также участвует в регуляции функций регуляторных Т-клеток и цитотоксических $CD8^+$-Т-лимфоцитов [31–33]. Янус-тирозинкиназы фосфорилируют молекулы STAT3, которые в дальнейшем димеризуются и транслоцируются в ядро, где регулируют экспрессию большого количества генов [34].

Как и в случае с цитокинами с общей рецепторной γ-цепью, имеющиеся данные о влиянии STAT3 на экспрессию PD-1 и Т-клеточное истощение неоднозначны. Показана STAT3-зависимая индукция экспрессии транскрипционного фактора FOXO1 (в свою очередь, способного подавлять экспрессию T-bet), TCF-1, BATF и ингибирование EOMES (см. рис. 1, схема 4) [31, 33, 34]. В эксперименте на мышиных моделях описано IL-6-индуцированное прямое связывание pSTAT3 с регулирующими регионами *PDCD1* с последующим увеличением экспрессии PD-1 [35]. Q. Sun и соавт. указали на низкую экспрессию рецепторов к IL-6 на инфильтрирующих опухоль $CD8^+$-Т-лимфоцитах человека и представили данные о контролирующей роли оси IL-10/IL-21 – pSTAT3 в реализации транскрипционной программы терминального Т-клеточного истощения, которая включала активацию промоторов генов *Havcr2* (кодирующего TIM-3), *Gzmb*, *Cxcr6*, *Batf* и других с одновременным ингибированием генов, связываемых с предшественниками истощения: *Tcf7* (кодирующий TCF-1), *Btla*, *Cxcr5*, *Ccr7* и других; изменений экспрессии *PDCD1* выявлено не было [33]. B.S. Hanna и соавт., напротив, в модели хронического лимфобластного лейкоза описали IL-10–STAT3-зависимое ограничение терминального Т-клеточного истощения и поддержание популяции предшественников истощенных PD-1^{int}TCF-$1^+$$CD8^+$-Т-клеток, обладающих противоопухолевой активностью, за счет сохранения димеров NFAT–AP-1 [36].

С учетом гиперэкспрессии STAT3 в опухолевых клетках и микроокружении опухолей, ассоциированном с прогрессией, продукцией иммуносупрессорных растворимых факторов и экспрессией ингибиторных лигандов, изучаются анти-STAT3-свойства существующих препаратов и проводятся клинические испытания новых ингибиторов STAT3, в том числе в комбинации с анти-PD-1/PD-L1- и анти-CTLA-4-моноклональными антителами [37, 38]. Подобная комбинированная блокада STAT3 и ингибиторных чек-поинт-рецепторов продемонстрировала обнадеживающие результаты, в частности позволила снизить резистентность к таргетной иммунотерапии [38]. Влияние фармакологического ингибирования STAT3 в лимфоцитах человека в настоящее время не изучено.

РОЛЬ ДРУГИХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В РЕГУЛЯЦИИ Т-КЛЕТОЧНОГО ИСТОЩЕНИЯ

Презентация антигена ТКР с костимуляцией через CD28, сигналы цитокинов, включая IL с общей рецепторной γ-цепью, а также некоторые гормоны активируют сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR, регулирующий процессы метаболизма, пролиферации и активации лимфоцитов и большинства популяций нормальных и опухолевых клеток [39, 40].

Фосфоинозитид-3-киназа фосфорилирует упоминаемый выше мембранный фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат с образованием вторичного посредника фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфата, который участвует в активации протеинкиназы B (Akt). Каскад реакций, запускаемый Akt, в свою очередь, приводит к фосфорилированию киназы mTOR (мишень рапамицина млекопитающих), которая входит в состав комплексов mTORC (mTORC1 и mTORC2). Оба комплекса контролируют процессы клеточного метаболизма (транспорт глюкозы и аминокислот, гликолиз, липидный обмен), характерного для активации Т-клеток, запуская экспрессию многочисленных транскрипционных факторов [39, 40].

По данным некоторых авторов, стимуляция сигнального пути PI3K/Akt/mTOR ингибирует транскрипцию факторов FOXO1 и EOMES, участвующих в экспрессии PD-1 и реализации программы Т-клеточного истощения (см. рис. 1, схема 5). Хроническая стимуляция антигенами ТКР приводит к супрессии сигнального пути PI3K/Akt/mTOR с последующим накоплением FOXO1 и экспрессией ингибиторных чек-поинт-молекул. При этом, однако, не отмечено увеличения экспрессии PD-1 и других чек-поинт-рецепторов, как и при терапии блокаторами mTOR (рапамицин, эверолимус, темсиролимус), применяемыми в лечении опухолей. Несмотря на иммуносупрессорную направленность действия этих препаратов (используемых в том числе для профилактики реакции «трансплантат против хозяина» и предотвращения отторжения трансплантата), в экспериментах описано усиление цитокин-продуцирующего и цитотоксического потенциалов предшественников истощенных Т-клеток на фоне блокады PI3K/Akt/mTOR. Рассматривается возможность их комбинации с анти-PD-1/PD-L1- и другими ингибиторами чек-поинт-рецепторов. В то же время известно, что блокирование mTOR приводит к увеличению экспрессии PD-L1 опухолевыми клетками, что, с одной стороны, повышает количество мишеней для анти-PD-L1-моноклональных антител, с другой – может снижать эффективность анти-PD-1-терапии [39–41].

Многие стимулы – презентация антигена, IL с общей рецепторной γ-цепью, ростовые факторы и некоторые гормоны – также приводят к активации сигнального пути Ras/MEK/ERK, участвующего в процессах активации, пролиферации и дифференцировки Т-клеток [42].

Стимуляция рецепторов вызывает активацию ГТФазы Ras, запускающей последовательное фосфорилирование киназ MEKK (MAPK/ERK, MEK и ERK). Киназы ERK1 и ERK2 мигрируют в ядро и активируют эффекторные факторы транскрипции, контролирующие в том числе продукцию белков, входящих в состав комплексов AP-1 и mTORC1, секрецию цитокинов, метаболические изменения и т. д. (см. рис. 1, схема 6) [43].

Как и в случае с mTOR, данных о прямом влиянии ERK на транскрипцию PD-1, других чек-поинт-рецепторов Т-лимфоцитами и индукцию Т-клеточного истощения в настоящее время нет. В то же время ERK, по-видимому, на посттрансляционном этапе фосфорилирует молекулы PD-1, способствуя их деубиквитинированию и стабилизации [43]. Противоопухолевый препарат – ингибитор MEK (траметиниб) в экспериментах снижал поверхностную экспрессию PD-1, TIM-3 и LAG-3 на Т-клетках, несущих химерный антигенный рецептор, и предотвращал их истощение [44]. Блокаторы MEK, помимо противоопухолевого эффекта, уменьшают экспрессию клетками опухоли PD-L1, поэтому их комбинация с ингибиторами чек-поинт-молекул представляется перспективной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, презентация антигена и активация ТКР являются наиболее изученными, но не единственными механизмами регуляции экспрессии PD-1. В условиях *in vivo* на клетки постоянно действуют разнообразные регулирующие факторы, часто антагонистичные по отношению друг к другу, запускающие различные сигнальные пути. Стимуляция цитокинами и, возможно, гормональное воздействие также могут приводить к экспрессии ингибиторных чек-поинт-рецепторов активированными Т-клетками с целью ограничения их функциональной активности. Антигеннезависимая экспрессия PD-1, TIM-3, LAG-3 и других ингибиторных рецепторов в настоящее время продолжает изучаться и, как правило, не учитывается при проведении терапии соответствующими моноклональными антителами.

Эффективность анти-CTLA-4- и особенно анти-PD-1/PD-L1-препаратов привела к многочисленным клиническим испытаниям ингибиторов других чек-поинт-рецепторов и в целом к возрождению угасающей веры в потенциал противоопухолевой иммунотерапии. Основным осложнением при применении ингибиторов чек-поинт-молекул является развитие разнообразных аутоиммунных реакций, объединенных термином «иммуноопосредованные нежелательные события», частота и выраженность которых могут перевешивать клиническую эффективность. Изучение влияния основных сигнальных путей на экспрессию чек-поинт-рецепторов – мишеней таргетной терапии может способствовать появлению новых подходов к лечению опухолей, в частности, комбинаций ингибиторов чек-поинт-молекул с препаратами – блокаторами различных киназ и транскрипционных факторов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Gellrich F.F., Schmitz M., Beissert S., Meier F. Anti-PD-1 and novel combinations in the treatment of melanoma – an update. J Clin Med 2020;9(1):223. DOI: 10.3390/jcm9010223
2. Fitzsimmons T.S., Singh N., Walker T.D.J. et al. Immune checkpoint inhibitors efficacy across solid cancers and the utility of PD-L1 as a biomarker of response: a systematic review and meta-analysis. Front Med (Lausanne) 2023;10:1192762. DOI: 10.3389/fmed.2023.1192762
3. Dai S., Jia R., Zhang X. et al. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases. Cell Immunol 2014;290(1):72–9. DOI: 10.1016/j.cellimm.2014.05.006
4. Hamanishi J., Mandai M., Matsumura N. et al. PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. Int J Clin Oncol 2016;21(3):462–73. DOI: 10.1007/s10147-016-0959-z
5. Arasanz H., Gato-Cañas M., Zuazo M. et al. PD1 signal transduction pathways in T cells. Oncotarget 2017;8(31):51936–45. DOI: 10.18632/oncotarget.17232.
6. Chamoto K., Yaguchi T., Tajima M., Honjo T. Insights from a 30-year journey: function, regulation and therapeutic modulation of PD1. Nat Rev Immunol 2023;23(10):682–95. DOI: 10.1038/s41577-023-00867-9
7. Bardhan K., Anagnostou T., Boussiotis V.A. The PD1:PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. Front Immunol 2016;7:550. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00550
8. Lee J.U., Kim L.K., Choi J.M. Revisiting the concept of targeting NFAT to control t cell immunity and autoimmune diseases. Front Immunol 2018;9:2747. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02747
9. Simon S., Labarriere N. PD-1 expression on tumor-specific T cells: friend or foe for immunotherapy? Oncoimmunology 2017;7(1):e1364828. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1364828
10. Jenkins E., Whitehead T., Fellermeyer M. et al. The current state and future of T-cell exhaustion research. Oxf Open Immunol 2023;4(1):iqad006. DOI: 10.1093/oxfimm/iqad006
11. Martinez G.J., Pereira R.M., Äijö T. et al. The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8$^+$ T cells. Immunity 2015;42(2):265–78. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.01.006
12. Sekine T., Perez-Potti A., Nguyen S. et al. TOX is expressed by exhausted and polyfunctional human effector memory CD8$^+$ T cells. Sci Immunol 2020;5(49):eaba7918. DOI: 10.1126/sciimmunol.aba7918
13. Franco F., Jaccard A., Romero P. et al. Metabolic and epigenetic regulation of T-cell exhaustion. Nat Metab 2020;2(10):1001–12. DOI: 10.1038/s42255-020-00280-9
14. Van der Leun A.M., Thommen D.S., Schumacher T.N. CD8$^+$ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. Nat Rev Cancer 2020;20(4):218–32. DOI: 10.1038/s41568-019-0235-4
15. ElTanbouly M.A., Noelle R.J. Rethinking peripheral T cell tolerance: checkpoints across a T cell's journey. Nat Rev Immunol 2021;21(4):257–67. DOI: 10.1038/s41577-020-00454-2
16. Lowther D.E., Goods B.A., Lucca L.E. et al. PD-1 marks dysfunctional regulatory T cells in malignant gliomas. JCI Insight 2016;1(5):e85935. DOI: 10.1172/jci.insight.85935
17. Batorov E.V., Ineshina A.D., Aristova T.A. et al. PD-1$^+$ and TIM-3$^+$ T cells widely express common γ-chain cytokine receptors in multiple myeloma patients, and IL-2, IL-7, IL-15 stimulation up-regulates PD-1 and TIM-3 on T cells. Oncol Res 2024;32(10):1575–87. DOI: 10.32604/or.2024.047893
18. Kinter A.L., Godbout E.J., McNally J.P. et al. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. J Immunol 2008;181(10):6738–46. DOI: 10.4049/jimmunol.181.10.6738
19. Mujib S., Jones R.B., Lo C. et al. Antigen-independent induction of Tim-3 expression on human T cells by the common г-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 is associated with proliferation and is dependent on the phosphoinositide 3-kinase pathway. J Immunol 2012;188(8):3745–56. DOI: 10.4049/jimmunol.1102609
20. Marshall N., Hutchinson K., Marron T.U. et al. Antitumor T-cell homeostatic activation is uncoupled from homeostatic inhibition by checkpoint blockade. Cancer Discov 2019;9(11):1520–37. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-19-0391
21. Batorov E.V., Aristova T.A., Pronkina N.V. et al. Highly proliferative and functional PD-1$^+$ and TIM-3$^+$ T cells are transiently increased in multiple myeloma following autologous hematopoietic stem cell transplantation. Int Immunopharmacol 2021;100:108093. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108093
22. Wang G., Tajima M., Honjo T., Ohta A. STAT5 interferes with PD-1 transcriptional activation and affects CD8$^+$ T-cell sensitivity to PD-1-dependent immunoregulation. Int Immunol 2021;33(11):563–72. DOI: 10.1093/intimm/dxab059
23. Beltra J.C., Abdel-Hakeem M.S., Manne S. et al. Stat5 opposes the transcription factor Tox and rewires exhausted CD8$^+$ T cells toward durable effector-like states during chronic antigen exposure. Immunity 2023;56(12):2699–718:e11. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.11.005
24. Beltra J.C., Bourbonnais S., Bédard N. et al. IL2Rβ-dependent signals drive terminal exhaustion and suppress memory development during chronic viral infection. Proc Natl Acad Sci USA 2016;113(37):E5444–53. DOI: 10.1073/pnas.1604256113
25. Liu Y., Zhou N., Zhou L. et al. IL-2 regulates tumor-reactive CD8$^+$ T cell exhaustion by activating the aryl hydrocarbon receptor. Nat Immunol 2021;22(3):358–69. DOI: 10.1038/s41590-020-00850-9
26. Moses C.T., Thorstenson K.M., Jameson S.C., Khoruts A. Competition for self ligands restrains homeostatic proliferation of naive CD4 T cells. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100(3):1185–90. DOI: 10.1073/pnas.0334572100
27. Hickman S.P., Turka L.A. Homeostatic T cell proliferation as a barrier to T cell tolerance. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2005;360(1461):1713–21. DOI: 10.1098/rstb.2005.1699
28. Lin S.J., Chen A.T., Welsh R.M. Immune system derived from homeostatic proliferation generates normal CD8 T-cell memory but altered repertoires and diminished heterologous immune responses. Blood 2008;112(3):680–9. DOI: 10.1182/blood-2008-01-132464
29. Onyshchenko K., Luo R., Guffart E. et al. Expansion of circulating stem-like CD8$^+$ T cells by adding CD122-directed IL-2 complexes

to radiation and anti-PD1 therapies in mice. Nat Commun 2023;14(1):2087. DOI: 10.1038/s41467-023-37825-x
30. Muhammad S., Fan T., Hai Y. et al. Reigniting hope in cancer treatment: the promise and pitfalls of IL-2 and IL-2R targeting strategies. Mol Cancer 2023;22(1):121. DOI: 10.1186/s12943-023-01826-7
31. Oh H.M., Yu C.R., Golestaneh N. et al. STAT3 protein promotes T-cell survival and inhibits interleukin-2 production through up-regulation of Class O Forkhead transcription factors. J Biol Chem 2011;286(35):30888–97. DOI: 10.1074/jbc.M111.253500
32. Dong C. Cytokine regulation and function in T cells. Annu Rev Immunol 2021;39:51–76. DOI: 10.1146/annurev-immunol-061020-053702
33. Sun Q., Zhao X., Li R. et al. STAT3 regulates $CD8^+$ T cell differentiation and functions in cancer and acute infection. J Exp Med 2023;220(4):e20220686. DOI: 10.1084/jem.20220686
34. Kaminskiy Y., Melenhorst J.J. STAT3 role in T-cell memory formation. Int J Mol Sci 2022;23(5):2878. DOI: 10.3390/ijms23052878
35. Powell M.D., Lu P., Neeld D.K. et al. IL-6/STAT3 signaling axis enhances and prolongs pdcd1 expression in murine CD8 T cells. Immunohorizons 2022;6(12):872–82. DOI: 10.4049/immunohorizons.2100112
36. Hanna B.S., Llaó-Cid L., Iskar M. et al. Interleukin-10 receptor signaling promotes the maintenance of a $PD\text{-}1^{int}$ $TCF\text{-}1^+$ $CD8^+$ T cell population that sustains anti-tumor immunity. Immunity 2021;54(12):2825–41.e10. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.11.004
37. Dong Y., Chen J., Chen Y., Liu S. Targeting the STAT3 oncogenic pathway: cancer immunotherapy and drug repurposing. Biomed Pharmacother 2023;167:115513. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115513
38. Zou S., Tong Q., Liu B. et al. Targeting STAT3 in cancer immunotherapy. Mol Cancer 2020;19(1):145. DOI: 10.1186/s12943-020-01258-7
39. Chen Y., Xu Z., Sun H. et al. Regulation of $CD8^+$ T memory and exhaustion by the mTOR signals. Cell Mol Immunol 2023;20(9):1023–39. DOI: 10.1038/s41423-023-01064-3
40. Bishop E.L., Gudgeon N., Dimeloe S. Control of T cell metabolism by cytokines and hormones. Front Immunol 2021;12:653605. DOI: 10.3389/fimmu.2021.653605
41. El Hage A., Dormond O. Combining mTOR inhibitors and t cell-based immunotherapies in cancer treatment. Cancers (Basel) 2021;13(6):1359. DOI: 10.3390/cancers13061359
42. Damasio M.P., Marchingo J.M., Spinelli L. et al. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway control of $CD8^+$ T cell differentiation. Biochem J 2021;478(1):79–98. DOI: 10.1042/BCJ20200661
43. Xiao X., Shi J., He C. et al. ERK and USP5 govern PD-1 homeostasis via deubiquitination to modulate tumor immunotherapy. Nat Commun 2023;14(1):2859. DOI: 10.1038/s41467-023-38605-3
44. Wang X., Tao X., Chen P. et al. MEK inhibition prevents CAR-T cell exhaustion and differentiation via downregulation of c-Fos and JunB. Signal Transduct Target Ther 2024;9(1):293. DOI: 10.1038/s41392-024-01986-y

Вклад авторов
Е.В. Баторов, Е.Р. Черных: анализ данных литературы, написание текста статьи;
П.В. Васильченко: анализ данных литературы, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала.
Authors' contributions
E.V. Batorov, E.R. Chernykh: analysis of literature data, article writing;
P.V. Vasilchenko: analysis of literature data, article writing, preparation of illustrative material.

ORCID авторов / ORCID of authors
Е.В. Баторов / E.V. Batorov: https://orcid.org/0000-0003-2902-9336
П.В. Васильченко / P.V. Vasilchenko: https://orcid.org/0009-0000-1100-9826
Е.Р. Черных / E.R. Chernykh: https://orcid.org/0000-0003-2346-6279

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 № 20-75-10132-П).
Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 20-75-10132-П).

Статья поступила: 20.06.2025. **Принята к публикации:** 06.10.2025. **Опубликована онлайн:** 10.12.2025.
Article submitted: 20.06.2025. **Accepted for publication:** 06.10.2025. **Published online:** 10.12.2025.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-81-90

Особенности эпителиально-мезенхимального перехода клеток серозного рака яичников высокой степени злокачественности

М.М. Воронова, А.С. Ильницкая, А.О. Жолудева, С.Н. Рубцова, К.И. Жордания, А.Ю. Александрова, Н.А. Глушанкова

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

Контакты: Наталия Александровна Глушанкова *n.gloushankova@ronc.ru*

Введение. Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) – основной процесс, инициирующий инвазию и метастазирование раковых клеток. Разрушение стабильной межклеточной адгезии и приобретение миграционного фенотипа клетками эпителиального происхождения являются основными этапами ЭМП.
Цель исследования – изучение миграционной активности и систем цитоскелета клеток первичных опухолевых культур серозного рака яичников высокой степени злокачественности, полученных из операционного материала больных.
Материалы и методы. С использованием коррелятивной видеомикроскопии и иммунофлуоресцентной микроскопии исследованы характер миграции и распределение белков межклеточной адгезии, структур актинового цитоскелета и виментиновых промежуточных филаментов.
Результаты. Клетки серозного рака яичников высокой степени злокачественности в первичных культурах продемонстрировали признаки неполного ЭМП: выявлены радикальная перестройка актинового цитоскелета, реорганизация межклеточных адгезионных контактов при сохранении экспрессии Е-кадхерина в большинстве образцов, включение экспрессии мезенхимальных маркеров виментина и N-кадхерина, а также высокая миграционная активность. Гетерогенность выраженности маркеров ЭМП была характерна для различных клеточных популяций. В активно мигрирующих опухолевых клетках сильно выражена сеть виментиновых промежуточных филаментов.
Заключение. Для клеток серозного рака яичников высокой степени злокачественности, демонстрирующих повышенный потенциал к миграции, характерен неполный ЭМП, который может быть оптимальным выбором для клеток рака яичников, способствующим инвазии и метастазированию.

Ключевые слова: серозный рак яичников высокой степени злокачественности, эпителиально-мезенхимальный переход, клеточная миграция, цитоскелет, клеточная адгезия

Для цитирования: Воронова М.М., Ильницкая А.С., Жолудева А.О. и др. Особенности эпителиально-мезенхимального перехода клеток серозного рака яичников высокой степени злокачественности. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(4):81–90.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-81-90

Epithelial-mesenchymal transition in high grade serous ovarian cancer cells

M.M. Voronova, A.S. Ilnitskaya, A.O. Zholudeva, S.N. Rubtsova, K.I. Zhordania, A.Yu. Alexandrova, N.A. Gloushankova

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

Contacts: Nataliya Alexandrovna Gloushankova *n.gloushankova@ronc.ru*

Introduction. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is the major driver of invasion and metastasis of cancer cells. The hallmarks of EMT are disruption of stable cell-cell adhesion and acquisition of a migratory phenotype by epithelial cells.
Aim. To study of migratory activity and intracellular distribution of cell-cell adhesion proteins, actin cytoskeleton and vimentin intermediate filaments in primary cultures of high grade serous ovarian cancer obtained from clinical samples using correlative live cell imaging/immunofluorescence microscopy.
Materials and methods. Using correlative live cell imaging/immunofluorescence microscopy, we studied cell migration and intracellular distribution of cell-cell adhesion proteins, actin cytoskeleton structures and vimentin intermediate filaments.

Results. In primary cultures of high grade serous ovarian cancer many traits of incomplete EMT were observed, namely: dramatic remodeling of the actin cytoskeleton, reorganization of adherens junctions with retention of E-cadherin expression in the majority of samples, expression of mesenchymal markers such as vimentin and N-cadherin, and enhanced migratory activity. Different cell populations exhibited heterogeneous levels of EMT markers, for example, a prominent vimentin intermediate filament network was detected in actively migrating cancer cells.

Conclusion. High grade serous ovarian cancer cells with enhanced migration potential undergo incomplete EMT which is the optimal choice for promoting invasion and metastasis.

Keywords: high grade serous ovarian cancer, epithelial-mesenchymal transition, cell migration, cytoskeleton, cell adhesion

For citation: Voronova M.M., Ilnitskaya A.S., Zholudeva A.O. et al. Epithelial-mesenchymal transition in high grade serous ovarian cancer cells. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(4):81–90. (In Russ.). DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-81-90

ВВЕДЕНИЕ

Ключевым механизмом прогрессии опухолей эпителиального происхождения (карцином) является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). В ходе этого процесса клетки теряют признаки эпителиального фенотипа и приобретают свойства мезенхимальных клеток. Вступая в ЭМП, эпителиальные клетки утрачивают апикально-базальную полярность, стабильную межклеточную адгезию, в клетках резко снижается или полностью исчезает экспрессия эпителиальных маркеров и начинают экспрессироваться мезенхимальные маркеры (виментин, N-кадхерин, фибронектин и др.). Клетки, вступившие в ЭМП, приобретают способность к миграции и инвазии [1, 2].

В последнее время представления об ЭМП в опухолях изменились. Выяснилось, что он может быть динамичным и обратимым процессом, при этом опухоли представляют собой гетерогенные клеточные популяции, в которых клетки способны вступать в неполный (частичный) ЭМП, реализующийся с помощью различных программ. Клетки карцином могут продолжать экспрессировать эпителиальные маркеры, включать и мезенхимальные маркеры, и их соотношение способно меняться, что влияет на адаптацию опухолевых клеток к условиям микроокружения, характер клеточной диссеминации и чувствительность к химиотерапии [3–5].

Серозный рак яичников высокой степени злокачественности (high grade ovarian serous cancer, HGSOC) является наиболее часто встречающейся карциномой яичников (более 75 % случаев рака яичников), имеет агрессивный характер, активно метастазирует и рецидивирует, приобретая устойчивость к химиопрепаратам [6]. Как показало транскриптомное и протеомное профилирование, HGSOC в большинстве случаев возникает из секреторных клеток фимбриального отдела маточных труб. Ранним генетическим нарушением в секреторных клетках является мутация в гене *TP53*, что приводит к развитию серозной тубулярной интраэпителиальной карциномы, эволюционирующей в HGSOC [7–11]. Клетки HGSOC диссеминируют в яичник и брюшную полость, где циркулируют в асцитической жидкости в виде сфероидов [12]. Опухолевые клетки карцином яичников инвазируют мезотелий брюшины, направляясь чаще всего в большой сальник, а также метастазируют в парааортальные лимфатические узлы и органы брюшной полости [13, 14].

В литературе имеются сообщения об изменениях экспрессии E-кадхерина и маркеров ЭМП, в частности мезенхимального маркера виментина, в опухолевой ткани рака яичников [15, 16]. Вместе с тем детальных исследований, посвященных анализу изменений характера структур межклеточной адгезии, цитоскелетных структур, локализации белков межклеточной адгезии и контактов с подлежащим матриксом в клетках HGSOC, до настоящего времени не проводилось. Для анализа особенностей ЭМП в HGSOC мы использовали коррелятивную видеомикроскопию и иммунофлуоресцентную микроскопию первичных культур HGSOC, которая позволяет сопоставить миграционные характеристики клеток с организацией их цитоскелетных систем, регулирующих миграцию, распределением белков межклеточной адгезии, фокальных адгезий между клетками и подлежащим матриксом.

Цель исследования – изучение миграционной активности и систем цитоскелета клеток первичных опухолевых культур HGSOC, полученных из операционного материала больных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение первичных культур опухолевых клеток HGSOC. Первичные культуры опухолевых клеток получали из образцов опухолевой ткани от пациенток с раком яичников. Образцы измельчали механически до получения фрагментов объемом 1–2 мм^3. Полученную клеточную суспензию высевали в культуральные флаконы в среду RPMI (Gibco, Великобритания), содержащую 15 % эмбриональной телячьей сыворотки (Biovest, США) и 100 МЕ/мл пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия). Клетки культивировали при 37 °C в атмосфере, содержащей 5 % CO_2, в течение 3–5 дней до достижения необходимой плотности.

Коррелятивная видеомикроскопия и иммунофлуоресцентная микроскопия. Клетки, выделенные из образца опухолевой ткани, высевали на меченые покровные стекла, помещенные в двухлуночные камеры ibidi со стеклянным дном (ibidi GmbH, Германия), и проводили прижизненную цейтраферную видеосъемку клеток (1 кадр/5 мин) в течение 20 ч с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-E, оснащенного объективом Nikon Plan 20× и камерой ORCA-ER (Hamamatsu Photonics, Япония), управляемой с помощью программного обеспечения NIS-Elements AR 3.22 (Nikon, Япония). Первичные параметры миграции клеток определяли с помощью программного обеспечения Fiji/ImageJ (v.2.9.0, NIH, США), далее с использованием Microsoft Excel 2016 (Microsoft, США) рассчитывали скорость миграции клеток и длину траектории.

После видеосъемки клетки фиксировали для иммунофлуоресцентного окрашивания цитокератина (CK) 7 или CK18, E-кадхерина и виментина. Для фиксации использовали 1 % параформальдегид (Sigma-Aldrich, США), приготовленный на среде DMEM с 20 мМ HEPES. Клетки фиксировали при комнатной температуре в течение 15 мин с последующей дофиксацией метанолом в течение 3 мин при температуре –20 °C. Также проводили дополнительное флуоресцентное окрашивание E-кадхерина и N-кадхерина, винкулина, α-катенина и F-актина клеток, растущих на немеченых стеклах. Для окрашивания винкулина, α-катенина и F-актина клетки фиксировали 3,7 % параформальдегидом (Sigma-Aldrich, США) с последующей пермеабилизацией 0,25 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США) в течение 3 мин. Все антитела и красители использовали в разведениях, соответствующих рекомендациям производителя. Образцы исследовали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-E, оснащенного объективом Nikon Plan 40× и камерой ORCA-ER (Hamamatsu Photonics, Япония).

Антитела и реагенты. Использовали следующие первичные антитела: мышиные моноклональные антитела к E-кадхерину (клон 36; BD Transduction Laboratories, США), мышиные моноклональные антитела к N-кадхерину (клон 32; BD Transduction Laboratories, США), кроличьи антитела к виментину (D21H3; Cell Signaling, США), мышиные моноклональные антитела к CK18 (клон CK5; Sigma-Aldrich, США), мышиные моноклональные антитела к винкулину (клон hVIN-1; Sigma, Merck, Германия), мышиные антитела к α-катенину (клон 15D9; Enzo Life Sciences, США). В качестве вторичных антител применяли антитела козы к мышиным иммуноглобулинам (Ig) G1, IgG2a, IgG2b и антитела козы к мышиному и кроличьему IgG, конъюгированные с Alexa Fluor488, Alexa Fluor594 или Alexa Fluor647 (Jackson ImmunoResearch, США). Ядра клеток метили красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Коррелятивная видеомикроскопия и иммунофлуоресцентная микроскопия. Для исследования особенностей ЭМП клеток HGSOC использованы первичные культуры, полученные из операционного материала 26 онкологических больных, диагноз которых подтвержден патоморфологическим исследованием. Клетки опухолевых образцов переведены в культуру и росли на меченых стеклах, помещенных в двухлуночные камеры ibidi со стеклянным дном (ibidi GmbH, Германия). Через 3–5 дней после начала культивирования исследовали фенотип и поведение опухолевых клеток в 10 полях зрения на протяжении 20 ч, после чего клетки фиксировали для иммунофлуоресцентного окрашивания CK7 или CK18, E-кадхерина и виментина.

С помощью программы ImageJ для 10–20 клеток из каждого сюжета построены траектории движения клеток и определены средние скорости миграции. Предлагаемый подход позволяет исследовать миграционную активность опухолевых клеток, особенности их фенотипа с последующим анализом наличия и распределения эпителиальных и мезенхимальных маркеров, цитоскелетных структур и белков межклеточной адгезии в этих клетках.

На рис. 1 представлен пример опухолевой культуры, полученной из образца П368 опухолевой ткани HGSOC. Клетки опухоли обладали мезенхимальным фенотипом: имели полигональную или треугольную форму и образовывали ламеллиподии на ведущем крае. Клетки также могли принимать выгнутую кератоцитоподобную форму с одной широкой ведущей ламеллиподией. Большинство клеток активно мигрировали по поверхности субстрата, иногда останавливаясь и меняя направление движения. Как показало иммунофлуоресцентное окрашивание белков промежуточных филаментов, опухолевые клетки экспрессировали CK7, который был организован в сеть; в центральной части клетки кератиновые филаменты собирались в жгуты, плотно окружающие клеточное ядро. Также клетки первичной культуры опухолевого образца П368 экспрессировали виментин, собирающийся в филаменты, которые образовывали сеть, распространяющуюся из центра клетки на периферию.

Виды миграции клеток первичных культур HGSOC. Результаты видеомикроскопического исследования первичных культур показали, что ЭМП в клеточных популяциях HGSOC проявляется неравномерно. В большинстве опухолей значительная доля клеток вступила в ЭМП, т. е. имела высокий потенциал к метастазированию. Многие клетки в культуре проявляли высокую миграционную активность, большинство из них мигрировали индивидуально, используя мезенхимальный тип миграции. Средняя скорость миграции составила около 0,5 мкм/мин. Иногда клетки могли изменять форму и округляться. Такие клетки легко открепляլись от субстрата.

В образцах также наблюдались островки клеток, в которых опухолевые клетки сохраняли связь друг с другом. Такие островки могли оставаться неподвижными или немного перемещаться по субстрату, а из них – выходить группы из 2–3 клеток или одиночные клетки, которые мигрировали индивидуально или через какое-то время возвращались и прикрепля-

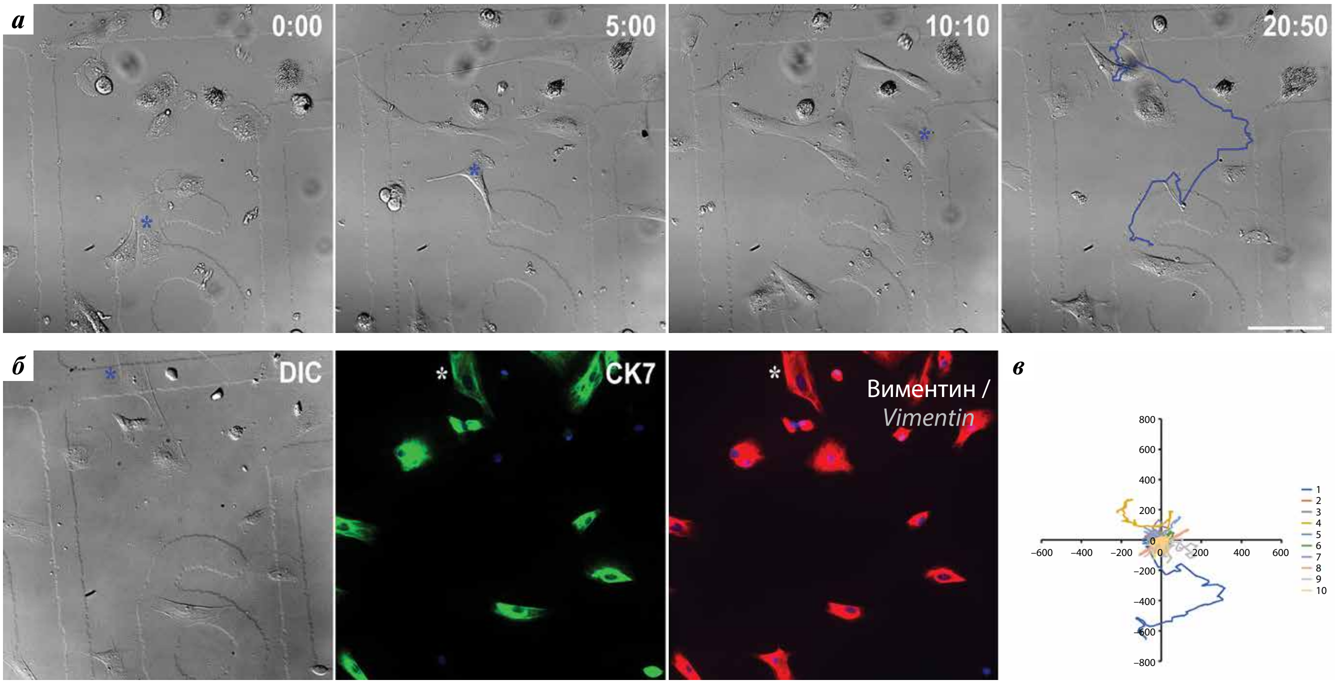


Рис. 1. *Коррелятивная видеомикроскопия и иммунофлуоресцентная микроскопия, масштаб 100 мкм. Клетки первичной культуры опухолевого образца П368 на меченом стекле снимали с использованием дифференциальной интерференционной контрастной (differential interference contrast, DIC) видеомикроскопии (а) в течение 21 ч. На рис. а (последний кадр) приведена траектория движения клетки, отмеченной звездочкой. Далее клетки фиксировали и проводили иммунофлуоресцентное окрашивание цитокератина 17 (CK7), виментина и клеточных ядер. Отснятое на видео поле находили в DIC-канале (б). CK7 (отмечено зеленым цветом), виментин (отмечено красным цветом) и ядра (отмечено синим цветом) выявляли в соответствующих каналах флуоресцентного микроскопа. Траектории движения 10 случайно выбранных клеток показаны на итоговой диаграмме (в)*

Fig. 1. *Correlative video microscopy and immunofluorescence microscopy, scale 100 microns, scale, 100 μm. Tumor sample #П368. Live cell differential interference contrast (DIC) imaging (а) during 21 h. Fig. а (the last frame) shows the trajectory of the cell marked with an asterisk. Next, the cells were fixed and immunofluorescence staining of cytokeratin 7 (CK7), vimentin, and cell nuclei was performed. The field captured on video was found in the DIC channel (б). CK7 (green), vimentin (red) and nuclei (blue) were detected in the corresponding channels of a fluorescence microscope. The trajectories of 10 randomly selected cells are shown in the final diagram (в)*

лись к островку. Некоторые островки были более рыхлыми, в них наблюдалась направленная миграция нескольких сцепленных между собой клеток (коллективная миграция) (рис. 2).

Реорганизация структур межклеточной адгезии опухолевых клеток. Для того чтобы клетки карцином начали мигрировать из первичного опухолевого узла, должны быть разрушены межклеточные адгезионные контакты (АК), обеспечивающие стабильную связь с соседними клетками, характерную для клеток эпителиального происхождения. В классической парадигме ЭМП ослабление межклеточной адгезии связано с угнетением экспрессии Е-кадхерина в результате действия транскрипционных факторов семейств Snail, Zeb и Twist. В наших исследованиях первичных культур HGSOC наблюдался спектр состояний ЭМП: от сохранения Е-кадхерина в стабильных тангенциальных (линейных) АК в островках вплоть до полной потери Е-кадхерина и его замены на мезенхимальный N-кадхерин в 2 образцах (рис. 3). В большинстве первичных культур в клетках, находящихся в контакте, отмечалась аккумуляция Е-кадхерина на мембране, однако, в отличие от линейных АК нормальных эпителиальных клеток, АК опухолевых клеток часто были точечными или штриховыми (радиальными). В АК также мог присутствовать N-кадхерин. Как показали результаты наших предыдущих исследований, такие контакты поддерживают межклеточную адгезию, но крайне нестабильны и быстро разрушаются при активации клеточной миграции, при этом клетки легко отрываются от соседних клеток и выходят из островков [17].

Цитоскелетные структуры опухолевых клеток. Миграция клеток, вступивших в ЭМП, определяется динамическими структурами цитоскелета. Движущей силой мезенхимальной миграции являются актиновые микрофиламенты, образующие Arp2/3-зависимую актиновую сеть на ведущем крае клетки и актин-миозиновые пучки, обеспечивающие сокращение тела клетки и отрыв хвостовой части для последующего перемещения клетки в направлении движения. С использованием меченного родамином фаллоидина в опухолевых клетках первичных культур HGSOC мы оценили распределение филаментного актина. Наиболее выраженная реорганизация актинового цитоскелета была характерна для клеток, мигрирующих индивидуально или выходящих из островков. Такие клетки соби-

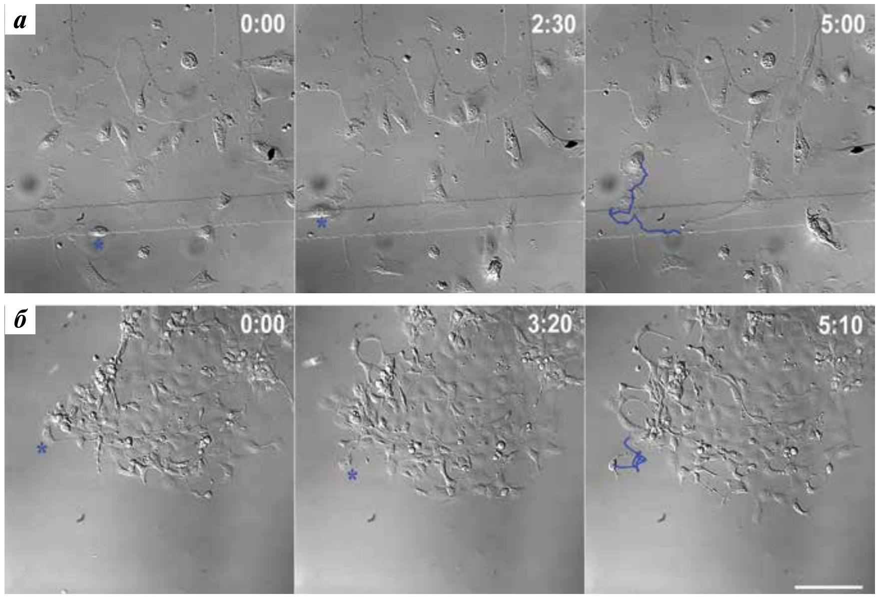


Рис. 2. *Индивидуальная и коллективная миграция клеток серозного рака яичников высокой степени злокачественности. Прижизненная дифференциальная интерференционная контрастная (differential interference contrast, DIC) видеомикроскопия первичных опухолевых культур, масштаб 100 мкм. Представлены кадры из соответствующих видеосюжетов: а – образец П326. Индивидуально мигрирующая клетка отмечена звездочкой. Траектория ее движения за 5 ч активной миграции указана синей линией на последнем кадре; б – образец П305. Большинство клеток распластаны и сцеплены, мигрируют коллективно в составе островка. Клетка на краю островка, помеченная звездочкой, отрывается от него и мигрирует индивидуально. Траектория ее движения за 5 ч указана синей линией на последнем кадре*

Fig. 2. *Individual and collective migration of high grade serous ovarian cancer cells. Live cell differential interference contrast (DIC) imaging of primary tumor cultures, scale, 100 μm. Frames from relevant videos are shown: а – tumor sample П326. An individually migrating cell is indicated by an asterisk. Its 5-hour long active migration track is shown in blue on the last frame; б – tumor sample П305. The majority of the cells form a collectively migrating island. These cells are well spread and linked together. A cell breaks away from the island and migrates individually (indicated by an asterisk). Its 5-hour long migration track is shown in blue on the last frame*

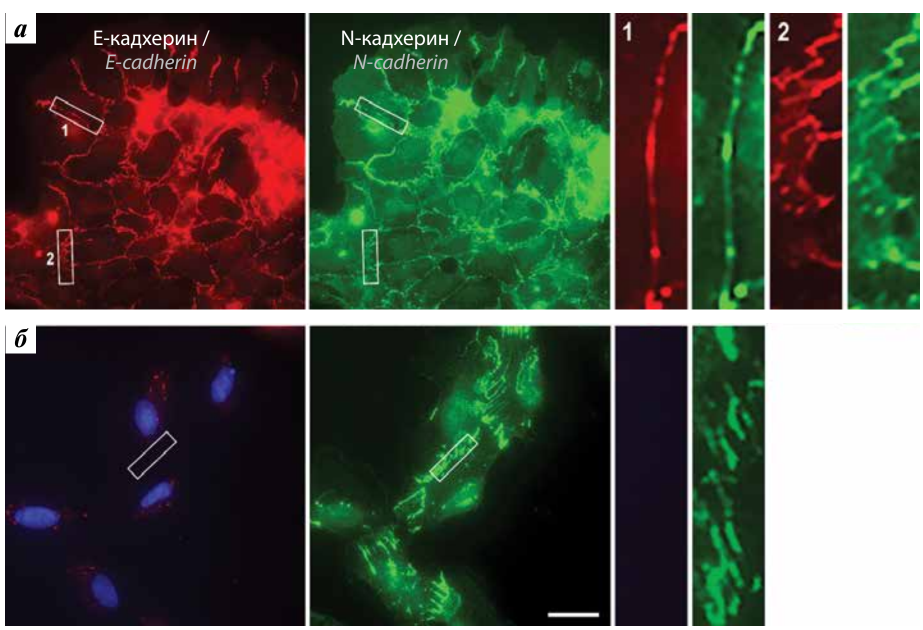


Рис. 3. *Межклеточные адгезионные контакты (АК) клеток первичных культур серозного рака яичников высокой степени злокачественности. Иммунофлуоресцентное окрашивание Е-кадхерина и N-кадхерина в клетках первичных культур, масштаб 25 мкм: а – клетки с коэкспрессией Е-кадхерина (указано красным цветом) и N-кадхерина (указано зеленым цветом). Во врезках показаны различные типы межклеточных АК при большем увеличении: тангенциальные (врезка 1) и радиальные (врезка 2); б – клетки с потерей мембранной локализации Е-кадхерина. Е-кадхерин отсутствует в межклеточных контактах, N-кадхерин формирует радиальные межклеточные АК. Ядра окрашены DAPI (указано синим цветом). Во врезках – зона межклеточного контакта при большем увеличении*

Fig. 3. *Adherens junctions (AJs) in primary cultures of high grade serous ovarian cancer. Immunofluorescence analysis of E-cadherin and N-cadherin distribution in primary cultures, scale, 25 μm: а – cells express both E-cadherin (red) and N-cadherin (green). Different types of AJs are shown in inserts at higher magnification: tangential AJs (insert 1) and radial AJs (insert 2). Bottom row – cells with no discernible E-cadherin localization at the cell membrane. E-cadherin is absent from AJs; radial AJs are formed by N-cadherin. Cell-cell adhesion regions are shown in inserts at higher magnification. Cell nuclei were stained with DAPI (blue)*

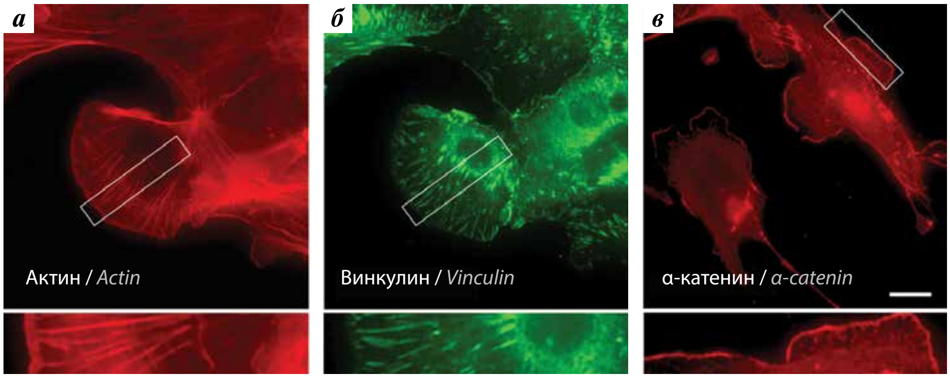


Рис. 4. *Распределение структур актинового цитоскелета и адгезионных белков в клетках первичных культур серозного рака яичников высокой степени злокачественности: а, б – двойное флуоресцентное окрашивание актина и белка фокальных контактов винкулина. В клетке, выходящей из островка, на ведущем крае в виде тонкой линии собирается актиновая сеть, в цитоплазме формируются актиновые пучки, отходящие от фокальных контактов; в – флуоресцентное окрашивание α-катенина, который перераспределяется на край вновь образующихся ламеллиподий мигрирующих клеток. Во врезках – области при большем увеличении. Масштаб 10 мкм*

Fig. 4. *Intracellular distribution of structures of the actin cytoskeleton and adhesion proteins in cells of primary cultures of high-grade serous ovarian cancer: а, б – double fluorescent staining of actin and the focal adhesion protein of vinculin. In the cell breaking away from the island, an actin network polymerizes at the leading edge in the form of a thin line, actin bundles are formed in the cytoplasm, extending from the focal adhesions; в – fluorescent staining of α-catenin, which is redistributed to the edge of the newly formed lamellipodia of migrating cells. The inserts show the areas at a higher magnification. Scale, 10 μm*

рали актиновую сеть, которая при флуоресцентной микроскопии визуализировалась как тонкая линия, окаймляющая ведущий край клетки. В цитоплазме видны прямые актиновые пучки, ориентированные вдоль длинной оси клетки (рис. 4, *а*). Мигрирующие клетки образовывали фокальные контакты с подложкой, что выявлено с использованием антител к одному из белков фокальных контактов – винкулину (см. рис. 4, *б*). Часть популяции клеток первичных культур HGSOC, образующих островки, могла сохранять организацию актинового цитоскелета, характерную для нормальных эпителиальных клеток, – кольцевые актиновые пучки, ассоциированные с межклеточными АК.

В мигрирующих клетках серозных карцином высокой степени злокачественности также наблюдалось перераспределение белка межклеточных АК α-катенина на ведущий край клетки (см. рис. 4, *в*). Феномен использования белков межклеточной адгезии для активации клеточной миграции мы впервые описали *in vitro* в культуре клеток линии IAR-20, входящих в динамичный ЭМП под действием эпидермального фактора роста (EGF) [18].

Наиболее типичным маркером ЭМП является виментин. С использованием мышиных моноклональных и кроличьих антител к виментину изучена его локализация в опухолевых клетках первичных культур образцов HGSOC. По результатам иммунофлуоресцентной микроскопии экспрессия виментина может индуцироваться не во всех опухолевых клетках. Гетерогенное окрашивание виментина характерно, в частности, для островков. В таких островках часть клеток лишена виментина, в то время как другие клетки не только экспрессировали этот белок, но и собирали его в протофиламенты или даже в полноценную цитоплазматическую сеть (рис. 5). Следует отметить, что, как показали коррелятивная видеомикроскопия и иммунофлуоресцентная микроскопия, в мигрирующих одиночных клетках, а также во многих клетках на краю островков есть сеть виментиновых промежуточных филаментов.

Таким образом, исследование первичных опухолевых культур свидетельствует об индукции программ ЭМП в клетках HGSOC. Популяции опухолевых клеток отличались гетерогенностью выраженности маркеров ЭМП; клетки большинства образцов вступали в неполный ЭМП, сохраняя экспрессию Е-кадхерина и одновременно индуцируя экспрессию мезенхимальных маркеров. В активно мигрирующих опухолевых клетках была выражена сеть виментиновых промежуточных филаментов. Характерной особенностью клеток HGSOC с гибридным эпителиально-мезенхимальным фенотипом являлась радикальная реорганизация актинового цитоскелета и межклеточных АК. Также в опухолевых образцах наблюдалось разнообразие паттернов миграции клеток: они могли мигрировать строго индивидуально, строго коллективно или переходить из одного режима миграции в другой.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследований последних лет, программа ЭМП, запускающая инвазионно-метастатический каскад в опухолях эпителиального происхождения (карциномах), не может считаться переключателем, переводящим раковые клетки из эпителиального фенотипа в мезенхимальный. В большинстве своем опухолевые клетки вступают в неполный ЭМП и приобретают гибридный эпителиально-мезенхимальный фенотип, сохраняя частично экспрессию эпителиальных маркеров, но включая при этом экспрессию мезенхимальных маркеров. В различных опухолях ЭМП представляет собой совокупность изменений уровней экспрессии транскрипционных факторов ЭМП и регулирующих

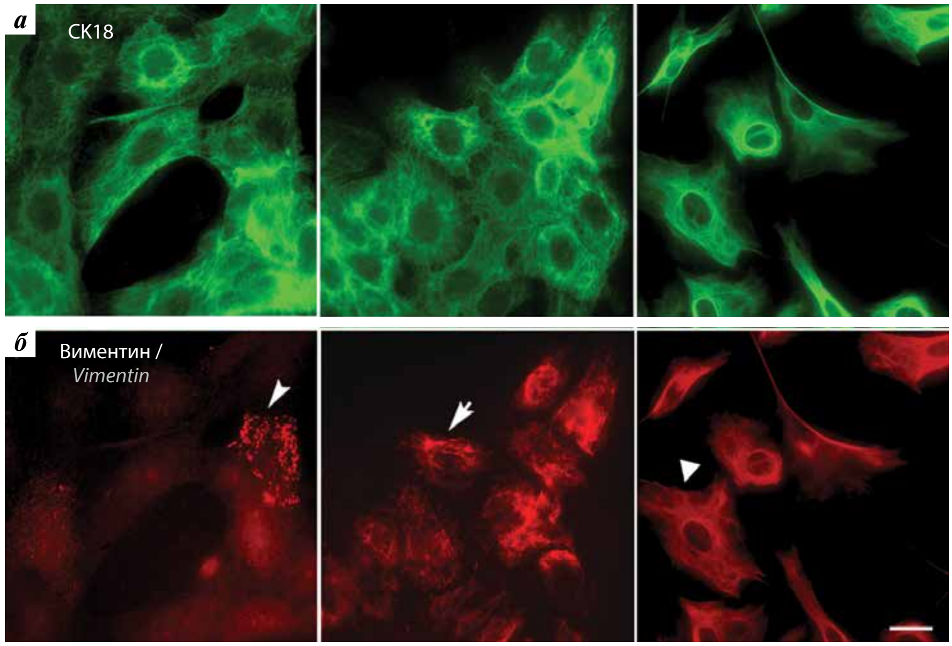


Рис. 5. *Экспрессия виментина в клетках первичных культур серозного рака яичников высокой степени злокачественности. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание цитокератина 18 (CK18) и виментина, масштаб 10 мкм: а – цитокератиновая сеть заполняет всю цитоплазму и концентрируется вокруг ядра во всех клетках; б – гетерогенность сборки виментиновых промежуточных филаментов. Флажком помечена инициация сборки виментиновых филаментов, стрелкой – протофиламенты виментина, треугольником – собранная сеть виментиновых филаментов*

Fig. 5. *Expression of vimentin in primary cultures of high grade serous ovarian cancer. Double immunofluorescent staining for cytokeratin 18 (CK18) and vimentin, scale, 10 μm: a – cytokeratin filament network fills the entire cytoplasm with higher concentration of filaments in the juxtanuclear region in every cell; б – variability in the extent of vimentin intermediate filament network assembly. Arrowhead indicates initiation of vimentin intermediate filament network assembly, arrow, vimentin protofilaments, triangle, fully assembled vimentin intermediate filament network*

их микроРНК, компонентов сигнальных путей. Эти изменения в конечном счете позволяют опухолевым клеткам оторваться от соседних клеток в первичной опухоли, инвазировать подлежащую строму и мигрировать в организме с последующим образованием очагов вторичного роста (метастазов) [3–5, 19].

Видеомикроскопия первичных опухолевых культур представляет собой удобный подход *in vitro* для исследования фенотипа опухолевых клеток, анализа их межклеточных взаимодействий и изучения миграционной активности, лежащей в основе процессов инвазии и метастазирования. В данном исследовании для оценки особенностей ЭМП в HGSOC мы использовали коррелятивную видеомикроскопию и иммунофлуоресцентную микроскопию первичных культур HGSOC, которая позволяет сопоставить миграционные характеристики клеток и организацию их цитоскелетных систем, распределение белков межклеточной адгезии и фокальных адгезий.

Как показали результаты коррелятивной видеомикроскопии и иммунофлуоресцентной микроскопии, клетки HGSOC в первичных культурах демонстрировали признаки ЭМП. Культуры, полученные из опухолевых образцов, включали как островки клеток, так и одиночные мигрирующие клетки, экспрессирующие CKs. В ходе иммунофлуоресцентного исследования обнаружено, что клетки в островках сохраняли адгезивные взаимодействия, образуя АК. В большинстве образцов в таких контактах присутствовал E-кадхерин; помимо этого в состав АК мог входить также N-кадхерин. При этом наблюдались различия в морфологии АК. В некоторых случаях это были тангенциальные (линейные) контакты; часто опухолевые клетки на межклеточных границах собирали точечные или штриховые (радиальные) АК. Ранее мы обнаружили принципиальные различия в стабильности, сборке и регуляции тангенциальных и радиальных АК [17]. Тангенциальные (линейные) E-кадхериновые АК являются чрезвычайно стабильными структурами нормальных эпителиальных клеток, для их формирования требуется участие малой ГТФазы Rac и формина Dia1. Сборка радиальных (штриховых) E-кадхериновых и N-кадхериновых АК регулируется малой ГТФазой Rho и ее эффектором ROCK и зависит от контрактильности актина-миозина. Радиальные АК крайне динамичны и нестабильны, они легко разбираются, что в значительной степени ослабляет межклеточные взаимодействия и позволяет активировать клеточную миграцию. Ранее на клетках линий IAR-20 и IAR-6-1 мы показали, что одним из механизмов ослабления межклеточной адгезии в ходе ЭМП является основанное на радикальной реорганизации актинового цитоскелета замещение тангенциальных АК радиальными АК, образованными E-кадхерином [17, 20]. Реорганизация E-кадхериновых АК наблюдалась также и в клетках первичных культур HGSOC, радиальные и точечные

АК могли удерживать клетки в контакте, но также позволяли им довольно легко разрывать связи с соседними клетками и мигрировать индивидуально. В цитоплазме одиночных мигрирующих клеток HGSOC Е-кадхерин часто наблюдался в составе эндосом, что указывает на разборку предсуществующих АК.

Несмотря на то что традиционно Е-кадхерину в опухолях приписывают супрессорную роль, на нескольких мышиных моделях карцином молочной железы обнаружено, что сохранение его экспрессии способствует выживанию опухолевых клеток при метастазировании [21]. Результаты исследования *in vitro* клеток опухолевых линий также указывают на то, что Е-кадхерин может увеличить выживаемость опухолевых клеток, а его эктодомен – активировать в клетках онкогенный сигналинг и способствовать диссеминации опухолевых клеток [22–25]. Можно предположить, что в случае HGSOC Е-кадхерин может способствовать метастазированию клеток с гибридным эпителиально-мезенхимальным фенотипом, объединяя их в кластеры, повышающие адаптационные возможности клеток в эктопических условиях, в частности в асцитической жидкости брюшной полости, где клетки циркулируют в неприкрепленном состоянии.

Данные видеомикроскопических исследований свидетельствуют о высоком уровне миграционной активности клеток HGSOC, что указывает на высокий метастатический потенциал клеток исходной опухоли. В первичных культурах чаще всего наблюдалась рандомная миграция одиночных клеток; также одиночные клетки или группы из 2–3 клеток могли выходить из островков и активно мигрировать по субстрату. В 6 образцах наблюдалась миграция отдельных островков (коллективная миграция). Ранее мы показали, что миграция клеток в состоянии ЭМП активируется в результате радикальной перестройки актинового цитоскелета – разрушения кольцевых актиновых пучков, ассоциированных с АК, и смещения акцента сборки актиновой сети в ламеллиподии на межклеточных границах и на ведущем крае [20]. Реорганизация цитоскелетных структур и сборка актиновой сети в ламеллиподиях, определяющие выход клеток из островков и активную миграцию одиночных клеток, наблюдались и в клетках первичных культур HGSOC. На активном крае мигрирующих клеток также аккумулировался белок межклеточной адгезии α-катенин. При изучении ЭМП в нескольких клеточных линиях ранее мы обнаружили, что разрушение АК при ослаблении межклеточной адгезии сопровождается перераспределением α-катенина на ведущий край мигрирующих клеток. Показана значимая роль белков межклеточной адгезии в индукции направленной миграции [18]. В клетках HGSOC α-катенин также, по-видимому, участвует в регуляции клеточной миграции, поскольку его перераспределение из АК в ламеллиподии наблюдалось в первичных опухолевых культурах.

При анализе видеомикроскопических данных и последующей иммунофлуоресцентной микроскопии клеток первичных культур HGSOC, окрашенных на виментин, мы обнаружили, что характерной особенностью мигрирующих опухолевых клеток является наличие в их цитоплазме сети виментиновых промежуточных филаментов. Индукция экспрессии виментина также детектировалась в некоторых клетках островков. Распределение виментина при этом носило неравномерный характер, а степень сборки виментиновых промежуточных филаментов варьировала от коротких протофиламентов и полусобранной сети до разветвленной сети, заполняющей всю цитоплазму. Результаты исследования подтверждают многочисленные данные других авторов о присутствии виментина как маркера ЭМП в опухолевых клетках [1, 5]. Значение этого белка в мезенхимальной миграции показано в ряде работ [26], его участие в формировании и росте метастазов на мышиных моделях – в недавних исследованиях [27, 28]. Однако функциональная роль виментина и виментиновых промежуточных филаментов в миграции и инвазии опухолевых клеток до сих пор остается неясной и требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все морфологические параметры клеток исследованных образцов HGSOC соответствуют частичному/неполному ЭМП, цитоскелетные механизмы которого основаны на радикальной реорганизации актинового цитоскелета и межклеточных АК. С учетом гибкости неполного ЭМП и пластичности гибридного фенотипа неполный ЭМП может быть оптимальной стратегией морфологической трансформации клеток HGSOC, способствующей инвазии и метастазированию.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Nieto M.A., Huang R.Y.Y.J., Jackson R.A.A. et al. EMT: 2016. Cell 2016;166(1):21–45. DOI: 10.1016/j.cell.2016.06.028
2. Yang J., Antin P., Berx G. et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol 2020;21(6):341–52. DOI: 10.1038/s41580-020-0237-9
3. Thompson E.W., Nagaraj S.H. Transition states that allow cancer to spread. Nature 2018;556(7702):442–4. DOI: 10.1038/d41586-018-04403-x
4. Pastushenko I., Blanpain C. EMT transition states during tumor progression and metastasis. Trends Cell Biol 2019;29(3):212–26. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.12.001
5. Dongre A., Weinberg R.A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. Nat Rev Mol Cell Biol 2019;20(2):69–84. DOI: 10.1038/s41580-018-0080-4
6. Жордания К.И., Калиничева Е.В., Моисеев А.А. Рак яичников: эпидемиология, морфология и гистогенез. Онкогинекология 2017;3(23):26–32.
Zhordania K.I., Kalinicheva E.V., Moiseev A.A. Ovarian cancer: epidemiology, morphology and histogenesis. Onkoginekologiya = Oncogynecology 2017;3(23):26–32. (In Russ.).
7. Labidi-Galy S.I., Papp E., Hallberg D. et al. High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. Nat Commun 2017;8(1):1093. DOI: 10.1038/s41467-017-00962-1
8. Ducie J., Dao F., Considine M. et al. Molecular analysis of high-grade serous ovarian carcinoma with and without associated serous tubal intra-epithelial carcinoma. Nat Commun 2017;8(1):990. DOI: 10.1038/s41467-017-01217-9
9. Wu R.C., Wang P., Lin S.-F. et al. Genomic landscape and evolutionary trajectories of ovarian cancer precursor lesions. J Pathol 2019;248(1):41–50. DOI: 10.1002/path.5219
10. Zhang S., Dolgalev I., Zhang T. et al. Both fallopian tube and ovarian surface epithelium are cells-of-origin for high-grade serous ovarian carcinoma. Nat Commun 2019;10(1):5367. DOI: 10.1038/s41467-019-13116-2
11. Lawrenson K., Fonseca M.A.S., Liu A.Y. et al. A study of high-grade serous ovarian cancer origins implicates the SOX18 transcription factor in tumor development. Cell Rep 2019;29(11):3726–35. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.10.122
12. Habyan S.A., Kalos C., Szymborski J. et al. Multicellular detachment generates metastatic spheroids during intra-abdominal dissemination in epithelial ovarian cancer. Oncogene 2018;37(37):5127–35. DOI: 10.1038/s41388-018-0317-x
13. Tan D.S., Agarwal R., Kaye S.B. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. Lancet Oncol 2006;7(11):925–34. DOI: 10.1016/S1470-2045(06)70939-1
14. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. Am J Pathol 2010;177(3):1053–64. DOI: 10.2353/ajpath.2010.100105
15. Kielbik M., Szulc-Kielbik I., Klink M. E-cadherin expression in relation to clinicopathological parameters and survival of patients with epithelial ovarian cancer. Int J Mol Sci 2022;23(22):14383. DOI: 10.3390/ijms232214383
16. Hollis R.L. Molecular characteristics and clinical behaviour of epithelial ovarian cancers. Cancer Lett 2023;555:216057. DOI: 10.1016/j.canlet.2023.216057
17. Ayollo D.V., Zhitnyak I.Y., Vasiliev J.M. et al. Rearrangements of the actin cytoskeleton and E-cadherin-based adherens junctions caused by neoplasic transformation change cell-cell interactions. PLoS One 2009;4(11):e8027. DOI: 10.1371/journal.pone.0008027
18. Ilnitskaya A.S., Litovka N.I., Rubtsova S.N. et al. Actin cytoskeleton remodeling accompanied by redistribution of adhesion proteins drives migration of cells in different EMT states. Cells 2024;13(9):780. DOI: 10.3390/cells13090780.
19. Jolly M.K., Boareto M., Huang B. et al. Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis. Front Oncol 2015;20(5):155. DOI: 10.3389/fonc.2015.00155
20. Zhitnyak I.Y., Rubtsova S.N., Litovka N.I. et al. Early events in actin cytoskeleton dynamics and E-cadherin-mediated cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition. Cells 2020;9(3):578. DOI: 10.3390/cells9030578
21. Padmanaban V., Krol I., Suhail Y. et al. E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer. Nature 2019;573(7774):439–44. DOI: 10.1038/s41586-019-1526-3
22. Gagnoux-Palacios L., Awina H., Audebert S. et al. Cell polarity and adherens junction formation inhibit epithelial FasCell death receptor signaling. J Cell Biol 2018;17(11):3839–52. DOI: 10.1083/jcb.201805071
23. Qiang L., Shah P., Barcellos-Hoff M.H. et al. TGF-β signaling links E-cadherin loss to suppression of nucleo tide excision repair. Oncogene 2016;35(25):3293–302. DOI: 10.1038/onc.2015.390
24. Hu Q.P., Kuang J.Y., Yang Q.K. et al. Beyond a tumor suppressor: soluble E-cadherin promotes the progression of cancer. Int J Cancer 2016;138(12):2804–12. DOI: 10.1002/ijc.29982
25. Gao X., Xia X., Li F. et al. Circular RNA-encoded oncogenic E-cadherin variant promotes glioblastoma tumorigenicity through activation of EGFR–STAT3 signalling. Nat Cell Biol 2021;23(3):278–91. DOI: 10.1038/ s41556-021-00639-4
26. Guo M., Wong I.Y., Lippincott-Schwartz J. et al. Vimentin intermediate filaments as structural and mechanical coordinators of mesenchymal cells. Nature Cell Biology 2025; 27(8):1210–8. DOI: 10.1038/s41556-025-01713-x
27. Grasset E.M., Dunworth M., Sharma G. et al. Triple negative breast cancer metastasis involves complex EMT dynamics and requires vimentin. Sci Transl Med 2022;14(656):eabn7571. DOI: 10.1126/scitranslmed.abn7571
28. Berr A.L., Wiese K., Santos G.D. et al. Vimentin is required for tumor progression and metastasis in a mouse model of non-small cell lung cancer. Oncogene 2023;42(25):2074–87. DOI: 10.1038/s41388-023-02703-9

Вклад авторов

М.М. Воронова, А.С. Ильницкая, А.О. Жолудева: проведение экспериментов, анализ данных;
С.Н. Рубцова: анализ данных, редактирование;
К.И. Жордания: получение клинических образцов, анализ данных;
А.Ю. Александрова: разработка дизайна исследования, анализ данных;
Н.А. Глушанкова: разработка дизайна исследования, руководство проектом, написание текста статьи.
М.М. Воронова и А.С. Ильницкая внесли равный вклад в написание статьи.

Authors' contributions

M.M. Voronova, A.S. Ilnitskaya, A.O. Zholudeva: conducting experiments, data analysis;
S.N. Rubtsova: data analysis, editing;
K.I. Zhordania: obtaining of clinical samples, data analysis;
A.Yu. Alexandrova: research design development, data analysis;
N.A. Gloushankova: research design development, project management, article writing.
M.M. Voronova and A.S. Ilnitskaya made an equal contribution to the writing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.М. Воронова / M.M. Voronova: https://orcid.org/0009-0001-7806-6734
А.С. Ильницкая / A.S. Ilnitskaya: https://orcid.org/0000-0001-8925-440X
А.О. Жолудева / A.O. Zholudeva: https://orcid.org/0000-0001-9659-770X
С.Н. Рубцова / S.N. Rubtsova: https://orcid.org/0000-0003-4620-7851
К.И. Жордания / K.I. Zhordania: https://orcid.org/0000-0003-1380-3710
А.Ю. Александрова / A.Yu. Alexandrova: https://orcid.org/0000-0001-5071-2290
Н.А. Глушанкова / N.A. Gloushankova: https://orcid.org/0000-0002-2044-2063

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

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00347-П).
Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 22-15-00347-П).

Соблюдение правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии 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: 10.11.2025. **Принята к публикации:** 30.11.2025. **Опубликована онлайн:** 10.12.2025.
Article submitted: 10.11.2025. **Accepted for publication:** 30.11.2025. **Published online:** 10.12.2025.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-91-99

P-glycoprotein activation as a mechanism of drug resistance to carfilzomib in multiple myeloma cells

A.I. Cherkasova, L.A. Laletina, K.V. Kalabina, E.A. Scherbakova, N.I. Moiseeva

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

Contacts: Natalia Ivanovna Moiseeva *n.i.moiseeva@gmail.com*

Introduction. Carfilzomib (CFZ) is a second-generation proteasome inhibitor and serves as a constant component of multiple myeloma recurrence therapy. However, the mechanisms of development of resistance to CFZ have not been sufficiently studied.
Aim. To investigate the mechanisms of development of CFZ resistance in multiple myeloma cells.
Materials and methods. The study was performed in 2 multiple myeloma cell lines: AMO-1 and its CFZ-resistant subline AMO-1/CFZ. Cytotoxicity of the compounds was evaluated using the MTT assay, gene expression levels using real-time polymerase chain reaction. To evaluate protein expression, flow cytometry and western blot were used. Protein location was determined using immunocytochemistry, interaction with P-glycoprotein (P-gp) was evaluated using rhodamine accumulation assay.
Results. We have obtained a cell subline AMO-1/CFZ which was 46-fold more resistant to CFZ than initial cell line AMO-1. Genes of proteasome subunits did not change significantly compared to AMO-1. We have determined that CFZ is a substrate for P-gp and promotes its expression at the levels of messenger RNA and protein. Concurrent treatment of AMO-1/CFZ cells with nontoxic concentrations of P-gp inhibitor elacridar and CFZ led to complete restoration of sensitivity to this proteasome inhibitor. Activity of YB-1 protein, one of the possible transcription factors of P-gp, did not change in the resistant subline AMO-1/CFZ.
Conclusion. Therefore, P-gp hyperexpression mediates CFZ resistance in AMO-1/CFZ cells. However, molecular mechanisms leading to P-gp hyperexpression remain unknown.

Keywords: multiple myeloma, carfilzomib, P-glycoprotein, proteasome inhibitors, proteasome β-subunit genes, YB-1 protein, elacridar

For citation: Cherkasova A.I., Laletina L.A., Kalabina K.V. et al. P-glycoprotein activation as a mechanism of drug resistance to carfilzomib in multiple myeloma cells. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(4):91–9.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-91-99

Активация Р-гликопротеина как механизм лекарственной устойчивости к карфилзомибу клеток множественной миеломы

А.И. Черкасова, Л.А. Лалетина, К.В. Калабина, Е.А. Щербакова, Н.И. Моисеева

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

Контакты: Наталья Ивановна Моисеева *n.i.moiseeva@gmail.com*

Введение. Карфилзомиб (CFZ) – ингибитор протеасом II поколения – является постоянным компонентом терапии рецидивов множественной миеломы, однако механизмы возникновения резистентности к нему мало изучены.
Цель исследования – изучение механизмов формирования лекарственной устойчивости к CFZ в клетках множественной миеломы.
Материалы и методы. Исследование проводили на двух клеточных линиях множественной миеломы: AMO-1 и ее резистентной к CFZ сублинии AMO-1/CFZ. Цитотоксичность соединений определяли с помощью МТТ-теста, уровень экспрессии генов – с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для оценки экспрессии белков применяли проточную цитометрию и вестерн-блоттинг. Локализацию белков определяли с помощью иммуноцитохимического метода, взаимодействие соединений с Р-гликопротеином (P-gp) оценивали в ходе опытов по выбросу родамина.

Результаты. Мы получили сублинию клеток AMO-1/CFZ, которая была в 46 раз устойчивее исходных клеток AMO-1 к CFZ. Гены субъединиц протеасом в AMO-1/CFZ изменялись мало по сравнению с AMO-1. Мы определили, что CFZ является субстратом P-gp и способствует повышению его экспрессии на уровне как матричной РНК, так и белка. Совместное воздействие на клетки AMO-1/CFZ нетоксичных концентраций ингибитора P-gp элакридара и CFZ привело к полному восстановлению чувствительности клеток к этому ингибитору протеасом. Активность белка YB-1 – одного из возможных транскрипционных факторов P-gp – не менялась в устойчивой сублинии AMO-1/CFZ.
Заключение. Таким образом, за устойчивость к CFZ в клетках AMO-1/CFZ отвечает гиперэкспрессия P-gp. Однако остается открытым вопрос о молекулярных механизмах, приводящих к гиперэкспрессии P-gp.

Ключевые слова: множественная миелома, карфилзомиб, P-гликопротеин, ингибиторы протеасом, гены β-субъединиц протеасом, белок YB-1, элакридар

Для цитирования: Черкасова А.И., Лалетина Л.А., Калабина К.В. и др. Активация P-гликопротеина как механизм лекарственной устойчивости к карфилзомибу клеток множественной миеломы. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(4):91–9. (На англ.).
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-91-99

INTRODUCTION

Proteasome inhibitors (PIs) are effective in the treatment of hematological malignancies, particularly multiple myeloma (MM), as MM cells produce a large amount of paraprotein. The optimal functioning of the proteasome complex is critically important in these cells [1].

The first PI, bortezomib was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 2003. Since then, it has become a cornerstone of therapy not only for patients with relapsed or refractory myeloma but also for those with newly diagnosed MM. Subsequently, the second-generation proteasome inhibitors carfilzomib (CFZ) and ixazomib were approved. All of them have been incorporated into several treatment regimens in combination with other cytotoxic agents, such as alkylating agents, immunomodulatory drugs, and monoclonal antibodies [2]. Although PIs of both the first and second generations can significantly improve the condition of patients with myeloma, resistance to these drugs ultimately develops [3].

Acquired resistance develops gradually as a result of sequential genetic and epigenetic changes, which ultimately confer a complex drug-resistant phenotype to tumor cells [4]. Resistance to PIs can develop through specific pathways, such as mutations in the genes encoding proteasome subunits, increased expression of these subunits, and the assembly of alternative proteasomal complexes [5]. Non-specific pathways include enhanced resistance to apoptosis, impaired DNA repair, increased drug inactivation, enhanced drug efflux from cells and other.

Elevated expression and mutations of the *PSMB5* gene, which encodes the catalytic β5 subunit of the proteasome, can be the mechanism of PI resistance development in MM cells, although there is a lack of significant clinical evidence to support this hypothesis [5]. Interest in immunoproteasomes (i-subunits), which are encoded by the *PSMB8* (β5i), *PSMB9* (β1i) and *PSMB10* (β2i) genes, has increased significantly in recent years [6]. Levels of β5i were higher in the proteasomes of HLA-sensitised MM patients on dialysis [7], and even higher in patients in remission after CFZ therapy [8]. However, different studies have found either decreased and increased expression of 19S particles or some of their subunits in PI-resistant cells [5]. In general, there are few works devoted to the study of immunoproteasomes in CFZ-resistant MM cells.

One of the non-specific pathways associated with the development of resistance to PIs is the activation of drug release from the cells. Resistance often develops simultaneously to multiple drugs that differ in their chemical structure and mechanism of action on the cell. This phenomenon is known as multidrug resistance (MDR) [9, 10]. P-glycoprotein (P-gp, ABCB1) is one of the key proteins responsible for the development of MDR in tumor cells. It belongs to the ABC-transporter family and is encoded by the *ABCB1* gene (*MDR1*). Several studies have described the functional role of P-gp in CFZ resistance. For instance, increased expression of *ABCB1* has been observed in cells derived from patients with plasma cell leukaemia, which is the most aggressive stage of MM, compared to untreated patients' bone marrow plasma cells [11]. The CFZ-resistant AMO-1 cell line with *ABCB1* knockout exhibited greater sensitivity to CFZ and other P-gp substrates than *ABCB1*-positive cells of this line [12]. Based on these findings, we believe that a detailed study of the role of P-gp in the development of CFZ resistance in MM is promising. However, the functional activity of the P-gp protein in MM cells has received little attention. To date, only one paper by Besse et al. has demonstrated a decrease in P-gp substrate release of Mitotracker Green FM under the influence of its potential inhibitors nelfinavir and lopinavir [11].

A search for regulators of P-gp expression in MM cells is also needed. One such regulator may be the YB-1 protein. The multifunctional DNA/RNA-binding protein YB-1 has been shown to act as a transcription factor for P-gp when translocated from the cytoplasm to the nucleus [13]. YB-1 represents a promising target for MM treatment, as it has been demonstrated to regulate the expression of genes that are important for MM progression, including MYC and MMSET [14].

Thus, studying the mechanisms of resistance to PIs in MM cells is essential for the further productive use of this class of drugs and will help in identifying new biomarkers of drug resistance in the future.

Aim of the study to investigate the mechanisms of drug resistance to CFZ in MM cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. The study utilized MM AMO-1 cells (Leibniz Institute DSMZ) (https://webshop.dsmz.de/en/human-animal-cell-lines/AMO-1.html) and K562/iS-9_Dox cells with functionally active P-gp [15]. Cells were cultured in RPMI1640 medium (PanEco, Russia) supplemented with 20 % fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA) for AMO-1 cells and their subline, and 10 % FBS for K562/iS-9_Dox cells. The medium also contained a combination of antibiotics: 5000 µg/mL streptomycin and 5000 U/mL penicillin (PanEco, Russia). Cultures maintained in an incubator at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO_2.

MTT assay. Cells were seeded in 96-well plates at a density of 25,000 cells per well in 135 µL of culture medium. CFZ (Sionc Phar., India) was added to each well in various concentrations, with 15 µL of the drug solution. To the control wells, 15 µL of serum-free medium (SFM) was added. The cells were incubated with the drug for 72 hours. The method is described in detail in our previous publication [16].

The experiment with combined treatment using CFZ and the P-gp inhibitor elacridar (ELA, Cayman Chemical, USA) was performed as follows: AMO-1 and AMO-1/CFZ cells were seeded at a density of 35,000 cells per well in 120 µL of medium for 24 hours. On the same day, CFZ (15 µL) at various concentrations was added to one group of cells along with 15 µL of SFM, while to another group, CFZ (15 µL) was combined with ELA (15 µL). Two additional controls were also set up: untreated cells (120 µL of cell suspension + 30 µL of SFM) and cells treated with ELA (15,3 µM for AMO-1 cells and 12 µM for AMO-1/CFZ cells) + 15 µL of SFM. The results evaluated as described for the standard MTT assay.

Real-time polymerase chain reaction. Total RNA extracted from cells using PureZOL reagent (Bio-Rad, USA) according to the manufacturer's protocol. A detailed description of the methodology can be found in a previously published work [17]. Data normalization performed using the housekeeping gene *RPLP0*, with the primer sequences provided in table 1.

Flow cytometry. Protein expression assessed using direct immunofluorescence with monoclonal antibodies FITC-P-glycoprotein (Cat. #557002, BD Pharmingen, USA). Non-fixed cell suspensions (500,000 cells per sample) incubated in 100 µL of PBS (phosphate-buffered saline) with antibodies at the manufacturer-recommended ratio for 40 minutes in the dark at room temperature. The cells washed twice with PBS. Fluorescence analyzed on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, USA) with DiVa software.

Assessment of P-glycoprotein functional activity. K562/i-S9 cells were incubated for 20 minutes in culture medium containing 2.0 µg/mL rhodamine 123 (Rh123; Sigma-Aldrich, USA). In the absence of P-gp expression, Rh123 remains in the cells for three or more hours. If P-gp is overexpressed and functional, it effluxes Rh123 within 20–40 minutes. When a compound that is a substrate or inhibitor of P-gp is added, the release of Rh123 is slowed down or completely inhibited. Conversely, if the compound does not interact with P-gp, Rh123 is released from the cells within 20–40 minutes. A detailed description of the method can be found in our previous publication, with the only modification being the use of ELA instead of verapamil [15].

Western blot. Cells were suspended in 150 µL of RIPA lysis buffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % NP-40, 0.5 % Sodium Deoxycholate, 0.1 % SDS, 25 mM Tris-HCl, PhosSTOP protease inhibitors) and incubated on ice for 30 minutes. The lysate centrifuged at 14,000 rpm for 15 min, and the protein-containing supernatant transferred to a new tube. Protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Millipore, USA). The cells were then suspended in 4× Laemmli buffer

Table 1. *Primer sequences for gene expression analysis in real-time polymerase chain reaction*

Gene	Forward primer	Reverse primer
PSMB1/β1	CAATCCTGTATTCAAGGCGCTTC	TCTCTCTGGTAAGACCCTACTGG
PSMB2/β2	ACTACACACCGACTATCTCACG	GATTCGAACACTGAAGGTTGGC
PSMB5/β5	AGTCTCAGTGATGGTCTGAGC	CAATGTAAGCACCCGCTGTAG
PSMB8/β5i	GTGATTGCAGCAGTGGATTCTC	ATGGTGCCAAGCAGGTAAGG
PSMB9/β1i	CTGGGACCAACGTGAAGGAG	CCAATGGCAAAAGGCTGTCG
PSMB10/β2i	GGGCTTCTCCTTCGAGAACTG	AGAATGACCCCGTCTTGGAAC
ABCB1	GGGATGGTCAGTGTTGATGGA	GCTATCGTGGTGGCAAACAATA
RPLP0	CCTTCTCCTTTGGGCTGGTCATCCA	CAGACACTGGCAACATTGCGGACAC

(50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM β-mercaptoethanol, 1 % SDS, 10 % glycerol, 0.005 % bromophenol blue) and heated at 95 °C for 5 minutes.

Proteins (30 µg per well) were separated on 10 % SDS-PAGE gels and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham, USA). The membrane was incubated with 5 % BSA in TBST (Tris-Buffered Saline with Tween; 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0.1 % Tween-20, pH 7.6) with continuous shaking for 60 minutes. The membrane was then incubated overnight at 4 °C with specific antibodies against P-gp (1:500, Cat. No. 26528, Invitrogen, USA), actin-specific antibodies directly conjugated with peroxidase (1:1000, Cat. No. 47778, Santa Cruz, USA).

Subsequently, the membrane washed three times in TBST for 15 minutes each. YB-1 (1:1000, Cat. No. A15696, Abclonal, Germany) and p-YB-1 (Ser102) antibodies (1:1000, Cat. No. 2900S, Cell Signaling, USA) were used in the assessment of YB-1 and p-YB-1 expression. The membranes were then incubated with secondary antibodies conjugated with peroxidase (1:4000) for 1 hour. Anti-mouse antibodies (Cat. No. 7076, Cell Signaling, USA) for P-gp and anti-rabbit YB-1 and p-YB-1 (Cat. No. 7074, Cell Signaling) were used. Incubation followed by three washes in TBST. The proteins were detected using ECL reagent (Thermo Fisher, USA), and imaging performed using the ImageQuant Las4000 luminometer (USA).

Immunocytochemystry. Immunocytochemical staining of AMO-1 and AMO-1/CFZ cells was performed according to the manufacturer's protocol using YB-1/YBX1 rabbit pAb primary antibodies (Cat. A-15696, ABclonal, Germany) (https://abclonalbio.com/Uploads/protocol/IF_protocol.pdf). From each culture, 2×10^6 cells were incubated with YB-1/YBX1 primary antibodies (1:100) overnight at 4 °C. After washing, goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor® 488 secondary antibodies (1:200, Cat. No. A-11070, Invitrogen, USA) were added, Hoechst 33342 (1.25:1000, Sigma-Ald., USA) was added to visualize the nuclei, phalloidin (1:400, Sigma-Aldrich, USA) was used to visualize the cytoplasm and incubated for 75 minutes. After three washes with 0.1 % Tween 20 in PBS, 5 µL of cells were mixed with 5 µL of elvanol, covered with a coverslip and incubated for 2 hours in a thermostat. The distribution of YB-1 protein in the cells was evaluated using a fluorescence microscope (Axioplan, ZEISS, Germany), Olympus DP70 camera at 50x magnification.

Statistical analysis. Experiments performed 4–5 times to quintuplicate for MTT and real-time polymerase chain reaction and 2–3 times for Western blot and Rh123 assay, and the data are presented as mean ± standard deviation (M ± SD). Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 9.0 software. Kolmogorov–Smirnov test of normality was used and then Student's *t*-test was applied. Differences considered statistically significant at a *p*-value <0.05.

RESULTS

Evaluation of resistance to proteasome inhibitors in multiple myeloma subline. At the initial stage of the study, we developed a model to investigate the mechanisms of resistance acquisition to CFZ. To induce resistance, AMO-1 cells cultured in the presence of CFZ, with the drug concentration gradually increased as the cells adapted to the current dose. The initial concentration corresponded to an 30 % inhibitory concentration (IC_{30}) value of 2 nM: the concentration resulting in 70 % cell viability compared to the initial seeding density (hemocytometer count). The concentration increment was approximately 1–2 nM during the early stages and 10 nM in the later stages of selection. As a result of this approach, the resistant subline, AMO-1/CFZ, was generated. This subline demonstrated a 46-fold higher resistance to CFZ compared to the sensitive AMO-1 cells (fig. 1), with half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of 249.2 ± 24.5 and 5.4 ± 1.1 nM, respectively (p <0.0001). AMO-1/CFZ showed no cross-resistance to PI ixazomib (17.0 ± 2.5 *vs* 32.3 ± 9.1; p = 0.2), but displayed a 2.3-fold resistance to the PI bortezomib (2.7 ± 0.7 nM *vs* 5.0 ± 0.2 nM; p = 0.002) and an 8.8-fold resistance to doxorubicin (0.16 ± 0.02 µM *vs* 1.4 ± 0.3 µM; p = 0.04), a classic P-gp substrate.

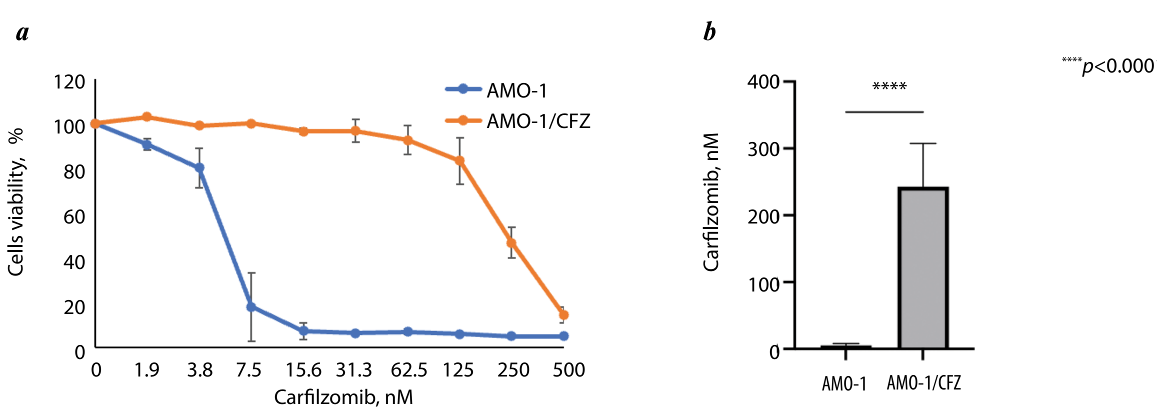
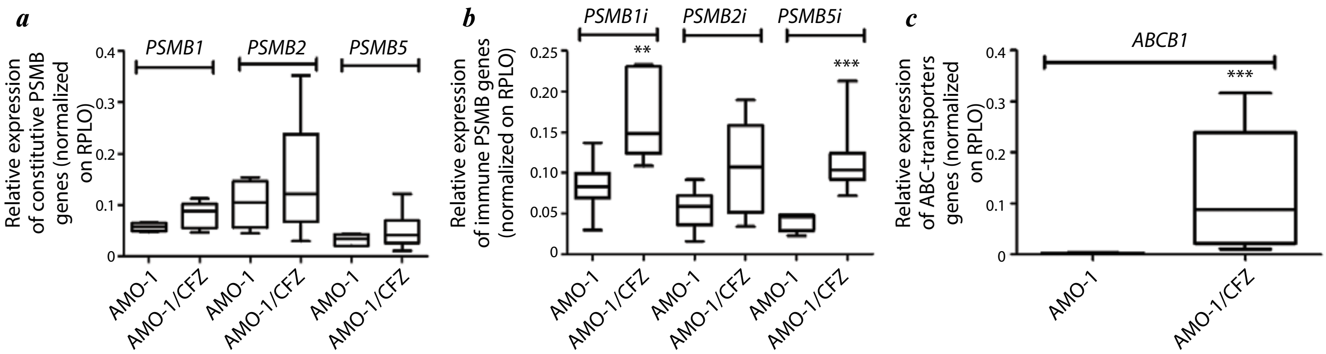


Fig. 1. *Cytotoxic effect of carfilzomib on AMO-1 and AMO-1/CFZ, 72 hours of incubation: a – cells survival curves under the influence of carfilzomib (MTT test); b – statistical significance of the obtained results (t-test)*



$^{**}p$ <0.01. $^{***}p$ <0.001

Fig. 2. *Expression of mRNA genes in the sensitive AMO-1 and the resistant AMO-1/CFZ subline (a) genes PSMB1, PSMB2, PSMB5, encoding catalytic subunits of constitutive proteasomes (b) genes PSMB1i, PSMB2i, PSMB5i, encoding immunoproteasomes and (c) ABCB1 gene, encoding P-gp (real-time polymerase chain reaction, relative expression* $2^{\Delta Ct}$*), housekeeping gene RPLP0)*

Gene expression changes associated with carfilzomib resistance. Numerous studies have linked resistance acquisition to alterations in the expression of PSMB family genes, which encode the catalytic β-subunits of proteasomes. In the next phase of our study, we evaluated the changes in *PSMB* gene expression at the messenger RNA (mRNA). level. Our experiments revealed increased expression of i-subunits genes, including a 2.0-fold increase for *PSMB1i* ($p = 0.002$) and a 2.8-fold increase for *PSMB5i* ($p = 0.0007$), and no changes of constitutive proteasomes genes expression and *PSMB2i* gene expression (fig. 2, *a*, *b*).

Thus, only minor changes in the expression of immunoproteasome subunit genes were observed. Therefore, we further assessed the expression of ABC-transporter gene – *ABCB1*, encoding P-gp (fig. 2, *c*). Our analysis showed 67-fold pronounced increase of *ABCB1* expression in AMO-1/CFZ cells ($p = 0.0003$).

Assessment of P-glycoprotein expression in AMO-1 and AMO-1/CFZ cells. Next, we analyzed P-gp expression at the protein level. In contrast to parental AMO-1 cells, where P-gp was undetectable by Western blot and only 1.6 % of cells were positive by flow cytometry (fig. 3 *a*, *b*), the resistant AMO-1/CFZ subline showed significant P-gp expression. Western blot analysis confirmed this finding (see fig. 3, *a*), and approximately 53 % of the resistant cells exhibited surface P-gp expression (see fig. 3, *c*).

Assessment of carfilzomib binding to P-glycoprotein using a functional Rhodamine 123 efflux assay. To confirm the interaction between P-gp and CFZ, we assessed the binding of CFZ to the protein using the well-established Rhodamine 123 (Rh123) efflux assay. We employed the K562/i-S9_Dox cell line because it exhibits stable, high-level P-gp expression due to a lentiviral construct. This is in contrast to the AMO-1/CFZ cells, where P-gp levels decrease over time. The K562/i-S9_Dox model is a versatile tool that provides a clear and consistent system for demonstrating qualitative interactions between P-gp and various compounds. The incubation of K562/i-S9_Dox cells in medium with Rh123 (95.9 % of cells stained with Rh123) for a period of 40 minutes, followed by incubation in pure medium, resulted in the release of the majority of Rh123 (17.6 % of cells remained stained) from the cells by the P-gp protein. The incubation of cells with elacridar (ELA) resulted in the inhibition of P-gp activity (fig. 4), which in turn led to a reduction in Rh123 efflux from cells (95.1 % of cells remained stained). Incubation of cells in the medium with CFZ (see fig. 4, *a*) resulted in a decrease in the release of Rh123 (44.2 % of cells were stained), since this PI competed with Rh123 for binding to P-gp. Based on this, we can conclude that CFZ is a moderate-strength substrate of P-gp. Fig. 4, *b* also demonstrates the outcome of the experiment with another

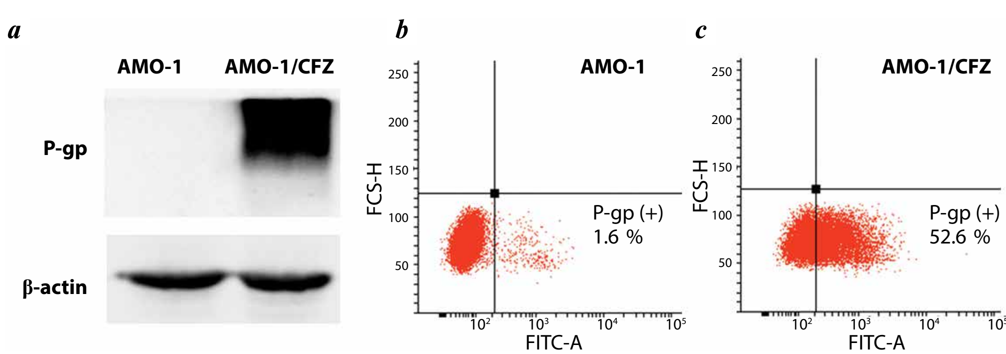


Fig. 3. *P-glycoprotein (P-gp) expression in AMO-1 and AMO-1/CFZ cells determined by Western blot, β-actin was used as a loading control (a); P-gp expression in AMO-1 (b) and AMO-1/CFZ cells (c) determined by flow cytometry. FCS-H – forward scatter height*

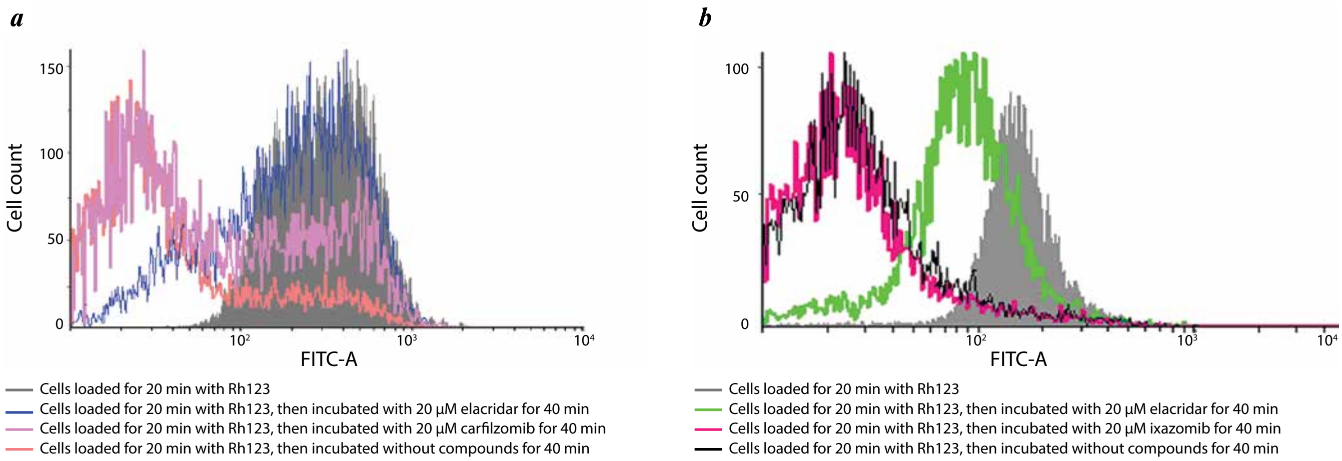


Fig. 4. *Evaluation of carfilzomib (a) and ixazomib (b) effect on the release of Rh123 (fluorescent compound, P-glycoprotein substrate) in P-glycoprotein overexpressing K562/i-S9_Dox cells (flow cytometry). Following a 20-minute incubation period with Rh123, the cells were further incubated for 40 minutes in either fresh medium, or medium containing elacridar, or carfilzomib, or ixazomib*

PI, ixazomib, which is not a substrate of P-gp (11.1 % of stained cells).

Evaluation of the effect of elacridar, a P-glycoprotein inhibitor, on the sensitivity of cells to carfilzomib. At the next stage of our work, we compared the sensitivity of cells to which only CFZ was added and cells that were incubated both ELA and CFZ using MTT assay (fig. 5). It was determined that CFZ exhibited 39 times greater cytotoxicity towards AMO-1/CFZ cells in the presence of ELA (IC_{50} = 2868.1 ± 177.7 nM *versus* IC_{50} = 73.4 ± 12.1 nM). ELA almost does not affect the sensitivity of AMO-1 cells, since they do not express P-gp (IC_{50} = 91.4 ± 29.9 nM when exposed to CFZ and IC_{50} = 77.4 ± 26.6 nM when exposed to CFZ and ELA). The statistical significance of the IC_{50} values for CFZ, when added to AMO-1 or AMO-1/CFZ cells, individually or in combination with ELA, is illustrated in fig. 5, *b*.

Determination of YB-1 protein expression and localization in sensitive and resistant cell lines. In order to determine the expression levels of one of the putative transcription factors for *ABCB1* gene, YB-1 protein, and its phosphorylated form (p-YB-1) (Ser102) Western blot was carried out (fig. 6, *a*). It was determined that their expression did not differ between the sensitive and resistant sublines (see fig. 6, *b*).

To determine the distribution between cytoplasm and nucleus of YB-1 protein in AMO-1 cells and in AMO-1/CFZ subline, an immunocytochemical study was performed (fig. 7). Based on the obtained data, in 34 % of AMO-1 cells the localization of YB-1 protein is predominantly nuclear, in 39.5 % – diffuse, i. e. YB-1 protein is distributed throughout the cell, in 16 % – cytoplasmic and in 10.5 % of cells the level of YB-1 expression is minimal. In the case of AMO-1/CFZ subline, in 40 % of cells the localization of YB-1 is predominantly nuclear, in 32 % it is diffuse, in 8 % it is cytoplasmic and in 20 % of cells the level of YB-1 expression is minimal. Thus, no significant changes in protein localization were observed.

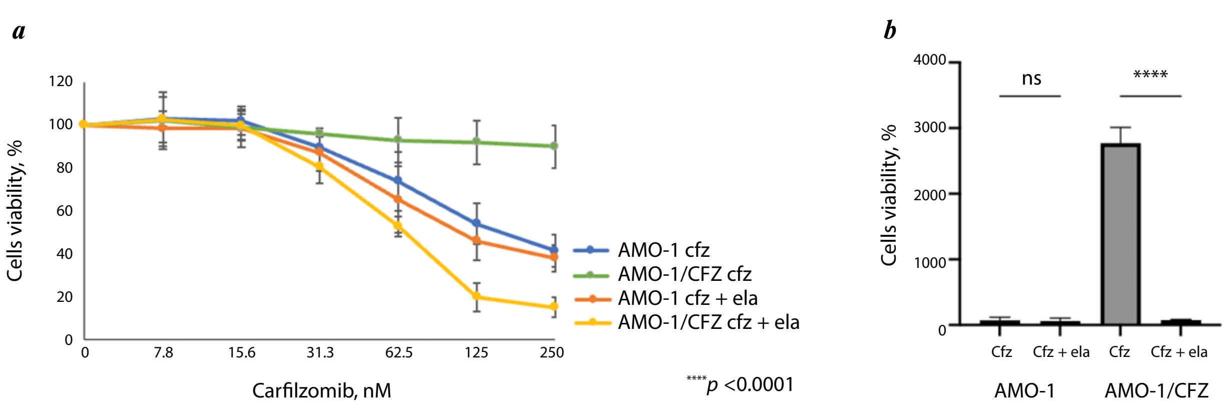


Fig. 5. *Cytotoxic effect of carfilzomib (cfz) combined with P-glycoprotein inhibitor elacridar (ela) on AMO-1 and AMO-1/CFZ cells; ela was added at a concentration of 3 μM for AMO-1 cells and 12 μM for AMO-1/CFZ cells, incubated for 24 hours: a – cell survival curves (MTT assay); b – statistical significance of the obtained results (t-test). ns – no significant*

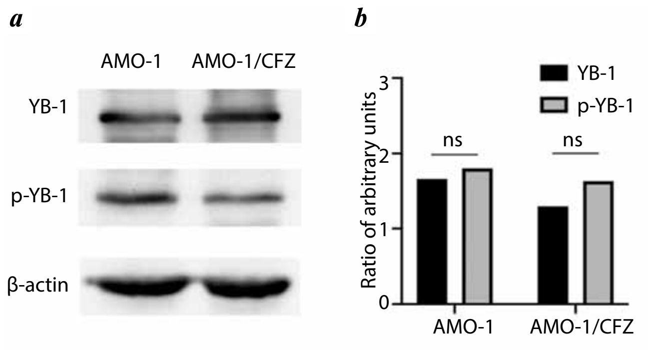


Fig. 6. *YB-1 and p-YB-1 expression levels in AMO-1 and AMO-1/CFZ cells, β-actin was used as a loading control (Western blot) (a). Densitometry was performed based on the Western blot results. Statistical significance of the obtained results (t-test) (b). ns – no significant*

DISCUSSION

To understand how MM cells acquire resistance to CFZ, we developed the AMO-1/CFZ subline, which is 46 times more resistant to CFZ than its parental counterpart, AMO-1 (see fig. 1), and comparative analysis conducted on this pair. In the first stage, we determined that AMO-1/CFZ subline does not exhibit cross-resistance to ixazomib but shows low resistance to bortezomib. First, we investigated *PSMB* genes expression, because aberrant expression of *PSMB* genes considered a critical adaptation of tumors to the action of PIs. AMO-1/CFZ cells demonstrated increased expression of all immunoproteasome subunits genes *PSMB1i* and *PSMB5i* (see fig. 2, *b*). E. Woodle et al. [8] have also reported elevated immunoproteasome expression under the influence of CFZ. M.J. Lee et al. elucidated the molecular mechanisms underlying intrinsic resistance to CFZ in human bronchial carcinoid H727 cells, which retained sensitivity to other PIs, notably bortezomib [18]. In this study, the authors suggest a potential link between the composition of proteasomal catalytic subunits and cellular response to CFZ. H727 cells exhibited a mixed proteasome expression profile, comprising both constitutive and immunoproteasome subunits. We observed an increase in the expression of 2 out of 6 proteasome genes, which may indirectly indicate the presence of mixed proteasomes, and this heterogeneity could contribute to the cells' differential sensitivity to CFZ. However, the extent of upregulation in *PSMB* gene expression did not fully account for the resistance acquisition observed in AMO-1/CFZ cells.

Since AMO-1/CFZ cells showed cross-resistance to doxorubicin, a drug known as a P-gp substrate, we analyzed its amount. We demonstrated that AMO-1/CFZ cells exhibit higher P-gp expression level at both mRNA and protein levels (see fig. 2, *c*, 3), and CFZ acts as a moderate-strength substrate for P-gp (see fig. 4). We propose that increased P-gp expression level serves as the key mechanism underlying CFZ resistance acquisition in AMO-1/CFZ cells. This assumption supported by experiments involving the combined treatment with CFZ and ELA, a P-gp inhibitor. At non-toxic concentrations, ELA enhanced the efficacy of CFZ in AMO-1/CFZ cells by 39-fold, effectively restoring their sensitivity to PIs to a level that was just above that of the original AMO-1 cell line (see fig. 5).

However, existing studies show contradictory results regarding P-gp expression changes following PI treatment. For instance, in the study by R.L. Mynott and C.T. Wallington-Beddoe, which examined eight human MM cell lines, including RPMI-8226 cells resistant to bortezomib and CFZ, P-gp not detected either on the cell surface or in whole-cell lysates. P-gp accumulation

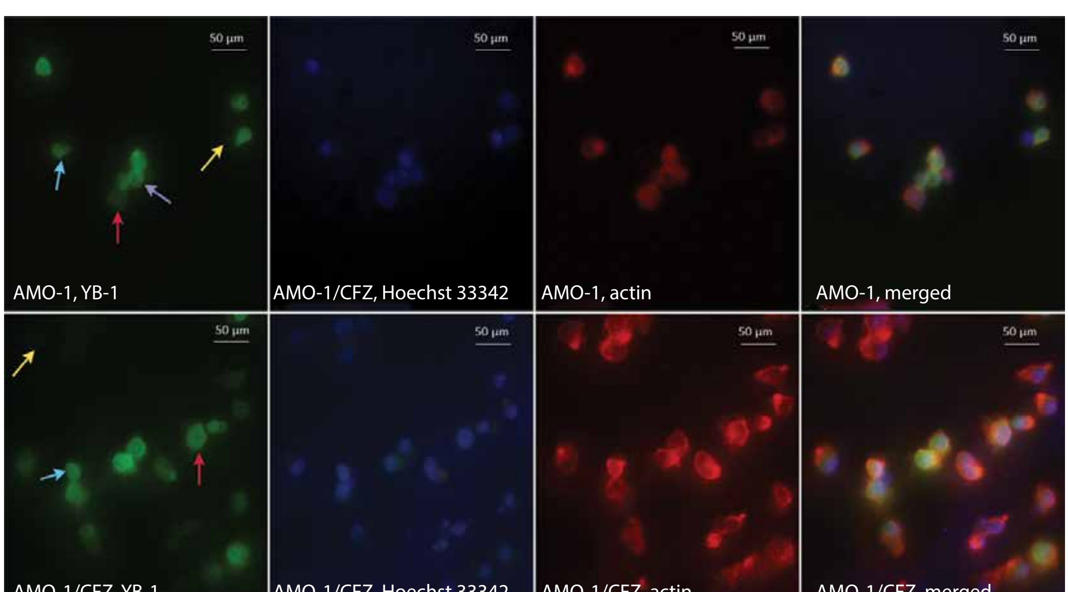


Fig. 7. *Immunocytochemical staining of AMO-1 and AMO-1/CFZ cells with rabbit antibodies to YB-1 (YB-1), with Hoechst 33342 (nucleus), and phalloidin (actin in cytoplasm). Localization of YB-1: nuclear (blue arrow), diffuse (red arrow), cytoplasmic (purple arrow), protein not visualized in cells (yellow arrow)*

observed in only one of the tested cell lines, KMS-18, but it confined to the intracellular compartment and not expressed on the membrane. Furthermore, the researchers observed that P-gp blockade using tariquidar (a third-generation inhibitor) failed to enhance KMS-18 cell sensitivity to CFZ [19].

In our study, in contrast, we detected the presence of P-gp not only in cell lysates but also on the surface of the AMO-1/CFZ subline in response to CFZ exposure. Additionally, we noted sensitization of AMO-1/CFZ cells to CFZ when treated concurrently with CFZ and non-toxic doses of ELA. The ability of P-gp inhibitors (such as ELA and tariquidar) to increase CFZ cytotoxicity appears dependent on cell surface P-gp expression, as demonstrated in our model system. Our findings largely supported by other researchers who have also used AMO-1 cells as a model system [12, 13]. Additionally, a study by K. Takahashi et al. on acute lymphoblastic leukemia cells demonstrated that the sensitivity of a P-gp-positive cell line to CFZ increased after knocking out P-gp in these cells using genome editing with the CRISPR/Cas9 system [20]. However, our findings combined with existing literature demonstrate that P-gp overexpression in response to CFZ is not universal across MM cell lines, suggesting the involvement of additional molecular determinants for its activation.

Therefore, we propose, that transcription factor YB-1 may create a favorable environment for the activation of P-gp in AMO-1 upon prolonged CFZ exposure. In our study, we examined the distribution and expression levels of the YB-1 protein in AMO-1 and AMO-1/CFZ cells. While YB-1 showed high expression levels in both parental cells and the resistant subline, no quantitative differences were observed between total and phosphorylated forms, and its subcellular localization (nuclear vs. cytoplasmic) remained unchanged (see fig. 6, 7). In our previous study, we demonstrated high YB-1 expression in RPMI8226 and NCI-H929 MM cells. However, in these cultures, YB-1 was predominantly cytoplasmic (90–95 % of cells), and its localization remained unchanged in bortezomib-resistant sublines [17]. The AMO-1 cell line displays a distinct basal YB-1 distribution pattern: when combining cells with complete nuclear and partial nuclear (diffuse) localization, the percentage ranges between 70–75 %. This pattern potentially indicates pre-activation of YB-1, though additional cofactors appear necessary for P-gp expression induction. Alternatively, YB-1 might not participate in P-gp regulation specifically in this cell line. Notably, exist clinical evidence of YB-1 involving: a study analyzing samples from 22 MM patients revealed significant co-expression of *YB-1* mRNA with *ABCB1 (MDR1)*, and the *APE1/YB-1/MDR1* gene signature's association with adverse clinical outcomes [21].

CONCLUSION

Our research established P-gp as a critical factor in CFZ resistance in AMO-1 MM cells. For the first time, we simultaneously demonstrated its activation at the mRNA expression level, cell surface protein expression, and functional activity toward CFZ, as well as the possibility of resensitizing cells using a P-gp inhibitor. We also made the first attempt to identify the transcription factor responsible for P-gp upregulation, though our work did not achieve full clarity on this issue at this stage. These results suggest promising directions for overcoming CFZ resistance in MM by suppressing P-gp function and/or expression.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

1. Zhou X., Xu R., Wu Y. et al. The role of proteasomes in tumorigenesis. Genes Dis 2023;11(4):101070. DOI: 10.1016/j.gendis.2023.06.037
2. Okazuka K., Ishida T. Proteasome inhibitors for multiple myeloma. Jpn J Clin Oncol 2018;48(9):785–93. DOI: 10.1093/jjco/hyy108
3. Issa M.E., Takhsha F.S., Chirumamilla C.S. et al. Epigenetic strategies to reverse drug resistance in heterogeneous multiple myeloma. Clin Epigenetics 2017;9(1):17. DOI: 10.1186/s13148-017-0319-5
4. Manasanch E.E., Orlowski R.Z. Proteasome inhibitors in cancer therapy. Nat Rev Clin Oncol 2017;14(7):417–33. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.206
5. Kim K.B. Proteasomal adaptations to FDA-approved proteasome inhibitors: a potential mechanism for drug resistance? Cancer Drug Resist 2021;4(3):634–45. DOI: 10.20517/cdr.2021.27
6. Tripathi S.C., Vedpathak D., Ostrin E.J. The functional and mechanistic roles of immunoproteasome subunits in cancer. Cells 2021;10(12):3587. DOI: 10.3390/cells10123587
7. Kuzmich E.V., Pavlova I.E., Bessmeltsev S.S. Sensitization to HLA antigens in patients with multiple myeloma. MEDLINE.RU 2024;25:319–32. (In Russ.).
8. Woodle E.S., Tremblay S., Brailey P. et al. Proteasomal adaptations underlying carfilzomib-resistance in human bone marrow plasma cells. Am J Transplant 2020;20(2):399–410. DOI: 10.1111/ajt.15634
9. Rajeev Krishnan S., De Rubis G., Suen H. et al. A liquid biopsy to detect multidrug resistance and disease burden in multiple myeloma. Blood Cancer J 2020;10(3):37. DOI: 10.1038/s41408-020-0304-7
10. Kubiczkova L., Pour L., Sedlarikova L. et al. Proteasome inhibitors – molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. J Cell Mol Med 2014;18(6):947–61. DOI: 10.1111/jcmm.12279
11. Besse A., Stolze S., Rasche L. et al. Carfilzomib resistance due to ABCB1/MDR1 overexpression is overcome by nelfinavir and lopinavir in multiple myeloma. Leukemia 2018;32(2):391–401. DOI: 10.1038/leu.2017.212.
12. Byrgazov K., Kraus M., Besse A. et al. Up-regulation of multidrug resistance protein MDR1/ABCB1 in carfilzomib-resistant multiple myeloma differentially affects efficacy of anti-myeloma drugs. Leuk Res 2021;101:106499. DOI: 10.1016/j.leukres.2020.106499
13. Bargou R.C., Jürchott K., Wagener C. et al. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. Nat Med 1997;3(4):447–50. DOI: 10.1038/nm0497-447
14. Bommert K.S., Effenberger M., Leich E. et al. The feed-forward loop between YB-1 and MYC is essential for multiple myeloma cell survival. Leukemia 2013;27(2):441–50. DOI: 10.1038/leu.2012.185

15. Rybalkina E.Y., Moiseeva N.I., Karamysheva A.F. Triterpenoids with modified A-ring as modulators of P-gp-dependent drug-resistance in cancer cells. Chem Biol Interact 2021;348:109645. DOI: 10.1016/j.cbi.2021.109645
16. Laletina L.A., Moiseeva N.I., Klimova D.A., Stavrovskaya A.A. The role of ABC transporters in drug resistance to bortezomib in multiple myeloma. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2019;6(1):49–56. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-49-56
17. Moiseeva N.I., Laletina L.A., Fetisov T.I. et al. Analysis of multiple drug resistance mechanism in different types of soft tissue sarcomas: assessment of the expression of ABC-transporters, MVP, YB-1, and analysis of their correlation with chemosensitivity of cancer cells. Int J Mol Sci 2022;23(6):3183. DOI: 10.3390/ijms23063183
18. Lee M.J., Miller Z., Park J.E. et al. H727 cells are inherently resistant to the proteasome inhibitor carfilzomib, yet require proteasome activity for cell survival and growth. Sci Rep 2019;9(1):4089. DOI: 10.1038/s41598-019-40635-1
19. Mynott R.L., Wallington-Beddoe C.T. Inhibition of P-glycoprotein does not increase the efficacy of proteasome inhibitors in multiple myeloma cells. ACS Pharmacol Transl Sci 2021;4(2):713–29. DOI: 10.1021/acsptsci.0c00200
20. Takahashi K., Inukai T., Imamura T. et al. Anti-leukemic activity of bortezomib and carfilzomib on B-cell precursor ALL cell lines. PLoS One 2017;12(12):e0188680. DOI: 10.1371/journal.pone.0188680
21. Kalitin N.N., Chernykh Y.B., Buravtsova I.V. Comparative analysis of quantitative parameters of expression of the retinoic acid nuclear receptor RARα gene and APE1/YB-1/MDR1 pattern genes in patients with newly detected multiple myeloma. Bull Exp Biol Med 2017;164(1):90–4. DOI: 10.1007/s10517-017-3931-7

Acknowledgment. The authors express their deep gratitude to E.M. Barysheva, and N.N. Kalitin for consultations on the development of cell lines and methodological optimization of some experiments.
Благодарность. Коллектив авторов выражает большую признательность Е.М. Барышевой и Н.Н. Калитину за консультации по выведению клеточных линий и методической оптимизации некоторых опытов.

Author's contributions
A.I. Cherkasova: culture management, MTT tests and immunocytochemical statistical data processing, preparation of illustrative material, article writing, translation;
L.A. Laletina: the development of the idea and the research concent, the development of resistant cells, experiments with flow cytometry, article writing, editing;
K.V. Kalabina: real-time polymerase chain reaction, preparation of illustrative material;
E.A. Scherbakova: Western blotting;
N.I. Moiseeva: the development of the idea and the research concent, conducting experiments to determine rhodamine, statistical data processing, article writing, editing.
Вклад авторов
А.И. Черкасова: ведение культур, проведение МТТ-тестов и иммуноцитохимического исследования, обработка статистических данных, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи, перевод;
Л.А. Лалетина: разработка идеи и концепции исследования, разработка резистентных клеток, эксперименты с проточной цитометрией, написание текста статьи, редактирование;
К.В. Калабина: проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени, подготовка иллюстративного материала;
Е.А. Щербакова: вестерн-блоттинг;
Н.И. Моисеева: разработка идеи и концепции исследования, проведение экспериментов по определению родамина, статистическая обработка данных, написание текста статьи, редактирование.

ORCID of authors / ORCID авторов
A.I. Cherkasova / А.И. Черкасова: https://orcid.org/0000-0003-0236-2796
L.A. Laletina / Л.А. Лалетина: https://orcid.org/0000-0002-8839-5881
E.A. Scherbakova / Е.А. Щербакова: https://orcid.org/0009-0001-5651-1454
N.I. Moiseeva / Н.И. Моисеева: https://orcid.org/0000-0001-6697-7154

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

Funding. The study supported by the Russian Science Foundation (grant No. 24-25-00491; https://rscf.ru/project/24-25-00491/).
Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-25-00491; https://rscf.ru/project/24-25-00491/).

Article submitted: 15.11.2024. **Accepted for publication:** 30.09.2025. **Published online:** 10.12.2025.
Статья поступила: 15.11.2024. **Принята к публикации:** 30.09.2025. **Опубликована онлайн:** 10.12.2025.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-100-108

Регуляторные Т-клетки в первичном очаге опухолевого роста при колоректальном раке

В.В. Крюкова, В.Л. Цепелев, П.П. Терешков

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

Контакты: Виктор Львович Цепелев *viktorcepelev@mail.ru*

Введение. Регуляторные Т-клетки (Т-рег) обладают проонкогенной активностью, ингибируют иммунный ответ и поэтому могут быть значимой мишенью для иммунотерапевтических методов лечения колоректального рака (КРР). В настоящее время недостаточно изучена роль регуляторных Т-клеток в механизмах канцерогенеза, а также участие коингибирующих и костимулирующих белков иммунной системы в формировании опухолевой иммуносупрессии при данной патологии.

Цель исследования – определить содержание подтипов Т-рег в первичном очаге опухолевого роста у больных КРР и оценить уровни экспрессии костимулирующих и коингибирующих белков на их мембране.

Материалы и методы. В основную группу вошли 105 больных с аденокарциномой толстой кишки III стадии, в контрольную – 75 пациентов с неопухолевыми заболеваниями ободочной кишки. Объектом исследования явились инфильтрирующие опухоль Т-лимфоциты, которые выделяли ферментативным методом. Определение подтипов Т-рег, а также экспрессии рецептора программируемой клеточной гибели (PD-1) и индуцируемого костимулятора Т-лимфоцитов (ICOS) проводили с помощью проточной цитометрии. Т-рег идентифицировали как $CD19^{-}CD3^{+}CD4^{+}CD25^{high}CD127^{-}$. На основе экспрессии CD45RA и CD197 выявлены подтипы Т-рег: наивные ($CD45RA^{+}CD197^{+}$), центральной памяти ($CD45RA^{-}CD197^{+}$), эффекторной памяти ($CD45RA^{-}CD197^{-}$) и терминально-дифференцированные ($CD45RA^{+}CD197^{-}$). Значимость различий в показателях между основной и контрольной группами оценивали с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

Результаты. В первичном очаге опухолевого роста при КРР в 4,4 раза увеличивается содержание Т-рег. Одновременно с этим изменяется соотношение подтипов Т-рег в опухолевом микроокружении, что выражается в уменьшении в 1,4 раза количества наивных клеток, а также увеличении в 2,8 раза количества Т-рег эффекторной памяти и в 3,1 раза – терминально-дифференцированных лимфоцитов. Опухоль-инфильтрирующие Т-рег в 2 раза сильнее экспрессировали ICOS по сравнению с контролем. Установлено увеличение на 20 % количества Т-рег $PD\text{-}1^{+}ICOS^{+}$. Количество клеток Т-рег $PD\text{-}1^{-}ICOS^{-}$ в первичном очаге опухолевого роста в группе аденокарциномы толстой кишки уменьшилось в 1,4 раза по сравнению с контрольной группой.

Заключение. У больных КРР в первичном очаге опухолевого роста уменьшается количество наивных Т-рег и увеличивается относительное содержание дифференцированных эффекторных клеток. В опухолевом микроокружении при КРР возрастает количество Т-рег, экспрессирующих на своей поверхности как костимулирующую молекулу ICOS, так и коингибирующий рецептор PD-1.

Ключевые слова: колоректальный рак, регуляторная Т-клетка, экспрессия, белок программируемой клеточной гибели, индуцируемый костимулятор Т-лимфоцитов

Для цитирования: Крюкова В.В., Цепелев В.Л., Терешков П.П. Регуляторные Т-клетки в первичном очаге опухолевого роста при колоректальном раке. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(4):100–8.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-100-108

Regulatory T cells in the primary tumor growth lesion in colorectal cancer

V.V. Kryukova, V.L. Tsepelev, P.P. Tereshkov

Chita State Medical Academy, Ministry of Health of Russia; 39a Gorkogo St., Chita 672000, Russia

Contacts: Victor Lvovich Tsepelev *viktorcepelev@mail.ru*

Introduction. Regulatory T cells (Treg) have pro-oncogenic activity, inhibit the immune response and therefore can be a significant target for immunotherapeutic methods of treating colorectal cancer (CRC). Currently, the role of regulatory T cells in the mechanisms of carcinogenesis, as well as the participation of co-inhibitory and co-stimulating proteins of the immune system in the formation of tumor immunosuppression in CRC, is insufficiently studied.

Aim. To determine the content of Treg subtypes in the primary tumor focus in patients with CRC and to evaluate the expression level of co-stimulating and co-inhibitory proteins on their membrane.

Materials and methods. The main group consisted of 105 patients with stage III colon adenocarcinoma; the control group – 75 patients with non-neoplastic diseases of the colon. The object of the study was tumor-infiltrating T lymphocytes, which were isolated by an enzymatic method. Determination of Treg subtypes, as well as expression of programmed cell death 1 (PD-1) and inducible T-cell costimulator (ICOS) proteins, was performed by flow cytometry. Treg was identified as $CD19^-CD3^+CD4^+CD25^{high}CD127^-$. Based on the expression of CD45RA and CD197, Treg subtypes were determined as naive ($CD45RA^+CD197^+$), central memory ($CD45RA^-CD197^+$), effector memory ($CD45RA^-CD197^-$), and terminally differentiated ($CD45RA^+CD197^-$). The significance of differences in the parameters of the main and control groups was assessed using the nonparametric Mann–Whitney U test.

Results. In the primary focus of tumor growth in CRC, the content of Treg increases by 4.4 times. At the same time, the ratio of Treg subtypes in the tumor microenvironment changes, which is expressed in a 1.4-fold decrease in the number of naive cells, as well as a 2.8-fold increase in the number of effector memory Treg and a 3.1-fold increase in terminally differentiated lymphocytes. Tumor-infiltrating Treg expressed the ICOS 2 times more strongly compared to the control. A 20 % increase in the number of Treg $PD\text{-}1^+ICOS^+$ was established. The number of Treg $PD\text{-}1^-ICOS^-$ cells in the primary tumor focus decreased by 1.4 times compared to the control group.

Conclusion. In patients with CRC, the number of naive Treg decreases in the primary tumor focus and the relative content of differentiated effector cells increases. In the tumor microenvironment in CRC, the number of Tregs increases, expressing on their surface both the costimulating molecule ICOS and the co-inhibitory receptor PD-1.

Keywords: colorectal cancer, regulatory T cell, expression, programmed cell death protein, inducible T-lymphocyte costimulator

For citation: Kryukova V.V., Tsepelev V.L., Tereshkov P.P. Regulatory T cells in the primary tumor growth lesion in colorectal cancer. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(4):100–8. (In Russ.).
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-100-108

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) по распространенности занимает 3-е место среди всех злокачественных новообразований и 2-е – по смертности [1]. В последние годы прорыв в лечении КРР связывают с иммунотерапией. Современные методы иммунотерапии направлены как на коингибирующие и костимулирующие рецепторы иммунной системы, так и на отдельные популяции иммунных клеток [2]. В этом контексте особый интерес представляют регуляторные Т-клетки (Т-рег), которые обладают проонкогенной активностью, ингибируют иммунный ответ и поэтому могут быть значимой мишенью для иммунотерапевтических методов лечения КРР [3]. Клетки данного типа играют ключевую роль в ограничении аутоиммунных реакций, а также в механизмах канцерогенеза [4]. Известно, что Т-рег подавляют цитотоксическую активность CD8-положительных лимфоцитов и экспрессируют фактор транскрипции forkhead box p3 (Foxp3), который определяет ингибирующую активность Т-рег [5]. Иммуносупрессивная активность Т-рег обусловлена секрецией клеточных медиаторов (интерлейкина (IL) 10, трансформирующего фактора роста β (TGF-β) и IL-35), использованием иммунных контрольных точек (CTLA-4 и LAG-3), эктоферментов (CD39 и CD73), а также аденозина [6, 7].

В настоящее время роль Т-рег в механизмах канцерогенеза, изменение содержания подтипов данных иммунных клеток в опухолевой ткани, а также участие коингибирующих и костимулирующих белков иммунной системы в формировании опухолевой иммуносупрессии при раке толстой кишки изучены недостаточно. Т-рег следует рассматривать как перспективные клетки-мишени в стратегии иммунотерапии КРР.

Цель исследования – определить содержание подтипов Т-рег в первичном очаге опухолевого роста у больных раком толстой кишки и оценить уровень экспрессии костимулирующих и коингибирующих белков на их мембране.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование вошли 180 больных, которые были разделены на 2 группы. В основную группу включены 105 пациентов с аденокарциномой толстой кишки III стадии, в контрольную – 75 пациентов с неопухолевыми заболеваниями ободочной кишки. Группы сопоставимы по полу и возрасту больных.

Характеристика пациентов, вошедших в исследование, представлена в табл. 1.

Фрагменты опухоли у больных КРР и ткань толстой кишки у пациентов контрольной группы забирали во время хирургического вмешательства. Ткани помещали в стерильный физиологический раствор и транспортировали в иммунологическую лабораторию при температуре 4–10 °C в течение 30 мин.

Для получения клеточной суспензии применяли механическо-ферментный метод. Фрагменты ткани опухоли измельчали и гомогенизировали в гомогенизаторе GentleMACSDissociator (Miltenyi BiotecGmbH, Германия) с пробирками С-типа и с использованием набора реагентов TumorDissociationKit (Miltenyi BiotecGmbH, Германия) согласно инструкции производителя. Полученную суспензию клеток фильтровали через капроновый фильтр с ячейками размером 70 мкм

Таблица 1. *Характеристика пациентов, включенных в иссследование*

Table 1. *Characteristics of patients included in the study*

Показатель Parameter	**Основная группа (n = 105)** Main group (n = 105)	**Контрольная группа (n = 75)** Control group (n = 75)	**Результаты статистического анализа** Statistical analysis results
Критерии включения Inclusion criteria	Верифицированный колоректальный рак, первичный статус заболевания Verified colorectal cancer, primary disease status	Неопухолевые заболевания толстой кишки (колостома, неосложненные дивертикулы, долихоколон, травма кишки без перитонита) Non-neoplastic diseases of the colon (colostomy, uncomplicated diverticula, dolichocolon, bowel trauma without peritonitis)	–
Критерии исключения Exclusion criteria	Лучевая терапия или химиотерапия, аутоиммунные и инфекционные заболевания, воспалительные заболевания толстой кишки Radiation therapyor chemotherapy, autoimmune and infectious diseases, inflammatory bowel disease	Злокачественные новообразования любой локализации, доброкачественные опухоли толстой кишки, аутоиммунные и инфекционные заболевания, хронические воспалительные заболевания толстой кишки (язвенный колит, болезнь Крона), осложненные формы дивертикулов, долихоколон, перитонит Malignant neoplasms of any localization, benign tumors of the colon, autoimmune and infectious diseases, chronic inflammatory diseases of the colon (ulcerative colitis, Crohn's disease), complicated forms of diverticula, dolichocolon, peritonitis	–
Пол, n (%): Gender, n (%):			χ^2 = 0,001; p = 0,979
женский female	66 (62,9)	47 (62,7)	
мужской male	39 (37,1)	28 (37,3)	
Возраст, лет, Me (Q_1; Q_3) Age, years, Me (Q_1; Q_3)	64,0 (56,0; 69,5)	62,0 (50,0; 68,0)	U = 3448,0; p = 0,155
Гистологический тип опухоли, n (%): Histological type of the tumor, n (%):			
аденокарцинома adenocarcinoma	105 (100)	–	–
Стадия заболевания, n (%): Disease stage, n (%):			
III	105 (100)	–	–

Примечание. *U – критерий Манна–Уитни; Me – медиана; Q_1 – 1-й квартиль; Q_3 – 3-й квартиль.*

Note. *U – Mann–Whitney criterion; Me – median; Q_1 – 1st quartile; Q_3 – 3rd quartile.*

(Miltenyi BiotecGmbH, Германия). Полученные клетки отмывали промывающим буфером autoMACS Rinsing Solution (Miltenyi BiotecGmbH, Германия). Все исследования проводили в течение 6 ч после забора материала.

Суспензию клеток в объеме 100 мкл окрашивали моноклональными антителами CD19-FITC (клон J3-119), CD25-PE (клон B1.49.9), CD45RA-ECD (клон ALB11), CD279-PC5.5 (клон PD1.3), CD127-PC7 (клон R34.34), CD278-Pacific Blue (клон C398.4A), CD45-Krome Orange (клон J33), CD197-Brilliant Violet 605™ (клон G043H7) (все Beckman Coulter, США), CD4-BUV395 (клон RPA-T4), CD8-BUV496 (клон RPA-T8), CD3-BUV661 (клон UCHT1) (все Becton Dickinson, Великобритания), CD278-Pacific Blue (клон C398.4A), CD197-Brilliant Violet 605™ (клон G043H7) (все BioLegend, Inc., США).

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью красителя iFluor860 (AAT Bioquest, США). Оптимальные комбинации антител, конъюгированных с различными флуорохромами, использовали в соответствии с рекомендациями Y.D. Mahnke и M. Roederer [8]. Окрашивание проводили в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин, после чего эритроциты лизировали путем добавления 975 мкл раствора VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter, США) и 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, США) и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Образцы промывали 1 раз фосфатно-солевым буфером (PBS) в течение 7 мин при 400g, ресуспендировали в 250 мкл PBS с 2 % нейтрального формалина (Sigma-Aldrich Co., США) и анализировали с помощью проточной цитометрии. В образцах собирали не менее 50 000 клеток $CD3^{+}$ для оценки иммунных клеток. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX LX (Beckman Coulter, США). Цитофлуориметрические данные оценивали с помощью программы CytExpert software v.2.0 и Kaluza™ v.2.1.1 (Beckman Coulter, США).

Стратегия гейтирования Т-рег. При использовании моноклональных антител идентифицировали клетки иммунной системы: Т-лимфоциты определяли как $CD19^{-}CD3^{+}$, Т-хелперы (Th) – как $CD19^{-}CD3^{+}CD4^{+}$, цитотоксические Т-лимфоциты (Tcyt) – как $CD19^{-}CD3^{+}CD8^{+}$, Т-рег – как $CD19^{-}CD3^{+}CD4^{+}CD25^{high}CD127^{-}$. На основе экспрессии CD45RA и CD197 определены подтипы Т-рег: наивные ($CD45RA^{+}CD197^{+}$), центральной памяти ($CD45RA^{-}CD197^{+}$), эффекторной памяти ($CD45RA^{-}CD197^{-}$) и терминально-дифференцированные CD45RA-положительные эффекторные Т-лимфоциты (TEMRA, $CD45RA^{+}CD197^{-}$) [9]. Экспрессия PD-1 и ICOS оценена в общем пуле Т-рег. Схема гейтирования, используемая для идентификации регуляторных Т-лимфоцитов и их субпопуляций, представлена на рис. 1.

С учетом численности исследуемых групп (*n* >50) оценку нормальности распределения признаков проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Поскольку наблюдалось распределение признаков,

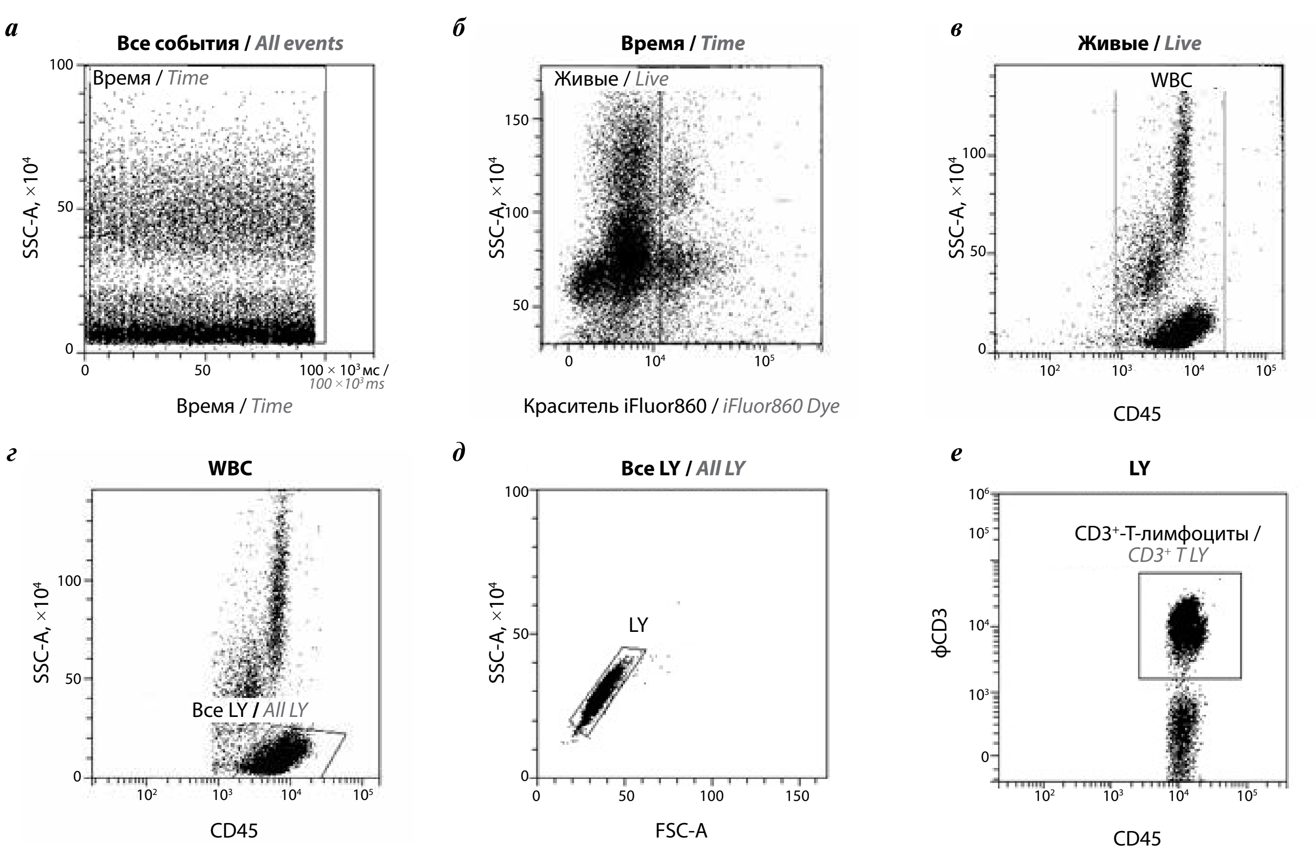


Рис. 1. *Схема гейтирования, используемая для идентификации основных популяций Т-лимфоцитов, регуляторных Т-лимфоцитов, стадий их дифференцировки и экспрессии CD279 и CD278 регуляторных Т-клеток (Treg): а – исключение артефактов (включало временные ограничения); б – выделение живых клеток; в – выделение лейкоцитов (WBC); г – выделение лимфоцитов (LY); д – исключение дублетов из анализа LY с использованием прямого рассеивания света по высоте импульса рассеянного света (FSC-H) и прямого рассеивания света по площади под кривой (FSC-A); е – выделение Т-лимфоцитов ($CD19^{-}CD3^{+}$)*

Fig. 1. *Gating strategy used to identify major T cell populations, regulatory T cells, their differentiation stages and expression of CD279 and CD278 regulatory T cells (Treg): а – artifact exclusion included time restrictions; б – live cell isolation; в – white blood cell (WBC) isolation; г – lymphocyte (LY) isolation; д – doublet exclusion from LY analysis using (forward scatter height) (FSC-H) and forward scatter area (FSC-A); е – T cell isolation ($CD19^{-}CD3^{+}$)*

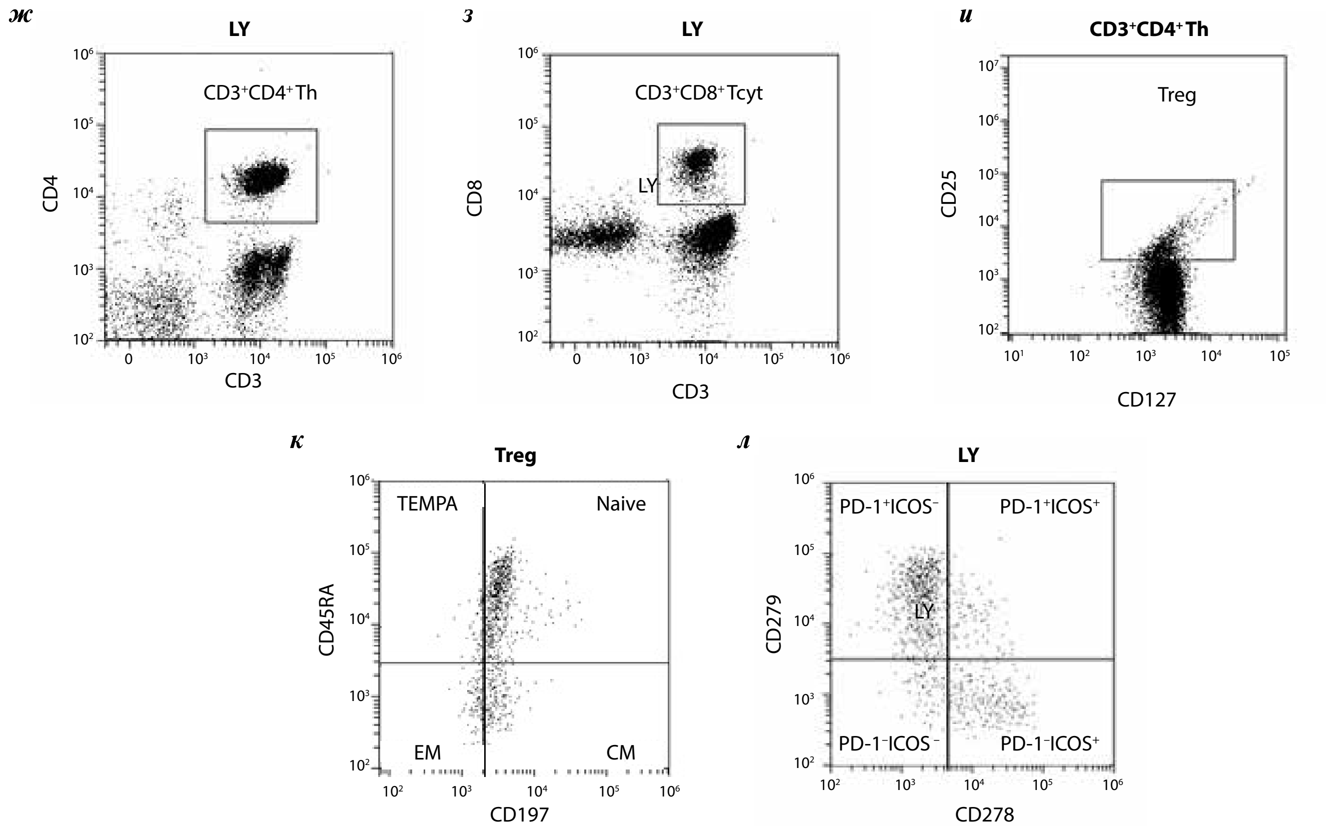


Рис. 1. Окончание. *Схема гейтирования, используемая для идентификации основных популяций Т-лимфоцитов, регуляторных Т-лимфоцитов, стадий их дифференцировки и экспрессии CD279 и CD278 регуляторных Т-клеток (Treg): ж – Т-хелперные клетки (Th) (определяли как CD3$^+$CD4$^+$-лимфоциты); з – Т-цитотоксические (Tcyt) клетки (определяли как CD3$^+$CD8$^+$-лимфоциты); и – регуляторные Т-клетки (Treg) (идентифицировали как субпопуляцию CD4$^+$CD25^{hi} в пределах общих CD3$^+$CD4$^+$-клеток); к – основные стадии дифференцировки Treg (наивные клетки (naive) – CD45RA$^+$CD197$^+$, клетки центральной памяти (CM) – CD45RA$^-$CD197$^+$, клетки эффекторной памяти (EM) – CD45RA$^-$CD197$^-$, терминально-дифференцированные клетки (TEMRA) – CD45RA$^+$CD197$^-$; л – экспрессия рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1) (CD279) и индуцируемого костимулятора Т-лимфоцитов (ICOS) (CD278) общим пулом Т-рег. SSC – боковое рассеивание*

Fig. 1. The end. *Gating strategy used to identify major T cell populations, regulatory T cells, their differentiation stages and expression of CD279 and CD278 regulatory T cells (Treg): ж – T helper (Th) cells (were defined as CD3$^+$CD4$^+$ LY); з – T cytotoxic cells (Tcyt) (were defined as CD3$^+$CD8$^+$ LY); и – regulatory T cells (Treg) (were identified as a CD4$^+$CD25^{hi} subset within the total CD3$^+$CD4$^+$ cells); к – the main stages of Treg differentiation (naive cells – CD45RA$^+$CD197$^+$, central memory cells (CM) – CD45RA$^-$CD197$^+$, effector memory cells (EM) – CD45RA$^-$CD197$^-$ and terminally differentiated cells (TEMRA) – CD45RA$^+$CD197$^-$); л – expression of programmed cell death 1 (PD-1) (CD279) and inducible T-cell costimulator (ICOS) (CD278) by the total Treg pool. SSC – Side Scatter*

отличное от нормального, интервальные данные представлены в виде медианы, 1-го и 3-го квартилей. Для сравнения 2 независимых групп по одному количественному признаку применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при p <0,05. Статистический анализ выполняли с использованием IBM SPSS Statistics Version 25.0 (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты цитофлуориметрического анализа показали, что в ткани первичной опухоли больных колоректальным раком в 4,4 раза увеличивается количество Т-рег (табл. 2).

Одновременно с этим происходит изменение субпопуляционного состава данных лимфоцитов. Так, в 1,4 раза уменьшается количество наивных Т-рег и возрастает относительное содержание дифференцированных клеток данного типа. Отмечено увеличение в 2,8 раза количества Т-рег эффекторной памяти (CD45RA$^-$CD197$^-$) и в 3,1 раза – терминально-дифференцированных клеток, экспрессирующих молекулу CD45RA. Статистически значимых различий в количестве инфильтрирующих первичную опухоль Т-рег центральной памяти, экспрессирующих CD197, между группами выявлено не было (см. табл. 2).

Данные, полученные в ходе цитометрического анализа, показали, что в опухолевой ткани первичного очага у больных раком толстой кишки в 2 раза увеличивается относительное содержание Т-рег, экспрессирующих на своей поверхности ICOS (табл. 3).

Статистически значимых различий в уровне экспрессии коингибирующего рецептора PD-1 на Т-рег в первичном очаге опухолевого роста между группами не зарегистрировано. В то же время установлено увеличение на 20 % количества Т-рег, которые

Таблица 2. *Подтипы регуляторных Т-клеток (Т-рег) в ткани опухоли у больных колоректальным раком*

Table 2. *Subtypes of regulatory T cells (Treg) in tumor tissue of patients with colorectal cancer*

Субпопуляции Т-рег, % Subpopulations Treg, %	Контроль (n =75) Control (n = 75)	Колоректальный рак (n = 105) Colorectal cancer (n = 105)	U-критерий Манна–Уитни Mann–Whitney U test	p
Т-рег Treg	1,59 [0,7; 2,3]	7,0 [4,7; 9,9]	660	<0,001
Т-рег наивные Treg naive	64,7 [50,8; 72,9]	47,4 [36,9; 62,2]	1974	<0,001
Т-рег центральной памяти Treg central memory	29,6 [20,7; 36,3]	30,9 [20,7; 38,0]	3731	0,549
Т-рег эффекторной памяти Treg effector memory	5,3 [2,6; 8,2]	14,7 [10,6; 17,5]	454,5	<0,001
Т-рег TEMRA Treg TEMRA	1,7 [0,6; 2,5]	5,3 [3,5; 8,3]	364,5	<0,001

Примечание. *TEMRA – терминально-дифференцированные лимфоциты; Me – медиана; Q_1 – 1-й квартиль; Q_3 – 3-й квартиль.*
Note. *TEMRA – terminally differentiated lymphocytes; Me – median; Q_1 – 1st quartile; Q_3 – 3rd quartile.*

Таблица 3. *Экспрессия костимулирующих и коингибирующих молекул на регуляторных Т-клетках в опухолевой ткани больных колоректальным раком*

Table 3. *Expression of co-stimulatory and co-inhibitory molecules on regulatory T cells in tumor tissue of patients with colorectal cancer*

Субпопуляции Т-рег, % Subpopulations Treg, %	Контроль (n =75) Control group (n = 75)	Колоректальный рак (n = 105) Colorectal cancer (n = 105)	U-критерий Манна–Уитни Mann-Whitney U test	p
Т-рег-PD-1$^+$ICOS$^-$ Treg PD-1$^+$ICOS$^-$	23,1 [13,2; 30,2]	18,3 [11,1; 29,3]	3453,5	0,16
Т-рег-PD-1$^-$ICOS$^+$ Treg PD-1$^-$ICOS$^+$	4,8 [2,7; 6,8]	9,58 [7,3; 13,0]	876,5	<0,001
Т-рег-PD-1$^+$ICOS$^+$ Treg PD-11$^+$ICOS$^+$	32,9 [25,7; 42,2]	39,2 [29,3; 54,6]	2512	<0,001
Т-рег-PD-1$^-$ICOS$^-$ Treg PD-1$^-$ICOS$^-$	38,3 [28,9; 48,8]	26,9 [19,4; 34,4]	1713	<0,001

Примечание. *Т-рег – регуляторные Т-клетки; PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели; ICOS – индуцируемый костимулятор Т-лимфоцитов; Me – медиана; Q_1 – 1-й квартиль; Q_3 – 3-й квартиль.*
Note. *Treg – regulatory T cells; PD-1 – programmed cell death protein; ICOS – inducible T-lymphocyte co-stimulator; Me – median; Q_1 – 1st quartile; Q_3 – 3rd quartile.*

одновременно экспрессировали как костимулирующую молекулу ICOS, так и коингибирующий рецептор PD-1. Количество клеток Т-рег-PD-1$^-$ICOS$^-$ в первичном очаге опухолевого роста при колоректальном раке по отношению к контрольной группе было в 1,4 раза меньше (см. табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные показали, что при КРР в первичном очаге опухолевого роста увеличивается относительное содержание Т-рег. Эти иммунные клетки подавляют функциональную активность эффекторных C8$^+$- и CD4$^+$-лимфоцитов [5]. Поэтому следует полагать, что Т-рег играют ключевую роль в механизмах формирования опухолевой иммуносупрессии при КРР. Мы установили, что в опухолевом микроокружении при данной патологии снижается количество наивных Т-рег, экспрессирующих на своей мембране CD197 (CCR7), который представляет собой хемокиновый хоуминг-рецептор, способствующий транслокации наивных клеток в лимфатические узлы. CCR7 является одной из ключевых молекул, способствующих инициации адаптивного иммунного ответа на онкоантиген. Более того, наивные Т-рег экспрессируют молекулу клеточной адгезии CD62L, которая также необходима для хоуминга Т-рег во вторичные лимфоидные органы и способствует взаимодействию наивных Т-рег и клеток эндотелия в лимфатических узлах [10]. Наивные Т-рег отличаются повышенной секрецией IL-2. Одновременно с этим увеличивается относительное содержание Т-рег эффекторной памяти ($CD45RA^-CD197^-$) и терминально-дифференцированных Т-рег ($CD45RA^+CD197^-$). Т-рег эффекторной памяти экспрессируют антиген CD45R0. Данные клетки секретируют иммуносупрессивный цитокин IL-10, экспрессируют на своей поверхности белки иммунного цикла CTLA-4 и ICOS, а также хемокиновые рецепторы, способствующие транслокациии Т-рег эффекторной памяти в очаг опухолевого роста. Т-рег эффекторной памяти тропны к нелимфоидным органам [11]. Терминально-дифференцированные клетки (TEMRA), имеющие фенотип $CD45RA^+CD197^-$, являются заключительной стадией созревания Т-рег. Данные клетки реализуют свои эффекторные свойства в очаге опухолевого роста под влиянием IL, продуцируемых клетками врожденного иммунитета. Т-рег TEMRA блокируют эффекты $CD8^+$-лимфоцитов, имеют короткий жизненный цикл, обладают низкой пролиферативной активностью и экспрессируют на своей поверхности адгезионные белки и хемокиновые рецепторы, способствующие миграции в нелимфоидные органы, в частности в очаги опухолевого роста [12].

Опухолевые клетки активно способствуют миграции Т-рег в свое микроокружение путем секреции хемокинов. При гемобластозах, а также некоторых солидных опухолях характерно увеличение количества Т-рег в крови, первичном очаге опухолевого роста и регионарных лимфатических узлах [12]. Установлена корреляционная связь между повышенным содержанием Т-рег и неблагоприятным течением злокачественного заболевания [13]. Согласно результатам анализа литературы, роль иммунных контрольных точек (ИКТ) в функционировании Т-рег довольно противоречива. Так, доказано, что Т-рег экспрессируют ряд коингибирующих молекул (PD-1, TIM-3, LAG-3). Более того, повышенная экспрессия коингибирующих ИКТ коррелирует с повышенной супрессорной активностью данных клеток [14]. Однако в работе R. Karim и соавт. показано, что PD-1 снижает функциональную активность Т-рег [15]. Результаты исследования в культуре регуляторных Т-клеток продемонстрировали, что моноклональные антитела к PD-1 вызывают увеличение активности Т-рег [16]. Y. Dong и соавт. выявили, что PD-1 вызывает трансформацию эффекторных Т-клеток в индуцированные Т-рег [17]. В литературе имеются неоднозначные данные в отношении иммунотерапии, основанной на использовании моноклональных антител к PD-1 и функциональной активности Т-рег. Так, на мышиной модели остеосаркомы показано, что при использовании анти-PD-1-терапии наблюдается снижение количества и функциональной активности Т-рег в опухоли [18]. По результатам протеомного анализа обнаружена активация супрессорных генов в инфильтрирующих опухоль Т-рег после анти-PD-1-терапии у пациентов с немелкоклеточным раком легкого и мезотелиомой [19]. В связи с противоречивостью данных необходимы дальнейшие исследования роли ИКТ в модуляции функциональной активности Т-рег.

Индуцируемый Т-клеточный костимулятор (ICOS) представляет собой белок суперсемейства CD28 с молекулярной массой 55~60 кДа, который первоначально был обнаружен на поверхности Т-клеток при стимуляции Т-клеточного рецептора. ICOS экспрессируется на Т-хелперах 1-, 2- и 17-го типов, Т-фолликулярных хелперных клетках и Т-рег [20]. Т-рег, экспрессирующие эту костимулирующую молекулу, обладают повышенной ингибирующей активностью в отношении эффекторных Т-клеток. Показано, что высокая экспрессия ICOS на Т-рег наблюдается при плоскоклеточном раке головы и шеи [21], раке яичников [22] и остром миелоидном лейкозе [23]. Имеются данные о том, что повышенная экспрессия ICOS на Т-рег коррелирует с прогрессией злокачественного новообразования и неблагоприятным прогнозом при раке желудка [24]. Экспрессия лиганда ICOS (ICOSL) на опухолевых клетках при раке желудка или на дендритных клетках приводит к увеличению инфильтрирующих опухоль $ICOS^+$-Т-рег [25]. Можно предположить, что взаимодействие ICOS и ICOSL является значимым механизмом ускользания злокачественных клеток от иммунного ответа. Между тем имеются сообщения о том, что высокая экспрессия ICOS на инфильтрирующих опухоль цитотоксических Т-лимфоцитах и Т-хелперах, отличных от Т-рег, коррелирует с улучшением показателей выживаемости, например, при аденокарциноме легкого [26].

Мы получили интересные данные о том, что на поверхности Т-рег, инфильтрирующих опухоль при КРР, не повышается экспрессия коингибирующей молекулы PD-1. Вместе с тем зарегистрировано увеличение количества Т-рег, совместно экспрессирующих ICOS и PD-1. ICOS как костимулирующая молекула не обладает прямой ингибирующей функцией. Вероятно, передача сигналов ICOS может влиять на экспрессию других коингибирующих молекул, в частности PD-1. Данный феномен требует дальнейшего изучения.

Результаты нашего исследования свидетельствуют об участии Т-рег, коингибирующего рецептора PD-1 и костимулирующей молекулы ICOS в формировании иммуносупрессивной среды в первичном очаге опухолевого роста при КРР. Однако наша работа имеет некоторые ограничения. В частности, не изучены изменения субпопуляционного состава Т-рег и уровня экспрессии ИКТ в регионарных лимфатических узлах, не установлены корреляционные связи изменений Т-рег с прогрессированием КРР, не представлены данные об изменении количественного состава и функциональной активности Т-рег у больных, получавших иммунотерапию. Это свидетельствует о необходимости проведения дальнейших исследований. Определение подтипов Т-рег может иметь диагностическое и прогностическое значение при КРР. Результаты исследований показали, что Т-рег следует рассматривать как перспективные клетки-мишени в стратегии иммунотерапии больных раком толстой кишки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У больных раком толстой кишки в первичном очаге опухолевого роста увеличивается относительное содержание Т-рег. Одновременно с этим уменьшается количество наивных Т-рег и увеличивается относительное содержание дифференцированных лимфоцитов данного типа. В опухолевом микроокружении при КРР растет количество Т-рег, экспрессирующих индуцируемый костимулятор Т-лимфоцитов ICOS, а также одновременно экспрессирующих как костимулирующую молекулу ICOS, так и коингибирующий рецептор PD-1.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Siegel R.L., Wagle N.S., Cercek A. et al. Colorectal cancer statistics. CA Cancer J Clin 2023;73(3):233–54. DOI: 10.3322/caac.21772
2. Xie Y.H., Chen Y.X., Fang J.Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. Signal Transduct Target Ther 2020;5(1):1–30. DOI: 10.1038/s41392-020-0116-z
3. Plitas G., Rudensky A.Y. Regulatory T cells in cancer. Ann Rev Cancer Biol 2020;4(1):459–77. DOI: 10.1146/annurev-cancerbio-030419-033428
4. Sakaguchi S., Mikami N., Wing J.B. et al. Regulatory T cells and human disease. Ann Rev Immunol 2020;38(1):541–66. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042718-041717
5. Savage P.A., Klawon D.E., Miller C.H. Regulatory T cell development. Ann Rev Immunol 2020;38(1):421–53. DOI: 10.1146/annurev-immunol-100219-020937
6. Dikiy S., Rudensky A.Y. Principles of regulatory T cell function. Immunity 2023;56(2):240–55. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.01.004
7. Grover P., Goel P.N., Greene M.I. Regulatory T cells: regulation of identity and function. Front Immunol 2021;12:750542. DOI: 10.3389/fimmu.2021.750542
8. Mahnke Y.D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. Clin Lab Med 2007;27(3):469–85. DOI: 10.1016/j.cll.2007.05.002
9. Ambada G.N., Ntsama C.E., Nji N.N. et al. Phenotypic characterization of regulatory T cells from antiretroviral-naïve HIV-1-infected people. Immunology 2017;151(4):405–16. DOI: 10.1111/imm.12738
10. Куприянов С.В., Синицкий А.И., Долгушин И.И. Разнообразие субпопуляций регуляторных Т-клеток. Бюллетень сибирской медицины 2020;19 (3):144–55. DOI: 10.20538/1682- 0363-2020-3-144-155
Kupriyanov S.V., Sinitsky A.I., Dolgushin I.I. Diversity of regulatory T cell subpopulations. Byulleten' sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine 2020;19 (3):144–55. (In Russ.). DOI: 10.20538/1682-0363-2020-3-144-155
11. Itahashi K., Irie T., Nishikawa H. Regulatory T-cell development in the tumor microenvironment. Eur J Immunol 2022;52(8):1216–27. DOI: 10.1002/eji.202149358
12. Fang R., Xie C., Long Y. et al. Significance of peripheral blood Tregs in tumor: a narrative review. Ann Blood 2020;5:34. DOI: 10.21037/aob-20-53
13. Yang Z.Z., Kim H.J., Wu H. et al. TIGIT expression is associated with T-cell suppression and exhaustion and predicts clinical outcome and anti-PD-1 response in follicular lymphoma. Clin Cancer Res 2020;26(19):5217–31. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0558
14. Banerjee H., Nieves-Rosado H., Kulkarni A. et al. Expression of Tim-3 drives phenotypic and functional changes in Treg cells in secondary lymphoid organs and the tumor microenvironment. Cell Rep 2021;36(11):109699. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109699
15. Karim R., Jordanova E.S., Piersma S.J. et al. Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1+ T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma. Clin Cancer Res 2009;15(20):6341–7. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1652
16. Kamada T., Togashi Y., Tay C. et al. PD-1+ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(20):9999–10008. DOI:10.1073/pnas.1822001116.
17. Dong Y., Han Y., Huang Y. et al. PD-L1 Is expressed and promotes the expansion of regulatory T cells in acute myeloid leukemia. Front Immunol 2020;11:1710. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01710
18. Yoshida K., Okamoto M., Sasaki J. et al. Anti-PD-1 antibody decreases tumour-infiltrating regulatory T cells. BMC Cancer 2020;20(1):25. DOI: 10.1186/s12885-019-6499-y
19. Van Gulijk M., van Krimpen A., Schetters S. et al. PD-L1 checkpoint blockade promotes regulatory T cell activity that underlies therapy resistance. Sci Immunol 2023;8(83):6173. DOI: 10.1126/sciimmunol.abn6173
20. Li D.Y., Xiong X.Z. ICOS+ Tregs: a functional subset of Tregs in immune diseases. Front Immunol 2020;11:2104. DOI: 10.3389/fimmu.2020.02104
21. Suzuki S., Ogawa T., Sano R. et al. Immune-checkpoint molecules on regulatory T-cells as a potential therapeutic target in head and neck squamous cell cancers. Cancer Sci 2020;111(6):1943–57. DOI: 10.1111/cas.14422
22. Toker A., Nguyen L.T., Stone S.C. et al. Regulatory T cells in ovarian cancer are characterized by a highly activated phenotype distinct from that in melanoma. Clin Cancer Res 2018;24(22):5685–96. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-055
23. Han Y., Dong Y., Yang Q. et al. Acute myeloid leukemia cells express ICOS ligand to promote the expansion of regulatory T cells. Front Immunol 2018;9:2227. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02227
24. Nagase H., Takeoka T., Urakawa S. et al. ICOS+ Foxp3+ TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with *Helicobacter pylori*. Int J Cancer 2017;140(3):686–95. DOI: 10.1002/ijc.30475

25. Liu X., Yu H., Yan C. et al. Plasmacytoid dendritic cells and ICOS+ regulatory T cells predict poor prognosis in gastric cancer: a pilot study. J Cancer 2019;10(26):6711–5. DOI: 10.7150/jca.34826

26. Liu X., Wu S., Yang Y. et al. The prognostic landscape of tumor-infiltrating immune cell and immunomodulators in lung cancer. Biomed Pharmacother 2017;95:55–61. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.003

Вклад авторов

В.В. Крюкова: разработка концепции исследования, забор материала для исследования, статистическая обработка результатов, анализ данных, написание текста статьи, редактирование, подготовка иллюстративного материала;
В.Л. Цепелев: анализ данных, написание текста статьи, редактирование, научное руководство;
П.П. Терешков: проведение цитометрического исследования, анализ данных, редактирование.

Authors’ contributions

V.V. Kryukova: developing a research concept, conducting research, data analysis, article writing, editing, preparation of illustrative material;
V.L. Tsepelev: data analysis, article writing, editing, scientific guidance;
P.P. Tereshkov: carrying out cytometric examination, data analysis, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.В. Крюкова / V.V. Kryukova: https://orcid.org/0009-0008-2228-3351
В.Л. Цепелев / V.L. Tsepelev: https://orcid.org/0000-0002-2166-5154
П.П. Терешков / P.P. Tereshkov: https://orcid.org/0000-0002-8601-3499

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

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России в рамках утвержденного плана научно-исследовательской работы.
Funding. The study was conducted with the financial support of the Chita State Medical Academy, Ministry Health of Russia within the framework of the approved research plan.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (протокол № 98 от 11.11.2019).
Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study was approved by the local ethics committee of the Chita State Medical Academy, Ministry of Health of Russia (protocol No. 98 dated 11.11.2019).
All patients signed informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 04.07.2025. **Принята к публикации:** 29.08.2025. **Опубликована онлайн:** 10.12.2025.
Article submitted: 04.07.2025. **Accepted for publication:** 29.08.2025. **Published online:** 10.12.2025.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-109-124

Гиперэкспрессия АВС-транспортеров в гастроинтестинальных стромальных опухолях как один из механизмов развития вторичной химиорезистентности

Ф.Ф. Бикиниева[1], П.Д. Дунаев[1], А.Р. Галембикова[1], Т.В. Гессель[1], П.Б. Копнин[2], Э.С. Егорова[3], С.А. Рыжкин[4, 5], С.В. Бойчук[1, 3–5]

[1]ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 49;
[2]Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;
[3]Центральная научно-исследовательская лаборатория ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 49;
[4]ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1;
[5]Отделение медицинских и биологических наук Академии наук Республики Татарстан; Россия, 420111 Казань, ул. Баумана, 20

Контакты: Сергей Васильевич Бойчук *boichuksergei@mail.ru*

Введение. АВС-транспортеры (АТФ-связывающие кассетные транспортеры) – класс мембранных транспортерных белков, играющих большую роль во многих физиологических процессах, таких как усвоение питательных веществ, секреция сигнальных молекул и токсинов, а также в развитии множественной лекарственной устойчивости. Главные представители АВС-транспортеров Р-гликопротеин (P-gp, MDR1), BCRP и MRP1 способствуют возникновению лекарственной устойчивости к химио- и таргетной терапии при многих типах злокачественных опухолей. Роль данных белков в механизмах вторичной резистентности гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) к таргетной терапии иматиниба мезилатом (ИМ) является одним из неизученных вопросов современной онкологии.

Цель исследования – оценка экспрессии АВС-транспортеров (ABCB1/MDR1, ABCC1/MRP1 и ABCG2/BCRP), внутриклеточного содержания их флуоресцентных субстратов, а также маркеров стволовости в чувствительных к ИМ и резистентных к нему клеточных линиях ГИСО и их роли в резистентности к химиопрепаратам.

Материалы и методы. Исследование проводили с использованием 3 клеточных линий ГИСО, чувствительных (ГИСО Т-1) и резистентных (ГИСО Т-1R и ГИСО 430) к ИМ. В качестве положительного контроля гиперэкспрессии АВС-транспортеров на опухолевых клеточных линиях применена ранее полученная нами сублиния трижды негативного рака молочной железы HCC1806 Tx-R с доказанной гиперэкспрессией АВС-транспортеров.

Результаты. Доказана повышенная экспрессия некоторых АВС-транспортеров (MRP1, ABCG2 и MDR1) в ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО 430. Результатом этого стало значимое увеличение экскреции их флуоресцентного субстрата родамина 123 по сравнению с ИМ-резистентной клеточной линией ГИСО Т-1R. В то же время в присутствии ингибиторов P-gp (циклоспорина А и тариквидара), а также MRP1 (MK571) происходило значимое повышение количества родамин-положительных клеток. Аналогичная закономерность выявлена для некоторых химиопрепаратов, обладающих автофлуоресцентной активностью. Так, обнаружено повышение интенсивности их флуоресценции в присутствии соответствующих ингибиторов АВС-транспортеров, свидетельствовавшее об увеличении их внутриклеточной концентрации в ГИСО 430. При этом доказана экскреция доксорубицина из клеток ГИСО исключительно белком MRP1, в то время как митоксантрон «откачивался» из клеток преимущественно P-gp. Результатом гиперэкспрессии данных транспортеров в клетках ГИСО 430 явилась их резистентность к вышеуказанным препаратам, о чем свидетельствовало 4- и 5-кратное увеличение значений полумаксимальных ингибирующих концентраций (IC_{50}) для доксорубицина и митоксантрона соответственно в отношении клеток ГИСО 430 по сравнению с клеточной линией ГИСО Т-1R. На основании результатов экспрессии маркеров стволовости (CD44 и CD133), а также колониеобразования, доказательств наличия пула клеток с фенотипом стволовости в клеточной линии ГИСО 430 получено не было.

Заключение. Одним из механизмов вторичной резистентности клеток линии ГИСО 430 к химиопрепаратам является гиперэкспрессия АВС-транспортеров (MRP1, ABCG2 и MDR1), не связанных с наличием в опухолевой линии клеток с фенотипом стволовости.

Ключевые слова: гастроинтестинальная стромальная опухоль, вторичная резистентность, химиорезистентность, стволовая клетка, ABC-транспортер, доксорубицин, родамин 123, митоксантрон, альдегиддегидрогеназа, CD133, CD44

Для цитирования: Бикиниева Ф.Ф., Дунаев П.Д., Галембикова А.Р. и др. Гиперэкспрессия ABC-транспортеров в гастроинтестинальных стромальных опухолях как один из механизмов развития вторичной химиорезистентности. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(4):109–24.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-109-124

Overexpression of ABC transporters in gastrointestinal stromal tumors as one of the mechanisms for the development of secondary chemoresistance

F.F. Bikinieva[1], P.D. Dunaev[1], A.R. Galembikova[1], T.V. Gessel[1], P.B. Kopnin[2], E.S. Egorova[3], S.A. Ryzhkin[4, 5], S.V. Boichuk[1, 3–5]

[1]Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 49 Butlerova St., Kazan 420012, Russia;
[2]Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia;
[3]Central Research Laboratory, Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 49 Butlerova St., Kazan 420012, Russia;
[4]Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 Barricadnaya St., Moscow 125993, Russia;
[5]Department of Medical and Biological Sciences, Tatarsran Academy of Sciences; 20 Baumana St., Kazan 420111, Russia

Contacts: Sergei Vasilyevich Boichuk *boichuksergei@mail.ru*

Introduction. ABC transporters (ATP-binding cassette transporters) are a class of membrane transporter proteins that play a crucial role in various physiological processes, including nutrient uptake, the secretion of signaling molecules, and the elimination of toxins. In addition to the above physiological functions, these proteins play a crucial role in the development of multidrug resistance in malignant neoplasms, thereby contributing to the progression of the disease. The main types of ABC transporters, for which their clinical significance in the development of drug resistance to chemotherapy and targeted therapy in many malignant neoplasms has been proven, include P-glycoprotein (P-gp, MDR1), BCRP and MRP1. However, the role of these proteins in the pathogenesis of gastrointestinal stromal tumors (GIST) and the formation of their resistance to chemotherapy is poorly understood.

Aim. To assess the expression of ABC transporters (ABCB1/MDR1, ABCC1/MRP1, and ABCG2/BCRP), the intracellular content of their fluorescent substrates, and stemness markers in imatinib mesylate (IM) sensitive and resistant GIST cell lines, and their role in resistance to chemotherapy.

Materials and methods. The study was conducted using GIST cell lines sensitive (GIST T-1) and resistant (GIST T-1R and GIST 430) to IM. As a positive control for the overexpression of ABC transporters in tumor cell lines, we utilized the previously obtained subline of triple-negative breast cancer HCC 1806 Tx-R, which has been proven to exhibit overexpression of ABC transporters.

Results. We observed the increased expression of some ABC transporters (MRP1, ABCG2, and MDR1) in the IM-resistant GIST 430 cell line. This resulted in a significant increase in the excretion of their fluorescent substrate rhodamine 123 compared to the IM-resistant GIST T-1R cell line. At the same time, in the presence of P-gp inhibitors (cyclosporine A and tariquidar), as well as MRP1 (MK-571), there was a significant increase in the number of rhodamine-positive cells. A similar pattern was observed for some chemotherapeutic agents exhibiting autofluorescent activity, specifically an increase in the intensity of their fluorescence in the presence of corresponding ABC transporter inhibitors, indicating an increase in their intracellular concentration in GIST 430. Moreover, for doxorubicin, its excretion from GIST cells was proven exclusively by MRP1 protein, while mitoxantrone was "pumped out" from cells mainly through P-gp. The result of hyperexpression of these transporters in GIST 430 cells was their resistance to the drugs mentioned above, as evidenced by a 4- and 5-fold increase in the values of half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) for doxorubicin and mitoxantrone, respectively, in relation to GIST 430 cells compared to the GIST T-1R cell line. Based on the results of expression of stemness markers (CD44 and CD133) and colony formation, no evidence of the presence of a pool of cells with a stemness phenotype in the GIST 430 cell line was obtained.

Conclusion. One of the mechanisms of secondary resistance of GIST 430 cells to chemotherapy is the hyperexpression of ABC transporters (MRP1, ABCG2, and MDR1), which is not associated with the presence of cells with a stemness phenotype in this cell line.

Keywords: gastrointestinal stromal tumor, secondary resistance, chemoresistance, stem cell, ABC transporter, doxorubicin, rhodamine 123, mitoxantrone, aldehyde dehydrogenase, CD133, CD44

For citation: Bikinieva F.F., Dunaev P.D., Galembikova A.R. et al. Overexpression of ABC transporters in gastrointestinal stromal tumors as one of the mechanisms for the development of secondary chemoresistance. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(4):109–24. (In Russ.).
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-109-124

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что большинство гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) характеризуется экспрессией c-KIT (CD117) и наличием активирующих мутаций, локализованных либо в одноименном гене, либо, реже, в гене *PDGFRA*. Несмотря на то что иматиниба мезилат (ИМ) обеспечивает частичный ответ или стабилизацию заболевания у 80 % пациентов с ГИСО даже на поздней стадии заболевания, полный и продолжительный терапевтический ответ встречается в редких случаях из-за развития резистентности к препарату.

В настоящее время в литературе описано довольно большое количество механизмов формирования вторичной резистентности ГИСО к ИМ, среди которых в первую очередь выделяют вторичные мутации в генах *KIT* или *PDGFRA* [1–3] и активацию многочисленных альтернативных сигнальных путей, обеспечивающих выживаемость опухолевых клеток и сохранение их высокого пролиферативного потенциала на фоне ингибирования KIT- или PDGFRA-сигнальных путей [4–7]. Другим фактором, способствующим развитию вторичной резистентности многих разновидностей злокачественных опухолей к химиопрепаратам, может являться усиление их экскреции из опухолевых клеток за счет усиленной активности ABC-транспортеров [8, 9]. В частности, показано, что винкаалкалоиды, антрациклины, эпиподофиллотоксины и таксаны являются субстратами преимущественно для ABCB1, в то время как «откачка» топотекана и иринотекана из опухолевых клеток осуществляется в основном через ABCG2 [10, 11]. Помимо вышеуказанных классических химиопрепаратов, нарушающих метаболизм опухолевых клеток и/или обладающих довольно неспецифическим ДНК-повреждающим действием, вызывающим гибель опухолевых клеток по механизму апоптоза вследствие невозможности репарации данных повреждений ДНК, таргетные препараты также могут выступать в качестве субстратов для ABC-транспортеров. Например, резистентность опухолевых клеток у пациентов с хроническим миелолейкозом к таргетному препарату ИМ может являться следствием гиперэкспрессии P-гликопротеин (P-gp, MDR1), что снижает внутриклеточную концентрацию данного препарата в клетках опухоли и обеспечивает формирование их резистентности [12–15]. В то же время ИМ может оказывать ингибирующее влияние на активность некоторых ABC-транспортеров, что приводит к задержке химиопрепаратов (например, паклитаксела, доксорубицина) и восстанавливает чувствительность клеток к этим лекарственным средствам [16, 17]. Подобный офф-таргетный эффект в отношении ABC-транспортеров не является специфичным для ИМ и описан в отношении многих ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) (как рецепторных, так и нерецепторных) [18].

Гиперэкспрессия ABC-транспортеров в раковых стволовых клетках (СК) также является одним из факторов их резистентности к химиопрепаратам [19–21], поэтому обнаружение повышенной экспрессии данных транспортеров в опухолях может являться косвенным признаком наличия в них клеток с фенотипом стволовости и обусловливать прогрессирование заболевания на фоне проводимой химиотерапии.

В связи с вышеизложенным представляют интерес изучение уровня экспрессии основных типов ABC-транспортеров в ИМ-резистентных клеточных линиях ГИСО и в случае обнаружения их гиперэкспресии оценка их роли в экскреции химиопрепаратов и формировании химиорезистентности ГИСО. Одной из задач исследования являлось определение маркеров стволовости в ИМ-резистентных клеточных линиях ГИСО.

Цель исследования – оценка экспрессии ABC-транспортеров (ABCB1/MDR1, ABCC1/MRP1 и ABCG2/BCRP), внутриклеточного содержания их флуоресцентных субстратов, а также маркеров стволовости в чувствительных к ИМ и резистентных к нему клеточных линиях ГИСО и их роли в резистентности к химиопрепаратам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии и условия их культивирования. В исследовании использовались опухолевые клеточные линии ГИСО Т-1, ГИСО Т-1R, ГИСО 430 и HCC 1806 Tx-R. Их характеристика представлена в табл. 1.

Клеточные линии ГИСО Т-1, ГИСО Т-1R и HCC 1806 Tx-R культивировали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10–15 % эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США), 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Культуральная среда для клеточной линии ГИСО 430 также содержала экстракт бычьего гипофиза (bovine pituitary extract, BPE) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) и биодобавку MITO+ (Corning, США). Все клеточные линии культивировали в условиях CO_2-инкубатора (LamSystems, Россия), поддерживающего уровень CO_2 в пределах 5 % и температурный режим – 37 °C.

Антитела и химические соединения. В исследовании использованы химиопрепараты доксорубицин (S1208; Selleck Chemicals, США) и митоксантрон (70476-82-3; Sigma-Aldrich, Merck, Германия), а также ингибиторы ABC-транспортеров тариквидар, циклоспорин А, Ko-143 и MK-571 (Selleck Chemicals, США). Все химические соединения были растворены в диметилсульфоксиде (ДМСО) в соответствии с рекомендациями производителя.

Для вестерн-блот-анализа использовали первичные антитела к ABCG2 (sc-58222; Santa Cruz, США), ABCB1/MDR-1 (sc-55510; Santa Cruz, США), BCRP1/MRP1 (ab260038; Abcam, США) и к β-актину-HRP (A00730-200; GenScript, США). Для детекции применяли вторичные антитела (sc-2004 и sc-2005; Santa Cruz, США).

Таблица 1. *Характеристика клеточных линий гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО), использованных в исследовании*

Table 1. *Characteristic of the gastrointestinal stromal tumors (GIST) cell lines used in the study*

Клеточная линия Cell line	Происхождение Origin	Мутационный статус Mutational status	Источник Reference
ГИСО Т-1 GIST T-1	Линия, полученная из метастаза ГИСО человека Line derived from human GIST metastasis	Первичная мутация в виде делеции 57 оснований (V570-Y578) в 11-м экзоне гетерозиготного гена *KIT* Primary mutation in the form of deletion of 57 bases (V570-Y578) in exon 11 of heterozygous *KIT*	[22]
ГИСО Т-1R GIST T-1R	Сублиния, полученная при длительном культивировании клеток ГИСО Т-1 в присутствии постепенно возрастающих концентраций иматиниба мезилата (ИМ) Subline obtained by long-term culturing of GIST T-1 cell in the presence of gradually increasing concentrations of imatinib mesylate (IM)	Вторичных мутаций в гене *KIT* не обнаружено No secondary *KIT* mutations were detected	[23]
ГИСО 430 GIST 430	Линия, полученная из метастаза ГИСО человека после терапии ИМ Line derived from human GIST metastasis after IM therapy	Первичная гетерозиготная мутация в 11-м экзоне гена *KIT* (V560_L576del) и вторичная гетерозиготная миссенс-мутация в 13-м экзоне гена *KIT* (V654A) Primary heterozygous mutation in *KIT* exon 11 (V560_L576del) and secondary heterozygous missense mutation in *KIT* exon 13 (V654A)	[4]
HCC 1806 Tx-R	Сублиния, полученная при длительном культивировании клеточной линии трижды негативного рака молочной железы HCC 1806 в присутствии постепенно возрастающих концентраций паклитаксела Subline obtained by long-term culturing of triple negative breast cancer HCC1806 cell line in the presence of gradually increasing concentrations of paclitaxel	–	[24]

Вестерн-блот-анализ. Образцы для иммуноблоттинга готовили путем лизирования клеток, достигших конфлюэнтности в пределах 90–100 %. Для лизирования клеток использовали буфер RIPA (25 мм Tris-HCl; pH 7,6; 150 мм NaCl; 5 мм этилендиаминтетрауксусной кислоты; 1 % NP-40; 1 % дезоксихолата натрия; 0,1 % натрия додецилсульфата с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз. Клеточные лизаты инкубировали в течение 20 мин при температуре 4 °C, а затем осаждали центрифугированием в течение 30 мин при 13 000 об/мин при температуре 4 °C. Нормализацию содержания белка в исследуемых образцах проводили с помощью набора BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Для электрофореза образцы, содержащие 30 мкг белка, погружали в 3–8 % трис-ацетатный гель NuPAGE (Invitrogen, США), переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США), инкубировали со специфическими антителами и выполняли детекцию с использованием хемилюминесцентной реакции (реагент Western Lightning Plus-ECL, США). Денситометрический анализ изображений, полученных методом вестерн-блоттинга, проводили с помощью программного обеспечения NIH Image J (Bethesda, США).

Проточная цитометрия. Для анализа интенсивности флуоресценции субстратов для ABC-транспортеров, а также экспрессии маркеров стволовости методом проточной цитометрии клетки предварительно обрабатывали трипсином для получения клеточной суспензии и осаждали центрифугированием (1500 об/мин – 3 мин). После отмыва клетки (1×10^6 клеток/мл) ресуспензировали в холодном фосфатном буфере с добавлением 1 % эмбриональной телячьей сыворотки. Оценку экспрессии маркеров стволовости проводили путем окрашивания клеток моноклональными антителами к CD133 (372810; Biolegend, США) и CD44 (338808; Biolegend, США) в течение 30 мин при 37 °C.

Для оценки функциональной активности ABC-транспортеров использовали автофлуоресцирующие субстраты: родамин 123 (62669 70-9, № 275545; Abcam, США), доксорубицин и митоксантрон. После обработки клеток трипсином их ресуспензировали

Таблица 2. *Праймеры для количественной полимеразной цепной реакции*

Table 2. *Primers for quantitative polymerase chain reaction*

Ген Gene	Прямой праймер Forward primer	Обратный праймер Reverse primers
GAPDH	GACCACAGTCCATGCCATCA	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
ALDH1A1	TGTTAGCTGATGCCGACTTG	TTCTTAGCCCGCTCAACACT
ALDH1A2	TGATCCTGCAAACACTGCTC	CTGGAGCTGGGTGGTAAGAG
ALDH1A3	TCTCGACAAAGCCCTGAAGT	TATTCGGCCAAAGCGTATTC
ALDH1B1	CTGGAGCTGGGTGGTAAGAG	CTTTCTCCACGGTTCTCTCG
ALDH1L2	GCCTGGTCTCGTTACCAAAA	GCCACTTTCACCTCTTCAGC
SOX2	CGAGTGGAAACTTTGTCGGA	TGTGCAGCGCTCGCAG

в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS). В дальнейшем добавляли родамин 123 в концентрации 3 мкМ и инкубировали 1 ч при 37 °C. Далее клетки отмывали холодным PBS и повторно инкубировали в присутствии ингибиторов ABC-транспортеров (тариквидара, циклоспорина A, Ko-143, MK-571) в концентрации 1 мкМ и без их добавления (контроль) при той же температуре в течение 2 ч. Оценка внутриклеточного накопления двух других субстратов (доксорубицина или митоксантрона) проводилась после инкубации клеток с добавлением 10 мкМ вышеуказанных ингибиторов ABC-транспортеров [25] (2 ч, 37 °C) и без их добавления (контроль), с последующей заменой питательной среды на новую с добавлением 40 мкМ доксорубицина или митоксантрона [26, 27] (1 ч, 37 °C), с дальнейшей заменой питательной среды на новую с добавлением 10 мкМ ингибиторов ABC-транспортеров (2 ч, 37 °C). Далее клетки обрабатывали трипсином и осаждали центрифугированием (1500 об/мин – 5 мин) (центрифуга Liston C2204, Россия). Клеточную суспензию промывали, растворяли в холодном PBS в объеме 500 мкл и анализировали на проточном цитометре BD FACSCanto II (Becton Dickinson Biosciences, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva 7.0.

Анализ колониеобразования. Для проведения анализа колониеобразования в адгезивных условиях клетки высевали в количестве 500 клеток на чашку Петри p100, инкубировали 12–14 сут, фиксировали 70 % этанолом и окрашивали красителем Гимза («ПанЭко», Россия). Количество и размер колоний рассчитывали с помощью программы Total Lab v2.0 с использованием модуля Colony Counter (Nonlinear Dynamics).

Количественная полимеразная цепная реакция. Клетки линий ГИСО Т-1, ГИСО Т-1R и ГИСО 430 культивировали в чашках Петри p100, после достижения 100 % конфлюентности обрабатывали трипсином, переносили в 15 мл пробирку, осаждали центрифугированием 1500 об/мин 3 мин (центрифуга Liston C2204, Россия) и трижды отмывали холодным PBS. Реагент тризол (BC032; Thermo Fisher Scientific, США) использовали для выделения общей РНК в соответствии с протоколом производителя и повторно суспензировали в воде без РНКаз (Qiagen, США). РНК подвергали обратной транскрипции в комплементарную ДНК (кДНК) с использованием обратной транскриптазы вируса мышиного лейкоза Молони (SK021; Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя и далее проводили количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Для нее использовали в общей сложности 1 мкл матричной кДНК с 5-кратным qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) и прямым и обратным праймерами (по 10 ммоль каждого). Последовательности праймеров представлены в табл. 2. Условия термоциклирования, использованные в этом исследовании, приведены в опубликованной нами ранее работе [24]. Количественная ПЦР выполнена с использованием системы детекции в реальном времени CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Анализы для каждого опытного образца обработаны параллельно с эталонным геном *GAPDH*, относительные уровни каждой матричной РНК (мРНК) нормализованы относительно *GAPDH*. Затем для расчета относительной экспрессии каждого гена использовали метод ΔΔCt [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На начальном этапе исследования обнаружено, что в ИМ-резистентной линии клеток ГИСО 430, у которых развитие резистентности к ИМ было обусловлено вторичными мутациями в гене *KIT*, имеется значительная популяция клеток с низким уровнем флуоресценции красителя родамина 123 (11,2 %), что может свидетельствовать о его усиленной экскреции из опухолевых клеток. В то же время численность популяции клеток с низким уровнем флуоресценции данного красителя в ИМ-чувствительной клеточной линии ГИСО Т-1 (0,9 %) и ИМ-резистентной сублинии

ГИСО Т-1R (1,2 %) была крайне низкой. Среднее количество клеток с низкой экспрессией родамина 123 в вышеуказанных линиях ГИСО представлено на рис. 1.

С учетом того что родамин 123 является мишенью для основных типов ABC-транспортеров, в том числе ABCB1 (P-gp) и ABCC1 (MRP1) [29–33], снижение интенсивности его флуоресценции в ИМ-резистент-

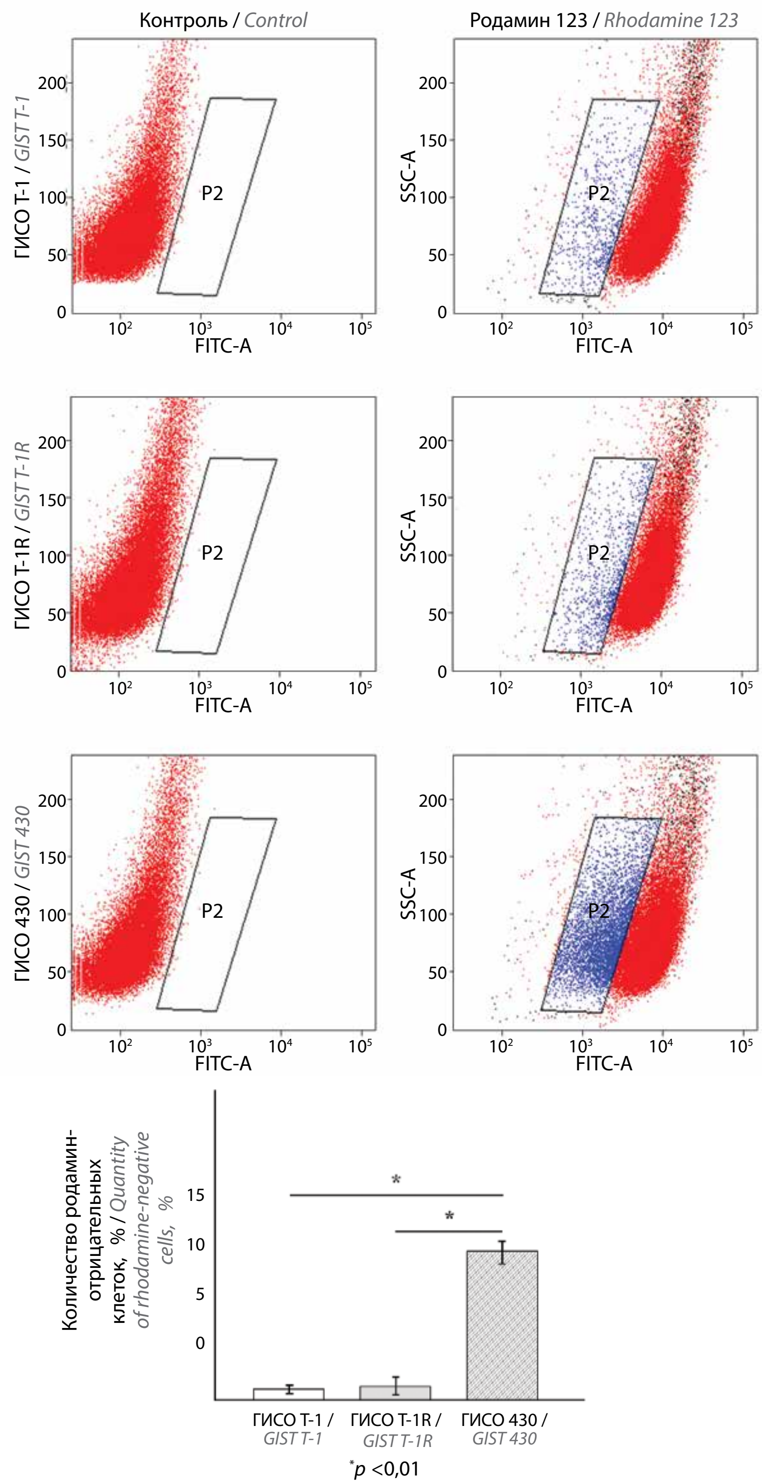
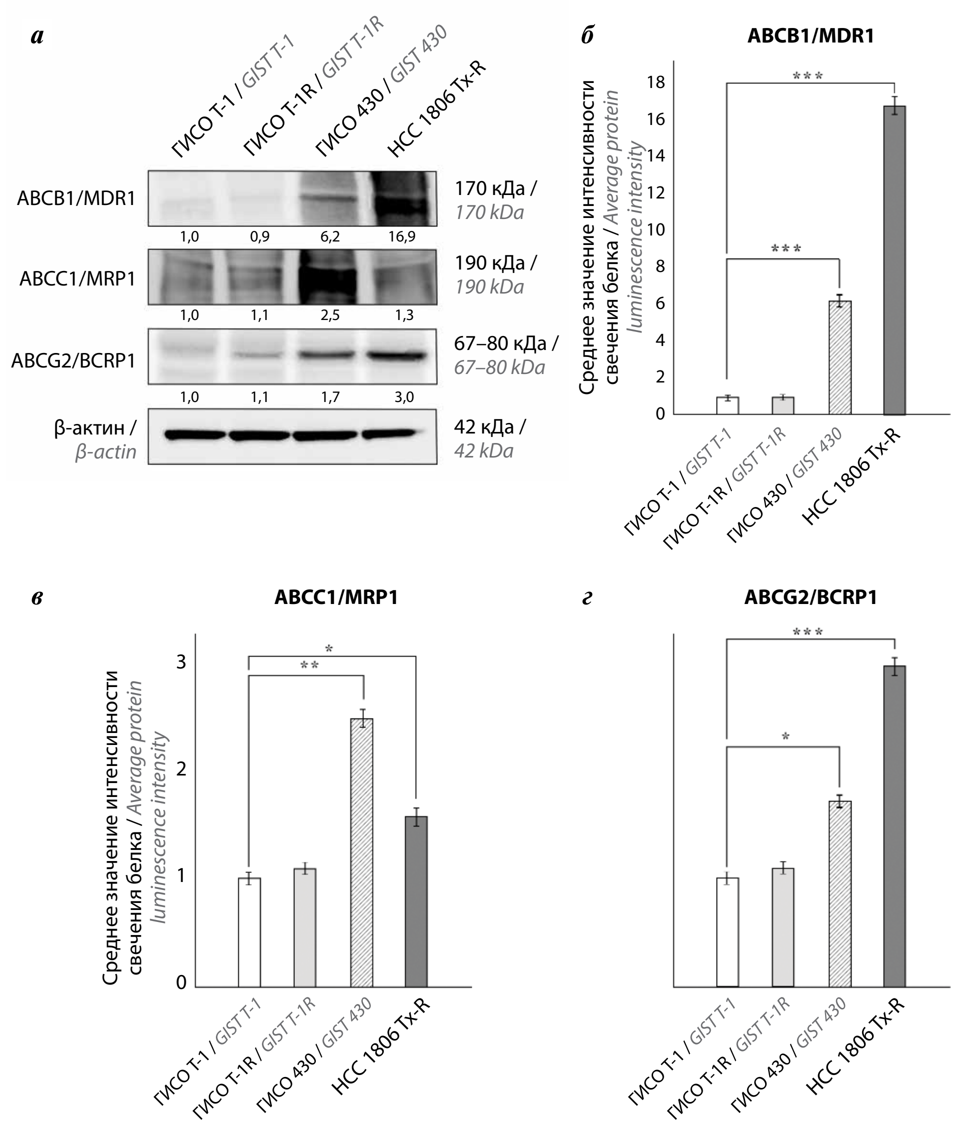


Рис. 1. *Среднее количество клеток с низким уровнем экспрессии флуоресцентного красителя родамина 123 в линиях гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) Т-1, Т-1R и 430. Клетки инкубировали в присутствии родамина 123 (3 мкМ) и без него (контроль) в течение 1 ч. Клетки с низким уровнем флуоресценции родамина 123 выделены в гейт P2 и обозначены синим цветом. SSC-A – площадь бокового светорассеивания; FITC-A – интенсивность флюоресценции флуоресцеин-5-изотиоцианата*

Fig. 1. *Average number of low-level cells with low expression level of the fluorescent dye rhodamine 123 in gastrointestinal stromal tumors (GIST) T-1, T-1R, and 430 lines. The cells were incubated in the presence of rhodamine 123 (3 μM) and without (control) him for 1 hour. Cells with low intensity of rhodamine 123 fluorescence are highlighted in gate P2 and are marked in blue. SSC-A – side scatter area; FITC-A – fluorescein-5-isothiocyanate fluorescence intensity*

ных клетках ГИСО 430 могло быть следствием усиленной экскреции данного красителя через вышеназванные АВС-транспортеры. Для изучения этой возможности проведен анализ уровней экспрессии основных типов АВС-транспортеров, таких как ABCB1/MDR1, ABCC1/MRP1 и ABCG2/BCRP, в вышеуказанных клеточных линиях ГИСО. В качестве положительного контроля использована клеточная сублиния трижды негативного рака молочной железы HCC 1806, резистентная к некоторым химиопрепаратам, в том числе к паклитакселу. Данная сублиния получена в нашей лаборатории при культивировании опухолевых клеток линии HCC 1806 с постепенно увеличивающимися концентрациями паклитаксела, а формирование резистентности к данному химиопрепарату явилось следствием его усиленной экскреции из опухолевых клеток вследствие гиперэкспрессии основных типов АВС-транспортеров [24]. Результаты вестерн-блоттинга, представленные на рис. 2, иллюстрируют гиперэкспрессию всех вышеназванных типов АВС-транспортеров в клеточной линии ГИСО 430, при этом наиболее значимым изменением была гиперэкспрессия MRP1. Экспрессия данных АВС-транспортеров не определялась в ИМ-чувствительной линии ГИСО Т-1. В ИМ-резистентной сублинии ГИСО Т-1R уровень экспрессии всех вышеуказанных транспортеров не отличался от их фоновых значений в материнской линии ГИСО Т-1 (см. рис. 2).



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

Рис. 2. *Экспрессия АВС-транспортеров (ABCB1, ABCC1 и ABCG2) в клеточных линиях гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) Т-1, ГИСО Т-1R, ГИСО 430 и HCC 1806 Tx-R (положительный контроль с высоким уровнем экспрессии АВС-транспортеров). Результаты вестерн-блоттинга (а) и денситометрического анализа экспрессии ABCB1 (б), ABCC1 (в) и ABCG2 (г). β-актин использовался в качестве контроля белковой нагрузки*

Fig. 2. *Expression level of ABC-transporters (ABCB1, ABCC1 и ABCG2) in gastrointestinal stromal tumors (GIST) T-1, T-1R, 430 and HCC 1806 Tx-R (positive control with high ABC-transporters expression) lines. Western blotting results (а) and densitometry analysis of ABCB1 (б), ABCC1 (в) and ABCG2 (г) expression are shown. β-actin was used as protein loading control*

С учетом обнаруженного нами факта гиперэкспрессии основных типов ABC-транспортеров в ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО 430 (см. рис. 2) и значительного снижения интенсивности флуоресценции родамина 123 в определенной популяции данных клеток (см. рис. 1) в дальнейшем проведено изучение механизмов экскреции данного красителя из клеток ГИСО 430, культивированных в присутствии ингибиторов циклоспорина А и тариквидара (ингибиторы P-gp), MK-571 (ингибитор MRP1) и Ko-143 (ингибитор BCRP). В ГИСО 430, культивированных с родамином 123 в отсутствие ингибиторов ABC-транспортеров, численность популяции родамин-отрицательных клеток составила 3,5 %. Данные, представленные на рис. 3 и в табл. 3, свидетельствуют о том, что экскреция данного флуоресцентного субстрата из клеток ГИСО происходит через P-gp, что подтверждено снижением количества опухолевых клеток с низкой экспрессией родамина 123 в присутствии циклоспорина А (1,4 %) и тариквидара (1,8 %). В то же время ингибитор MRP1 (MK-571) не оказывал влияния на количество родамин-отрицательных клеток (3,3 %). Парадоксальный эффект обнаружен в отношении ингибитора BCRP, в присутствии которого происходило примерно 3-кратное увеличение количества клеток с низким уровнем флуоресценции красителя (9,8 %), что могло свидетельствовать о способности Ko-143 стимулировать активность других ABC-транспортеров.

Эксперименты с использованием химиопрепаратов, обладающих свойствами автофлуоресценции, также показали роль вышеуказанных транспортеров в формировании резистентности клеток ГИСО 430 к этим лекарственным средствам путем усиления их экскреции из опухолевых клеток. Например,

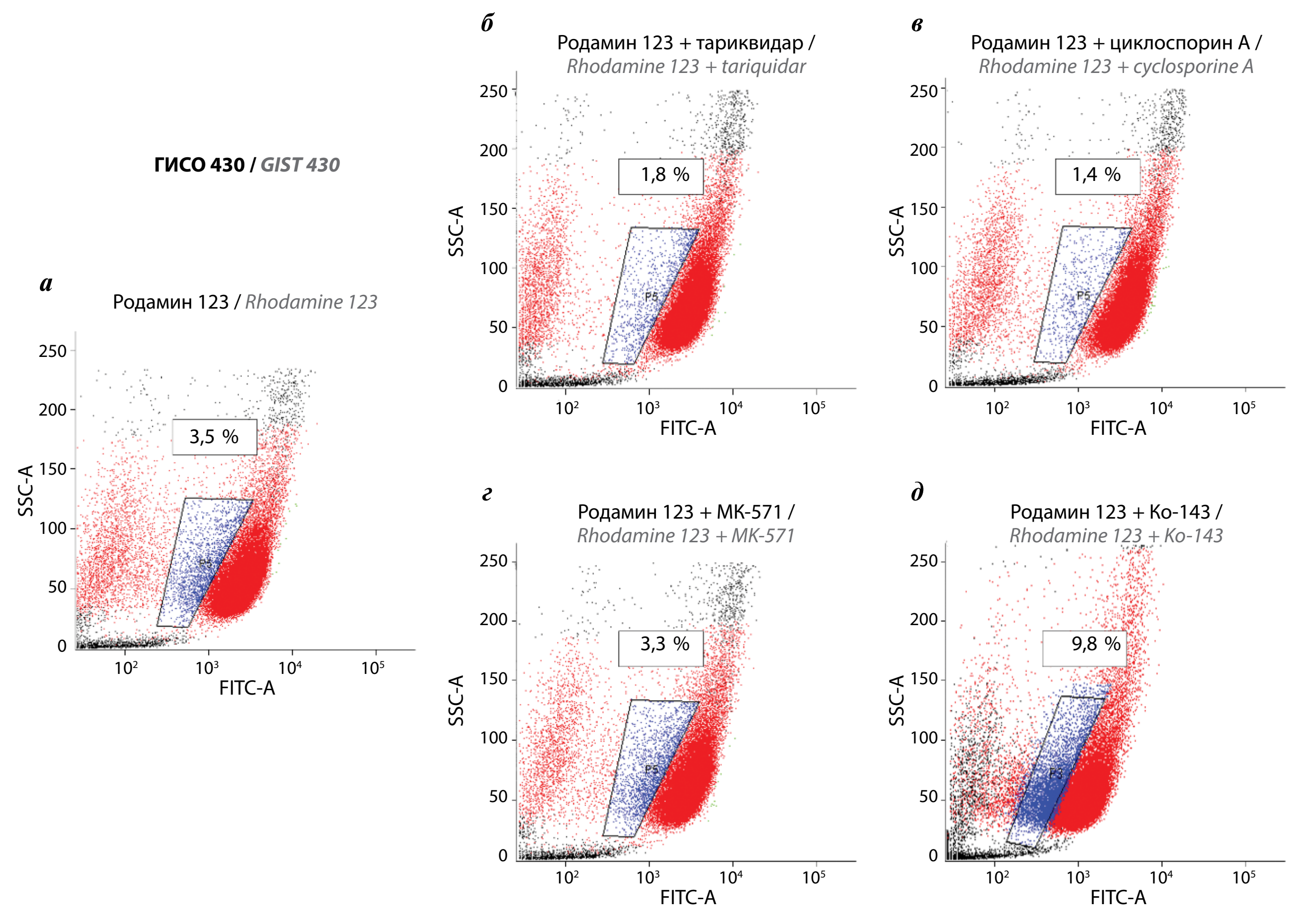


Рис. 3. *Влияние ингибиторов ABC-транспортеров на интенсивность свечения родамина 123 в клетках гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) линии 430 без ингибиторов ABC-транспортеров (а) и в присутствии ингибиторов ABC-транспортеров: тариквидара (б), циклоспорина А (в), MK-571 (г) и Ko-143 (д). Клетки инкубировали в присутствии родамина 123 в концентрации 3 мкМ в течение 1 ч без добавления ингибиторов ABC-транспортеров и с дальнейшим внесением в питательную среду указанных выше ингибиторов (1 мкМ) на 2 ч. Клетки с низким уровнем флуоресценции родамина 123 выделены в гейт P5 и обозначены синим цветом. SSC-A – площадь бокового светорассеивания; FITC-A – интенсивность флюоресценции флуоресцеин-5-изотиоцианата*

Fig. 3. *The effect of ABC-transporters inhibitors on the fluorescence intensity of rhodamine 123 in gastrointestinal stromal tumors (GIST) 430 cell line without ABC transporter inhibitors (control) (а); under the influence of ABC-transporters inhibitors tariquidar (б), cyclosporine A (в), MK-571 (г), Ko-143 (д). The cells were incubated in the presence of rhodamine 123 at a concentration of 3 μM for 1 hour without ABC transporter inhibitors (control) and with the further addition of aforementioned inhibitors (1 μM) for 2 hours. Cells with low level of rhodamine 123 fluorescence are highlighted in gate P5 and are marked in blue. SSC-A – side scatter area; FITC-A – fluorescein-5-isothiocyanate fluorescence intensity*

Таблица 3. *Изменение количества клеток с низким уровнем экспрессии флуоресцентного красителя родамина 123 в клетках гастроинтестинальных стромальных опухолей линии 430 под влиянием ингибиторов ABC-транспортеров*

Table 3. *Change in quantity of cells with low expression level of the fluorescent dye rhodamine 123 in gastrointestinal stromal tumors 430 cell line under influence of ABC-transporters inhibitors*

Группа Group	Количество родамин-отрицательных клеток, % (M ± SD) Quantity of rhodamine-negative cells, % (M ± SD)
Контроль Control	3,5 ± 0,4
Тариквидар Tariquidar	1,8 ± 0,3*
Циклоспорин А Cyclosporine A	1,4 ± 0,1**
МК-571	3,3 ± 0,5
Ко-143	9,8 ± 1,1**

**p <0,05. **p <0,01.*
***Примечание.** M – среднее значение; SD – стандартное отклонение.*
***Note.** M – average; SD – standard deviation.*

внутриклеточное накопление доксорубицина значительно увеличивалось на фоне ингибирования в опухолевых клетках белка MRP1, в то время как ингибиторы P-gp и BCRP не оказывали аналогичного эффекта (рис. 4), что демонстрирует ведущую роль MRP1 в экскреции данного препарата из клеток ГИСО 430 и коррелирует с обнаруженной нами ранее гиперэкспрессией белка MRP1 в этих клетках (см. рис. 2).

В свою очередь, интенсивность флуоресценции митоксантрона в ИМ-резистентных клетках ГИСО 430 усиливалась в присутствии селективного ABCB1-ингибитора тариквидара, в то время как остальные ингибиторы оказывали менее выраженный эффект (рис. 5).

Таким образом, получены доказательства способности различных типов ABC-транспортеров экскретировать доксорубицин и митоксантрон из опухолевых клеток ГИСО. Изменения интенсивности флуоресценции данных химиопрепаратов представлены в табл. 4.

Полученные данные об усилении экскреции доксорубицина и митоксантрона из опухолевых клеток ГИСО 430 коррелировали со значениями их полумаксимальных ингибирующих концентраций (IC_{50}), свидетельствующих о существенном их увеличении по сравнению с клетками ГИСО линии Т-1 (табл. 5).

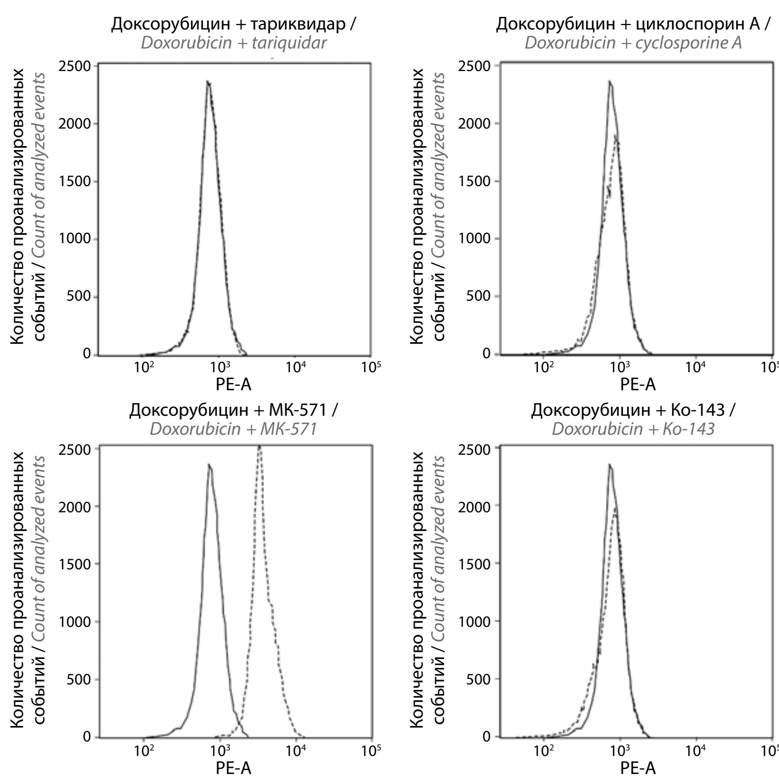


Рис. 4. *Изменение внутриклеточного содержания доксорубицина в клетках гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) линии 430. Показаны интенсивность свечения доксорубицина (40 мкМ) в клетках ГИСО 430, культивированных без (сплошная линия) и в присутствии одного из ингибиторов ABC-транспортеров (пунктирная линия). Ингибиторы ABC-транспортеров тариквидар, циклоспорин А, МК-571 и Ко-143 (10 мкМ) вносили в клеточную культуру на 2 ч до добавления доксорубицина (40 мкМ) и культивировали в течение последующих 3 ч после внесения данного химиопрепарата в клеточную культуру. PE-A – интенсивность флуоресценции фикоэритрина (PE)*

Fig. 4. *Change in intracellular accumulation of doxorubicin in gastrointestinal stromal tumors (GIST) 430 cell line. The intensity of fluorescence of doxorubicin (40 μM) in GIST 430 cells cultured without (solid line) and in presence of inhibitors of ABC-transporters: tariquidar, cyclosporine A, MK-571, Ko-143 (dotted line). The inhibitors of ABC-transporters (10 μM) were introduced in the cell culture for 2 h prior doxorubicin exposure and further cultured in presence of doxorubicin for 3 h. The axis x shows changes in the fluorescence intensity of the chemotherapeutic drug, and the axis y shows the number of analyzed events. PE-A – phycoerythrin (PE) fluorescence intensity*

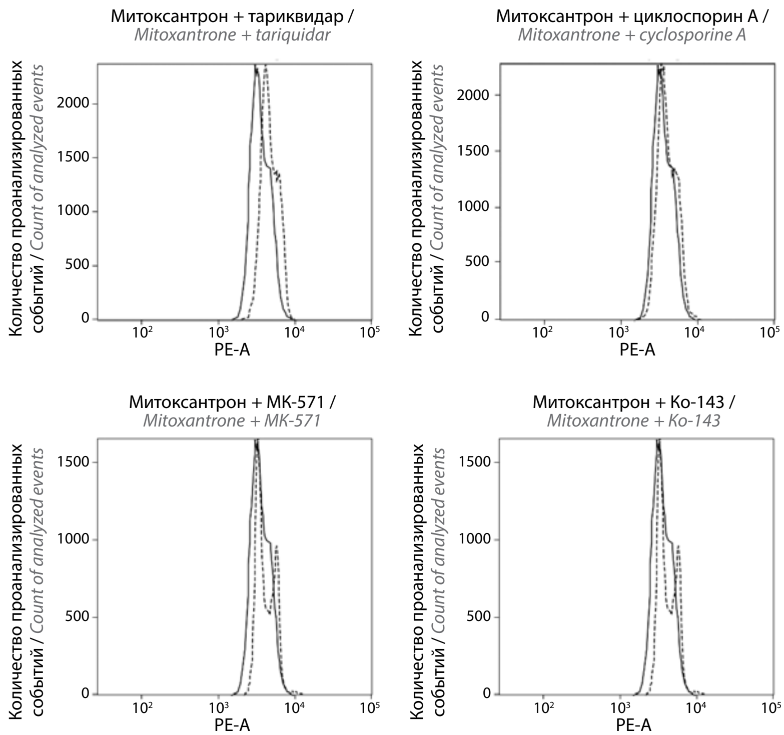


Рис. 5. *Изменение интенсивности свечения митоксантрона (40 мкМ) в клетках гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) линии 430, культивированных без (сплошная линия) и в присутствии одного из ингибиторов ABC-транспортеров (пунктирная линия). Ингибиторы ABC-транспортеров тариквидар, циклоспорин А, МК-571 и Ко-143 (10 мкМ) вносили в клеточную культуру на 2 ч до добавления митоксантрона (40 мкМ) и культивировали в течение последующих 3 ч в присутствии данного химиопрепарата. PE-A – интенсивность флуоресценции фикоэритрина (PE)*

Fig. 5. *Change in Intracellular accumulation of mitoxantrone in gastrointestinal stromal tumors (GIST) 430 cell line. The intensity of fluorescence of mitoxantrone (40 μM) in gastrointestinal stromal tumors (GIST) 430 cell line cultured without (solid line) and in presence of inhibitors of ABC-transporters: tariquidar, cyclosporine A, MK-571, Ko-143 (dotted line). The inhibitors of ABC-transporters (10 μM) were introduced in the cell culture for 2 h prior mitoxantrone exposure and further cultured in presence of mitoxantrone for 3 h. The axis x shows changes in the fluorescence intensity of the chemotherapeutic drug, and the axis y shows the number of analyzed events. PE-A – phycoerythrin (PE) fluorescence intensity*

Таблица 4. *Интенсивность флуоресценции доксорубицина и митоксантрона в клетках гастроинтестинальных стромальных опухолей линии 430, инкубированной в присутствии ингибиторов ABC-транспортеров, среднее значение ± стандартное отклонение*

Table 4. *Fluorescence intensity of doxorubicin and mitoxantrone in gastrointestinal stromal tumors 430 cell line incubated in the presence of ABC-transporters inhibitors, average ± standard deviation*

Группа Croup	Интенсивность флуоресценции доксорубицина Fluorescence intensity of doxorubicin	Интенсивность флуоресценции митоксантрона Fluorescence intensity of mitoxantrone
Контроль Control	888 ± 72	3731 ± 133
Тариквидар Tariquidar	885 ± 74	4810 ± 140*
Циклоспорин А Cyclosporine A	771 ± 69	4188 ± 132**
МК-571	3915 ± 130*	4227 ± 129**
Ко-143	791 ± 81	4141 ± 127**

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

Таким образом, помимо общеизвестных вторичных мутаций в гене *KIT* в клетках ГИСО 430, повышенная экспрессия различных типов ABC-транспортеров также могла явиться причиной их резистентности к таргетному препарату ИМ, что свидетельствует о многообразии молекулярных механизмов резистентности, формирующихся на едином клеточном уровне. К сожалению, на данный момент сравнительная оценка внутриклеточного содержания данного таргетного препарата в ИМ- чувствительных и ИМ-резистентных клеточных линиях ГИСО аналогичным методом не представляется возможной вследствие отсутствия доступных конъюгатов ИМ с флуоресцентыми метками.

С учетом того что обнаруженная нами в линии ГИСО 430 повышенная экспрессия ABC-транспортеров могла быть признаком наличия клеток с признаками стволовости [21, 34], изучена возможность их присутствия в данной клеточной линии.

Поскольку известны способности СК к самообновлению, самоподдержанию и образованию колоний, изучена способность ИМ-резистентных клеточных линий ГИСО 430 и Т-1R к колониеобразованию в присутствии ИМ и без него. Обнаружено увеличение численности колоний в клеточной культуре линии ГИСО 430, которое наблюдалось после внесения ИМ.

Таблица 5. *Значения полумаксимальных ингибирующих концентраций (IC_{50}) этопозида, доксорубицина, митоксантрона в клеточных линиях гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) Т-1, Т-1R и 430 (мкМ) (кратность увеличения IC_{50} относительно ГИСО Т-1)*

Table 5. *Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values for etoposide, doxorubicin and mitoxantrone in gastrointestinal stromal tumors (GIST) T-1, T-1R and 430 cells lines (magnification factor of IC_{50} compared with GIST T-1)*

Препарат Drug	ГИСО Т-1 GIST T-1	ГИСО Т-1R GIST T-1R	ГИСО 430 GIST 430
Этопозид Etoposide	43 ± 1	146 ± 7 (3,4)	101 ± 3 (2,4)
Доксорубицин Doxorubicin	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1 (1,8)	2,4 ± 0,3 (10,0)
Митоксантрон Mitoxantrone	0,1 ± 0,05	1,0 ± 0,2 (7,4)	3,3 ± 0,7 (25,2)

Этот эффект был специфичным для клеток линии ГИСО 430 (рис. 6), что может свидетельствовать о наличии в указанной клеточной линии пула опухолевых клеток с фенотипом стволовости и объяснять повышенный уровень экскреции флуоресцентных субстратов, в том числе родамина 123, и химиопрепаратов доксорубицина и митоксантрона из данных опухолевых клеток по сравнению с ИМ-чувствительными клетками линии Т-1 и ИМ-резистентными клетками сублинии Т-1R.

На заключительном этапе исследований проведен сравнительный анализ экспрессии молекул CD133 и CD44, являющихся маркерами СК различного происхождения [35, 36]. Различий в уровне экспрессии данных молекул между ИМ-чувствительной и ИМ-резистентной линиями Т-1 обнаружено не было (рис. 7), что коррелировало с отсутствием различий в количестве клеток с низким уровнем экспрессии родамина 123 между данными опухолевыми клеточными линиями. Вопреки ожиданиям, уровень экспрессии CD133

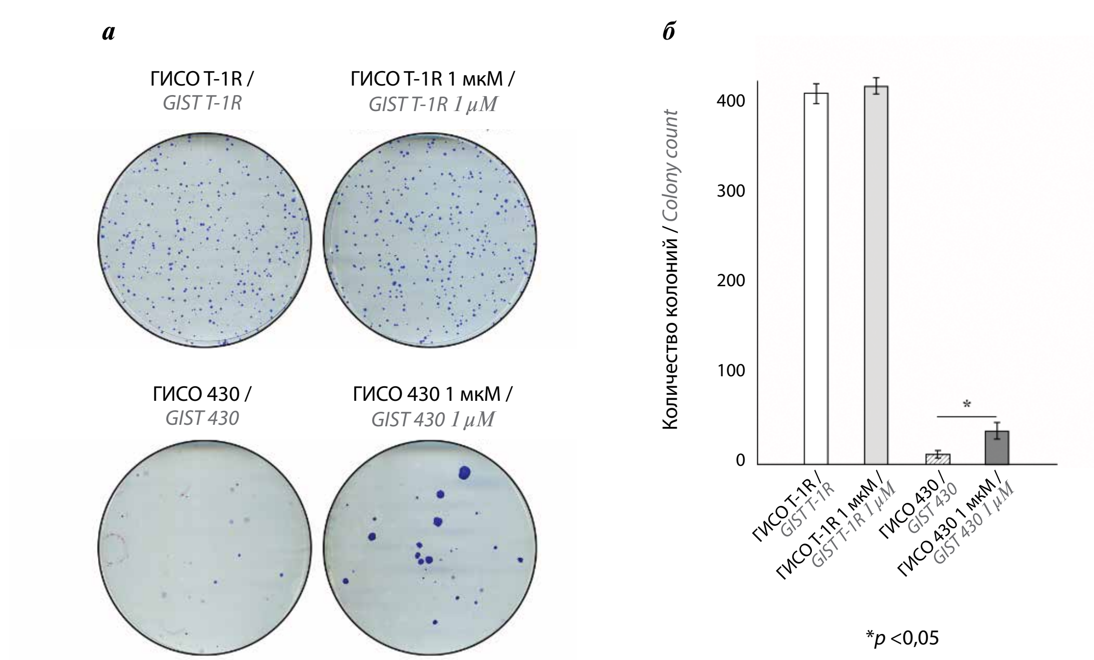


Рис. 6. *Влияние иматиниба мезилата (ИМ) на способность клеточных линий гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) к колониеобразованию: а – колониеобразование в адгезивных условиях клеточных линий ГИСО Т-1R и ГИСО 430. Инкубация клеток с ИМ в концентрации 1 мкМ в течение 48 ч; б – количество сформированных колоний на 500 клеток в клетках ГИСО Т-1R и ГИСО 430, инкубированных в присутствии диметилсульфоксида (контроль) или ИМ (1 мкМ) в течение 48 ч (б)*

Fig. 6. *The effect of imatinib mesylate (IM) on the colony-forming capacity of gastrointestinal stromal tumor (GIST) cell lines: a – colony formation in GIST T-1R and GIST 430 cells. Incubation of cells with IM at a concentration of 1 µM for 48 h; б – quantification of the colonies (500 cells) in GIST T-1R and GIST 430 cells treated with dimethyl sulfoxide (control) or IM (1 µM) for 48 h (б)*

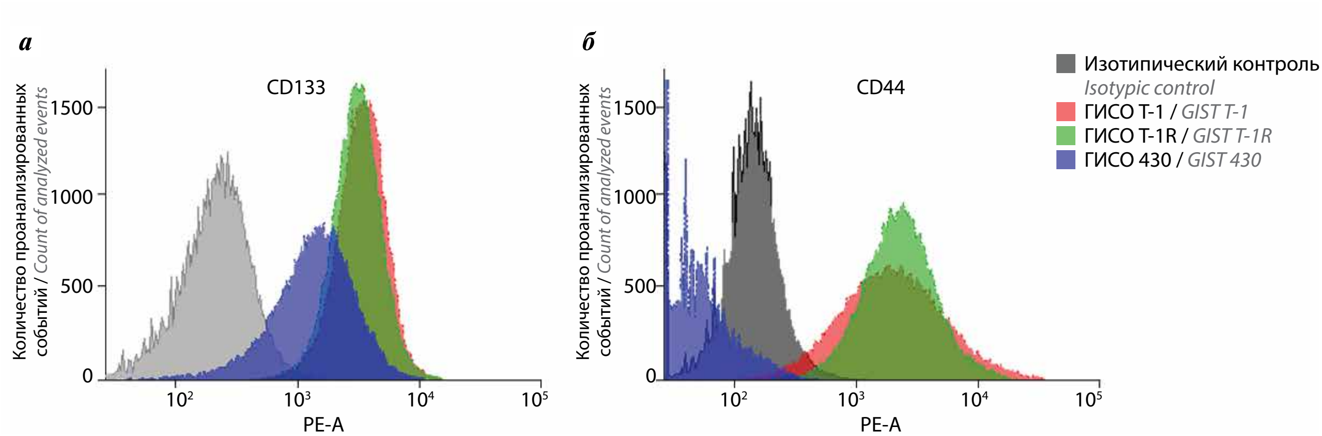


Рис. 7. *Экспрессия маркеров стволовости CD133 (а) и CD44 (б) в клетках гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО). PE-A – интенсивность флуоресценции фикоэритрина (PE)*

Fig. 7. *Expression of CD133 (a) and CD44 (б) stem markers in gastrointestinal stromal tumors (GIST) cells. PE-A – phycoerythrin (PE) fluorescence intensity*

в клеточной линии ГИСО 430 оказался значительно ниже по сравнению с линией ГИСО Т-1 (см. рис. 7, *а*), а экспрессия CD44 отсутствовала (см. рис. 7, *б*). Экспрессия вышеуказанных маркеров СК на 3 клеточных линиях ГИСО представлена в табл. 6.

Помимо этого, не обнаружено значимого повышения уровня экспрессии большинства форм альдегиддегидрогеназы 1-го типа (ALDH1) (*ALDH1A1*, *ALDH1A2*, *ALDH1A3*, *ALDH1B1*, *ALDH1L2*) в клетках ГИСО 430 по сравнению с ИМ-чувствительными клетками линии ГИСО Т-1 и резистентными клетками сублинии ГИСО Т-1R (табл. 7). Напротив, для большинства изоформ ALDH1 отмечалось снижение экспрессии мРНК *ALDH1* в клетках ГИСО 430 по сравнению с ИМ-чувствительной линией Т-1, что подтверждало отсутствие значимого пула СК в данной опухолевой линии ГИСО.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об усилении экскреции химиопрепаратов

Таблица 6. *Экспрессия CD133 и CD44 в клеточных линиях гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО), %*

Table 6. *Expression of CD133 and CD44 in gastrointestinal stromal tumors (GIST) cells, %*

Клеточная линия Cell line	Местоположение мутаций Locus of mutation	Чувствительность к иматиниба мезилату Sensitivity to imatinib mesylate	Уровень экспрессии CD133 CD133 expression level	Уровень экспрессии CD44 CD44 expression level
ГИСО Т-1 GIST T-1	Экзон 11 Exon 11	Да Yes	94 ± 2	44 ± 1
ГИСО Т-1R GIST T-1R	Экзон 11 Exon 11	Нет No	93 ± 3	49 ± 3
ГИСО 430 GIST 430	Экзоны 11 и 13 Exons 11 and 13	Нет No	46 ± 2	0

Таблица 7. *Кратность изменения экспрессии матричной РНК ALDH1 и SOX2 в клеточных линиях гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) Т-1R и ГИСО 430 по сравнению с ГИСО Т-1*

Table 7. *Fold change in ALDH1 and SOX2 messenger RNA expression in gastrointestinal stromal tumors (GIST) T-1R and GIST 430 cell lines compared with GIST T-1*

Клеточная линия Cell lines	ALDH1A1	ALDH1A2	ALDH1A3	ALDH1B1	ALDH1L2	SOX2
ГИСО Т-1R GIST T-1R	1,8*; $p = 0{,}03$	1,4; $p = 0{,}5$	2,3*; $p = 0{,}02$	1,9; $p = 0{,}09$	0,7; $p = 0{,}2$	3,8**; $p = 0{,}0002$
ГИСО 430 GIST 430	0,04**; $p = 0{,}0001$	2,0; $p = 0{,}07$	0,02**; $p = 0{,}0004$	0,01**; $p = 0{,}0003$	1,4; $p = 0{,}4$	0,002*; $p = 0{,}005$

$^*p < 0{,}05$. $^{**}p < 0{,}001$.

из опухолевых клеток ГИСО 430 вследствие гиперэкспресии АВС-транспортеров, что иллюстрирует многообразие механизмов формирования химиорезистентности даже в относительно однородной клеточной популяции опухолевых клеток. Помимо этого, на основании результатов колониеобразования, показавших увеличение численности колоний в ГИСО 430 после внесения в культуру ИМ, нельзя окончательно исключить наличие в культуре ГИСО 430 опухолевых клеток с фенотипом стволовости, что в совокупности со вторичными мутациями в гене *KIT* и гиперэкспрессией АВС-транспортеров может быть дополнительным фактором формирования их химиорезистентности.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашего исследования продемонстрировали гиперэкспрессию 3 основных типов АВС-транспортеров в ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО 430 (см. рис. 2), что могло явиться одним из механизмов их резистентности к доксорубицину и митоксантрону (см. табл. 5). Использование специфических ингибиторов ABCB1 (тариквидара и циклоспорина А), ABCC1 (MK-571) и ABCG2 (Ko-143) приводило к значимому повышению интенсивности внутриклеточной флуоресценции вышеуказанных химиопрепаратов в данной клеточной линии ГИСО. Мы обнаружили, что ключевым транспортером, ответственным за экскрецию доксорубицина из опухолевых клеток ГИСО 430, был транспортер ABCC1 (см. рис. 4), в то время как снижение внутриклеточной концентрации митоксантрона в этих клетках ГИСО осуществлялось преимущественно через ABCB1-опосредованный механизм (см. рис. 5). Активация функции АВС-транспортеров в данной клеточной линии также подтверждалась значимым снижением интенсивности флуоресценции родамина 123, являющегося субстратом преимущественно для транспортера ABCB1 (см. рис. 1).

Обнаруженный нами факт экспрессии АВС-транспортеров в ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО 430 мог также быть следствием наличия в данной клеточной линии клеток с фенотипом стволовости. Действительно, активность АВС-транспортеров в СК наиболее высока по сравнению с опухолевыми клетками [37–39]. Для изучения такой возможности мы проанализировали уровни экспрессии некоторых маркеров СК в указанной клеточной линии ГИСО, а именно провели сравнительный анализ экспрессии молекул CD133 и CD44 и некоторых изоформ ALDH1. Экспрессия CD133 (также известного как проминин-1) широко используется при комплексной диагностике некоторых разновидностей злокачественных опухолей [40, 41]. Известно, что CD133 представляет собой трансмембранный белок пентаспан, который первоначально был описан как поверхностный антиген, специфичный для гемопоэтических, нейрональных и других СК человека [42]. Хотя биологическая функция CD133 остается неясной, CD133 сам по себе или в комбинации с другими маркерами в настоящее время используется для выделения СК из множества нормальных тканей, а также для идентификации и выделения предполагаемой популяции опухолевых СК из различных злокачественных новообразований, включая глиомы и эпителиальные опухоли [43].

Вопреки ожиданиям, уровень экспрессии CD133 в клетках линии ГИСО 430 был ниже по сравнению с ИМ-резистентными клетками ГИСО Т-1R, а также их материнской ИМ-чувствительной линией ГИСО Т-1 (см. рис. 7, *а*, табл. 6). Более того, экспрессия CD44 в клетках ГИСО 430 вообще не определялась, но была крайне высокой в линии ГИСО Т-1 (см. рис. 7, *б*, табл. 6). К тому же не обнаружено различий в уровне экспрессии вышеуказанных маркеров стволовости между ИМ-чувствительной и резистентной линиями ГИСО Т-1 и Т-1R (см. табл. 6). Полученные данные не позволяют сделать предположение о наличии клеток с фенотипом стволовости в клеточной линии ГИСО 430, несмотря на установленный нами ранее факт усиления колониеобразования в геле, характерный исключительно для клеточной линии ГИСО 430 [44]. В данном исследовании была также выявлена способность таргетного препарата ИМ стимулировать образование колоний в ГИСО 430 (см. рис. 6).

Известно, что способность к колониеобразованию является одним из свойств как нормальных, так и опухолевых СК и позволяет выявить их в популяции. При оценке различий в количестве колоний между использованными клеточными линиями ГИСО следует принимать во внимание не общее количество всех колоний, которые указывают на общую жизнеспособность клеток в условиях теста, а именно истинные фокусы клеточной пролиферации – крупные плотные колонии, которые и должны быть образованы опухолевыми СК. С учетом этих данных вышеописанные изменения обнаружены исключительно в клеточной популяции ГИСО 430, культивированной в присутствии ИМ, что может свидетельствовать о способности данного таргетного препарата влиять на прогрессирование заболевания в случае развития химиорезистентности опухолевых клеток.

Для исключения возможности присутствия в клеточной линии ГИСО 430 клеток с фенотипом стволовости также проведена оценка уровня экспрессии некоторых изоформ ALDH1. Известно, что ALDH1 является детоксицирующим ферментом, ответственным за окисление внутриклеточных альдегидов. Данный фермент обеспечивает устойчивость к некоторым алкилирующим агентам, достаточно широко используемым в терапии различных злокачественных новообразований [45]. Кроме того, ALDH1 участвует в метаболизме ретинола в ретиноевую кислоту, что приводит к запуску клеточной дифференцировки в СК, в связи с чем данный маркер используют при их сортировке [46]. Во многих исследованиях показано, что ALDH1^{+}-опухолевые клетки проявляют радиорезистентность; имеются также доказательства запуска эпителиально-мезенхимального перехода и экспрессии соответствующих маркеров, таких как Snail. Следовательно, высокая экспрессия ALDH1 может расцениваться как один из довольно специфических маркеров СК [47]. Роль ALDH1 в резистентности ГИСО к ИМ и прогрессировании заболевания остается малоизученной. Имеются единичные исследования, свидетельствующие о том, что гиперэкспрессия *ALDH1A* и некоторых других генов (например, *CD34*, *FGF2*, *KIT*, *JAG1)* коррелирует с диссеминацией опухолевого процесса, метастатическими поражениями печени и низкими показателями безрецидивной выживаемости [48]. Полученные нами данные, представленные в табл. 7, демонстрируют низкий уровень экспрессии мРНК всех изученных изоформ *ALDH1*, а также *SOX2* в клеточной линии ГИСО 430 по сравнению с ИМ-резистентной линией ГИСО Т-1R и их материнской ИМ-чувствительной линией ГИСО Т-1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о большой роли гиперэкспрессии некоторых разновидностей ABC-транспортеров в формировании резистентности ГИСО к химиопрепаратам. Также необходимо учитывать ранее опубликованные данные, в том числе нашей научной группы, демонстрирующие цитотоксическую и противоопухолевую активность некоторых химиопрепаратов (в частности, ингибиторов ДНК-топоизомеразы 2-го типа) в отношении ГИСО, в том числе резистентных к ИМ [49–51]. Роль гиперэкспрессии вышеуказанных ABC-транспортеров в резистентности ГИСО к ИМ является объектом будущих исследований, предусматривающих конъюгацию этого препарата с соответствующими флуоресцентыми метками и последующее определение его внутриклеточной концентрации с помощью проточной цитометрии и/или других методических подходов (например, с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lasota J., Miettinen M. KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). Semin Diagn Pathol 2006;23(2):91–102. DOI: 10.1053/j.semdp.2006.08.006
2. Wang C.M., Huang K., Zhou Y. et al. Molecular mechanisms of secondary imatinib resistance in patients with gastrointestinal stromal tumors. J Cancer Res Clin Oncol 2010;136(7):1065–71. DOI: 10.1007/s00432-009-0753-7
3. Du J., Wang S., Wang R. et al. Identifying secondary mutations in chinese patients with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors (GISTs) by next generation sequencing (NGS). Pathol Oncol Res 2020;26(1):91–100. DOI: 10.1007/s12253-019-00770-6
4. Bauer S., Duensing A., Demetri G.D., Fletcher J.A. KIT oncogenic signaling mechanisms in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor: PI3-kinase/AKT is a crucial survival pathway. Oncogene 2007;26(54):7560–8. DOI: 10.1038/sj.onc.1210558
5. Mahadevan D., Cooke L., Riley C. et al. A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. Oncogene 2007;26(27):3909–19. DOI: 10.1038/sj.onc.1210173
6. Li J., Dang Y., Gao J. et al. PI3K/AKT/mTOR pathway is activated after imatinib secondary resistance in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). Med Oncol 2015;32(4):111. DOI: 10.1007/s12032-015-0554-6
7. Бикиниева Ф.Ф. Роль аутокринной активации FGF-сигнального пути в резистентности гастроинтестинальных стромальных опухолей к иматинибу. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2024. 26 с.
   Bikinieva F.F. The role of autocrine activation of the FGF signaling pathway in the resistance of gastrointestinal stromal tumors to imatinib. Abstract of the dissertation ... Candidate of Medical Sciences. Moscow, 2024. 26 p. (In Russ.).
8. Бойчук С.В., Ивойлова Т.В. Роль ABC-транспортеров в поддержании гомеостаза, патогенезе и терапии онкологических заболеваний. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):8–21. DOI: 10.17650/2313-805X-2024-11-1-8-21
   Boichuk S.V., Ivoilova T.V. The role of ABC-transporters in homeostasis, cancer pathogenesis and therapy. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(1):8–21. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2024-11-1-8-21
9. Leonard G.D., Fojo T., Bates S.E. The role of ABC transporters in clinical practice. Oncologist 2003;8(5):411–24. DOI: 10.1634/theoncologist.8-5-411
10. Palshof J.A., Cederbye C.N., Høgdall E.V.S. et al. ABCG2 protein levels and association to response to first-line irinotecan-based therapy for patients with metastatic colorectal cancer. Int J Mol Sci 2020;21(14):5027. DOI: 10.3390/ijms21145027
11. Gao B., Russell A., Beesley J. et al. Paclitaxel sensitivity in relation to ABCB1 expression, efflux and single nucleotide polymorphisms in ovarian cancer. Sci Rep 2014;4(1):4669. DOI: 10.1038/srep04669
12. Ferrao P.T., Frost M.J., Siah S.P., Ashman L.K. Overexpression of P-glycoprotein in K562 cells does not confer resistance to the growth inhibitory effects of imatinib (STI571) *in vitro*. Blood 2003;102(13):4499–503. DOI: 10.1182/blood-2003-01-0083
13. Illmer T., Schaich M., Platzbecker U. et al. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. Leukemia 2004;18(3):401–8. DOI: 10.1038/sj.leu.2403257
14. Widmer N., Rumpold H., Untergasser G. et al. Resistance reversal by RNAi silencing of MDR1 in CML cells associated with increase in imatinib intracellular levels. Leukemia 2007;21(7):1563–4. DOI: 10.1038/sj.leu.2404671
15. Rumpold H., Wolf A.M., Gruenewald K. et al. RNAi-mediated knockdown of P-glycoprotein using a transposon-based vector system durably restores imatinib sensitivity in imatinib-resistant CML cell lines. Exp Hematol 2005;33(7):767–75. DOI: 10.1016/j.exphem.2005.03.014
16. Shen T., Kuang Y.H., Ashby C.R. et al. Imatinib and nilotinib reverse multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the efflux activity of the MRP7 (ABCC10). PLoS One 2009;4(10):e7520. DOI: 10.1371/journal.pone.0007520
17. Sims J.T., Ganguly S.S., Bennett H. et al. Imatinib reverses doxorubicin resistance by affecting activation of STAT3-dependent NF-κB and HSP27/p38/AKT pathways and by inhibiting ABCB1. PLoS One 2013;8(1):e55509. DOI: 10.1371/journal.pone.0055509
18. Boichuk S.V., Gessel T.V. Repurposing the tyrosine kinase inhibitors targeting FGFR and VEGFR pathways for cancer therapy: a comprehensive review. Cancers 2025;17(20):3354. DOI: 10.3390/cancers17203354

19. Sharom F.J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. Pharmacogenomics 2008;9(1):105–27. DOI: 10.2217/14622416.9.1.105
20. Sajid A., Rahman H., Ambudkar S.V. Advances in the structure, mechanism and targeting of chemoresistance-linked ABC transporters. Nat Rev Cancer 2023;23(11):762–79. DOI: 10.1038/s41568-023-00612-3
21. Begicevic R.R., Falasca M. ABC transporters in cancer stem cells: beyond chemoresistance. Int J Mol Sci 2017;18(11):2362. DOI: 10.3390/ijms18112362
22. Taguchi T., Sonobe H., Toyonaga S. et al. Conventional and molecular cytogenetic characterization of a new human cell line, GIST-T1, established from gastrointestinal stromal tumor. Lab Investig 2002;82(5):663–5. DOI: 10.1038/labinvest.3780461
23. Boichuk S., Galembikova A., Dunaev P. et al. A novel receptor tyrosine kinase switch promotes gastrointestinal stromal tumor drug resistance. Molecules 2017;22(12):2152. DOI: 10.3390/molecules22122152
24. Boichuk S., Galembikova A., Sitenkov A. et al. Establishment and characterization of a triple negative basal-like breast cancer cell line with multi-drug resistance. Oncol Lett 2017;14(4):5039–45. DOI: 10.3892/ol.2017.6795
25. Wu C.P., Hung C.Y., Lusvarghi S. et al. Overexpression of human ABCB1 and ABCG2 reduces the susceptibility of cancer cells to the histone deacetylase 6-specific inhibitor Citarinostat. Int J Mol Sci 2021;22(5):2592. DOI: 10.3390/ijms22052592
26. Boichuk S., Dunaev P., Mustafin I. et al. Infigratinib (BGJ 398), a pan-FGFR inhibitor, targets P-Glycoprotein and increases chemotherapeutic-induced mortality of multidrug-resistant tumor cells. Biomedicines 2022;10(3):601. DOI: 10.3390/biomedicines10030601
27. Бойчук С.В., Ивойлова Т.В., Галембикова А.Р. Лапатиниб потенцирует цитотоксическую активность доксорубицина в отношении опухолевых клеток с фенотипом множественной лекарственной устойчивости *in vitro*. Поволжский онкологический вестник 2024;15(1):9–26. DOI: 10.32000/2078-1466-2024-1-9-26
Boichuk S.V., Ivoylova T.V., Galembikova A.R. Lapatinib potentiates the cytotoxic activity of doxorubicin against tumor cells with a multidrug-resistant phenotype *in vitro*. Povolzhskiy onkologicheskiy vestnik = Volga Oncological Bulletin 2024;15(1 (58):1. (In Russ.). DOI: 10.32000/2078-1466-2024-1-9-26
28. 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
29. Ma S.L., Hu Y.P., Wang F. et al. Lapatinib antagonizes multidrug resistance-associated protein 1-mediated multidrug resistance by inhibiting its transport function. Mol Med 2014;20(1):390–9. DOI: 10.2119/molmed.2014.00059
30. Saengkhae C., Loetchutinat C., Garnier-Suillerot A. Kinetic analysis of rhodamines efflux mediated by the multidrug resistance protein (MRP1). Biophys J 2003;85(3):2006–14. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74628-1
31. Forster S., Thumser A.E., Hood S.R., Plant N. Characterization of rhodamine-123 as a tracer dye for use in *in vitro* drug transport assays. PLoS One 2012;7(3):e33253. DOI: 10.1371/journal.pone.0033253
32. Troutman M.D., Thakker D.R. Rhodamine 123 requires carrier-mediated influx for its activity as a P-glycoprotein substrate in Caco-2 cells. Pharm Res 2003;20(8):1192–9. DOI: 10.1023/A:1025096930604
33. Procházková J., Kubala L., Kotasová H. et al. ABC transporters affect the detection of intracellular oxidants by fluorescent probes. Free Radic Res 2011;45(7):779–87. DOI: 10.3109/10715762.2011.579120
34. Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2009;14(1):3–9. DOI: 10.1007/s10911-009-9109-9
35. Chen S., Hou J., Feng X. et al. Clinicopathologic significance of putative stem cell marker, CD44 and CD133, in human gastric carcinoma. J Surg Oncol 2013;107(8):799–806. DOI: 10.1002/jso.23337
36. Wang C., Xie J., Guo J. et al. Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. Oncol Rep 2012;28(4):1301–8. DOI: 10.3892/or.2012.1951
37. Scharenberg C.W., Harkey M.A., Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. Blood 2002;99(2):507–12. DOI: 10.1182/blood.v99.2.507
38. Ho M.M., Ng A.V., Lam S., Hung J.Y. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. Cancer Res 2007;67(10):4827–33. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3557
39. Welte Y., Adjaye J., Lehrach H.R., Regenbrecht C.R.A. Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive? Cell Commun Signal 2010;8(1):6. DOI: 10.1186/1478-811X-8-6
40. Zhu Z., Hao X., Yan M. et al. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+ CD44+ population in hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 2010;126(9):2067–78. DOI: 10.1002/ijc.24868
41. Tirino V., Camerlingo R., Franco R. et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. Eur J Cardio-Thoracic Surg 2009;36(3):446–53. DOI: 10.1016/j.ejcts.2009.03.063
42. Miraglia S., Godfrey W., Yin A.H. et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. Blood 1997;90(12):5013–21. DOI: 10.1182/blood.V90.12.5013
43. Ricci-Vitiani L., Lombardi D.G., Pilozzi E. et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. Nature 2007;445(7123):111–5. DOI: 10.1038/nature05384
44. Boichuk S., Galembikova A., Mikheeva E. et al. Inhibition of FGF2-mediated signaling in GIST – promising approach for overcoming resistance to imatinib. Cancers (Basel) 2020;12(6):1674. DOI: 10.3390/cancers12061674
45. Sládek N.E. Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. J Biochem Mol Toxicol 2003;17(1):7–23. DOI: 10.1002/jbt.10057
46. Chute J.P., Muramoto G.G., Whitesides J. et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. Proc Natl Acad Sci 2006;103(31):11707–12. DOI: 10.1073/pnas.0603806103
47. Chen Y.C., Chen Y.W., Hsu H.S. et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. Biochem Biophys Res Commun 2009;385(3):307–13. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.05.048
48. Guo J., Feng S., Yu H. et al. Transcriptomic study of gastrointestinal stromal tumors with liver metastasis. Front Genet 2023;14:1007135. DOI: 10.3389/fgene.2023.1007135
49. Boichuk S., Lee D.J., Mehalek K.R. et al. Unbiased compound screening identifies unexpected drug sensitivities and novel treatment options for gastrointestinal stromal tumors. Cancer Res 2014;74(4):1200–13. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1955
50. Галембикова А.Р., Дунаев П.Д., Ивойлова Т.В. и др. Деполимеризация тубулина как основной молекулярный механизм цитотоксической и противоопухолевой активности пирролсодержащих гетероциклических соединений. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):130–46. DOI: 10.17650/2313-805X-2024-11-2-130-146
Galembikova A.R., Dunaev P.D., Ivoilova T.V. et al. Depolymerization of tubulin as the main molecular mechanism of the cytotoxic and antitumor activity of pyrrole-containing heterocyclic compounds. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(2):130–46. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2024-11-2-130-146

51. Галембикова А.Р., Дунаев П.Д., Бикиниева Ф.Ф. и др. Механизмы цитотоксической активности пирролкарбоксамидов в отношении опухолевых клеточных сублиний с множественной лекарственной устойчивостью. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(3): 59–71. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-59-71

Galembikova A.R., Dunaev P.D., Bikinieva F.F. et al. Mechanisms of cytotoxic activity of pyrrole-carboxamides against multidrug-resistant tumor cell sublines. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2023;10(3):59–71. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-59-71

Вклад авторов
Ф.Ф. Бикиниева, С.В. Бойчук: разработка концепции и дизайна исследования, проведение проточной цитометрии, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи, редактирование;
П.Д. Дунаев: проведение вестерн-блоттинга, анализ и интерпретация данных;
А.Р. Галембикова: проведение MTS-теста, анализ и интерпретация данных;
Т.В. Гессель: проведение проточной цитометрии, анализ и интерпретация данных;
П.Б. Копнин: анализ колониеобразования, анализ и интерпретация данных;
Э.С. Егорова: выполнение полимеразной цепной реакции, анализ и интерпретация данных;
С.А. Рыжкин: статистическая обработка данных, научное консультирование.
Authors’ contributions
F.F. Bikinieva, S.V. Boichuk: development of the concept and design of research, conducting flow cytometry, data analysis and interpretation, article writing, editing;
P.D. Dunaev: Western blotting, data analysis and interpretation;
A.R. Galembikova: conducting an MTS test, analyzing and interpreting data;
T.V. Gessel: conducting flow cytometry, data analysis and interpretation;
P.B. Kopnin: colony formation analysis, data analysis and interpretation;
E.S. Egorova: polymerase chain reaction, data analysis and interpretation;
S.A. Ryzhkin: statistical data processing, scientific consulting.

ORCID авторов / ORCID of authors
Ф.Ф. Бикиниева / F.F. Bikinieva: https://orcid.org/0000-0002-9012-6525
П.Д. Дунаев / P.D. Dunaev: https://orcid.org/0000-0002-5449-4435
А.Р. Галембикова / A.R. Galembikova: https://orcid.org/0000-0002-0293-2974
Т.В. Гессель / T.V. Gessel: https://orcid.org/0009-0003-4348-9141
П.Б. Копнин / P.B. Kopnin: https://orcid.org/0000-0002-2078-4274
Э.С. Егорова / E.S. Egorova: https://orcid.org/0000-0002-6210-4660
С.А. Рыжкин / S.A. Ryzhkin: https://orcid.org/0000-0003-2595-353X
С.В. Бойчук / S.V. Boichuk: https://orcid.org/0000-0003-2415-1084

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 24-25-00418).
Funding. The study was carried out with the support of the Russian Science Foundation (grant No. 24-25-00418).

Статья поступила: 29.09.2025. **Принята к публикации:** 20.10.2025. **Опубликована онлайн:** 10.12.2025.
Article submitted: 29.09.2025. **Accepted for publication:** 20.10.2025. **Published online:** 10.12.2025.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-125-138

Разработка и клиническая апробация тест-системы для дифференциальной диагностики фолликулярных аденом и карцином щитовидной железы «миР-ТИРОИД»

А.В. Шалаев[1], Л.М. Забегина[1], М.С. Александрова[1], П.А. Локтева[1], Я.А. Бандык[2], Л.А. Красильникова[1], А.Г. Куляш[3], С.Л. Воробьев[4], Р.А. Черников[3], И.В. Слепцов[3], А.В. Малек[1]

[1]*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68;*
[2]*ООО «Альгимед-Техно»; Республика Беларусь, 220090 Минск, Логойский тракт, 22/1;*
[3]*Клиника высоких медицинских технологий им. Н.И. Пирогова ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; Россия, 192071 Санкт-Петербург, наб. реки Фонтанки, 154;*
[4]*ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики»; Россия, 192071 Санкт-Петербург, проспект Славы, 32*

Контакты: Анастасия Валерьевна Малек *anastasia@malek.com.ru*

Введение. Отсутствие объективных морфологических признаков злокачественности осложняет задачу дооперационной дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы фолликулярной структуры. В сомнительных случаях выбор оперативной лечебной тактики представляется оправданным, но гистологическое исследование операционного материала часто выявляет доброкачественный характер узлов. Возможным решением проблемы является разработка методов молекулярной диагностики данной патологии. Например, феномен отличия паттернов экспрессии регуляторных молекул микроРНК в клетках фолликулярной аденомы и фолликулярного рака щитовидной железы послужил основой для создания тест-системы «миР-ТИРОИД».

Цель исследования – разработка и апробация набора реагентов («миР-ТИРОИД») для дифференциальной диагностики фолликулярной аденомы и фолликулярного рака щитовидной железы с помощью реакции обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) молекул микроРНК.

Материалы и методы. Выбор потенциально маркерных молекул (n = 53) основан на результатах проведенного ранее исследования гистологически верифицированных образцов фолликулярной аденомы и фолликулярного рака щитовидной железы с помощью технологии высокопроизводительного секвенирования. В данном исследовании использована тест-система, основанная на реакции ОТ с двухфланговым праймером и количественной ПЦР с TaqMan- зондом. Для оценки аналитических характеристик этой технологии использованы синтетические аналоги молекул микроРНК, для анализа диагностических характеристик метода – цитологические препараты фолликулярной аденомы (n = 20) и фолликулярного рака (n = 20) щитовидной железы.

Результаты. Исследованы аналитические характеристики систем ОТ-ПЦР и концентрация потенциально маркерных молекул в цитологических препаратах, что позволило сократить список маркерных микроРНК с 53 до 7 (hsa-miR-15a-5p, -20-5p, -24-3p, -106b-5p, -143-3p, -146b-5p, -192-5p). Разработан алгоритм анализа результатов ОТ-ПЦР, основанный на вычислении соотношения концентраций молекул с разнонаправленными ассоциированными с фолликулярным раком изменениями экспрессии, комбинации этих результатов и расчете значения диагностического параметра «миР-Т». Тест-система «миР-ТИРОИД», основанная на технологии ОТ-ПЦР и алгоритме анализа данных, позволила дифференцировать фолликулярную аденому и фолликулярный рак с чувствительностью 89,47 %, специфичностью 90 %, положительным прогностическим значением 89,47 %, отрицательным прогностическим значением 90 % и точностью 89,74 %.

Заключение. Разработанная на основе 7 молекул микроРНК тест-система «миР-ТИРОИД», клиническая апробация которой проведена на 40 образцах (20 образцов фолликулярной аденомы и 20 образцов фолликулярного рака), продемонстрировала высокую диагностическую значимость.

Ключевые слова: щитовидная железа, фолликулярная аденома, фолликулярный рак, микроРНК, реакции обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией, дифференциальная диагностика

Для цитирования: Шалаев А.В., Забегина Л.М., Александрова М.С. и др. Разработка и клиническая апробация тест-системы для дифференциальной диагностики фолликулярных аденом и карцином щитовидной железы «миР-ТИРОИД». Успехи молекулярной онкологии 2025;12(4):125–38.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-125-138

Development and clinical approbation of miR-THYROID test-system for differential diagnosis of thyroid follicular adenomas and carcinomas

A.V. Shalaev[1], L.M. Zabegina[1], M.S. Aleksandrova[1], P.A. Lokteva[1], Ya.A. Bandyk[2], L.A. Krasil'nikova[1], A.G. Kulyash[3], S.L. Vorob'ev[4], R.A. Chernikov[3], I.V. Sleptsov[3], A.V. Malek[1]

[1]N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaya St., Pesochny Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia;
[2]LLC "Algimed-Techno"; 22/1 Logoysky Trakt, Minsk 220090, Republic of Belarus;
[3]N.I. Pirogov Clinic of High Medical Technologies, Saint Petersburg State University; 154 Fontanka River Emb., Saint Petersburg 192071, Russia;
[4]LLC "National Center of Clinical Morphological Diagnostics"; 32 Slavy Prospekt, Saint Petersburg 192071, Russia

Contacts: Anastasia Valeryevna Malek *anastasia@malek.com.ru*

Introduction. Absence of objective morphological signs of malignancy complicates the problem of preoperative differential diagnosis of nodular thyroid lesions with follicular structure. In ambiguous cases, selection of surgical treatment is justified but results of histological examination of operative material often show benign nature of the nodules. A possible solution for this problem is development of molecular diagnostic methods for this pathology. For example, the miR-THYROID test system is based on the differences in expression patterns of regulatory microRNAs (miRNAs) in follicular adenoma cells and follicular thyroid cancer cells.

Aim. To develop and validate a set of reagents (miR-THYROID) for differential diagnosis of follicular adenoma and follicular thyroid cancer using reverse transcription with subsequent polymerase chain reaction (RT-PCR).

Materials and methods. Selection of potential marker molecules (n = 53) is based on the results of previous study of histologically verified samples of follicular adenoma and follicular thyroid cancer using high-throughput sequencing. In this study, a test system based on RT reaction with two-tailed primer and quantitative PCR with TaqMan probe was developed. To evaluate analytical characteristics of this technology, synthetic analogues of miRNA molecules were used; for analysis of diagnostic characteristics of the method, cytology samples of follicular adenoma (n = 20) and follicular thyroid cancer (n = 20) were used.

Results. Studies of analytical characteristics of RT-PCR system and concentration of potential marker molecules in cytology samples were performed which allowed to shorten the list of marker miRNAs from 53 to 7 (hsa-miR-15a-5p, -20-5p, -24-3p, -106b-5p, -143-3p, -146b-5p, -192-5p). Algorithm of RT-PCR result analysis was developed based on calculation of molecule concentration ratios relative to oppositely directed follicular cancer-associated changes in expression, combination of these results, and calculation of the miR-T diagnostic parameter. miR-THYROID test system based in RT-PCR technology allowed to differentiate follicular adenoma from follicular cancer with sensitivity 89.47 % and specificity 90 %, positive prognostic significance 89.47 %, negative prognostic significance 90 %, and accuracy 89.74 %.

Conclusion. Test system miR-THYROID based on 7 microRNA molecules was validated on 40 samples (20 samples of follicular adenoma and 20 samples of follicular cancer) and demonstrated high diagnostic significance.

Keywords: thyroid gland, follicular adenoma, follicular carcinoma, microRNA, reverse transcription with following polymerase chain reaction, differential diagnostics

For citation: Shalaev A.V., Zabegina L.M., Aleksandrova M.S. et al. Development and clinical approbation of miR-THYROID test-system for differential diagnosis of thyroid follicular adenomas and carcinomas. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(4):125–38. (In Russ.).
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-125-138

ВВЕДЕНИЕ

Узловые образования щитовидной железы (ЩЖ) являются относительно часто встречающейся патологией. Их диагностируют примерно у 50 % женщин старше 70 лет [1, 2]. В большинстве случаев узлы ЩЖ являются доброкачественными; в случаях, если они оказываются злокачественными, необходимо хирургическое лечение.

Отечественные и зарубежные диагностические алгоритмы [3, 4], по сути, определяют порядок исследований, направленных в первую очередь на выявление злокачественных узлов. Диагностика включает врачебный осмотр, ультразвуковое исследование ЩЖ и регионарных лимфатических узлов и цитологическое исследование материала, полученного с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) с последующей градацией на 6 диагностических групп в соответствии с системой Bethesda (2023). Использование стандартного алгоритма позволяет выявить злокачественные узлы ЩЖ в 70–85 % случаев. В 15–30 % случаев степень риска злокачественной природы узлового образования составляет в среднем от 22 % (III категория по системе Bethesda – атипия неясного значения) до 30 % (IV категория по системе Bethesda – фолликулярная неоплазия). Этот диапазон составляет так называемую серую зону неоплазий ЩЖ. При отсутствии методов более точной диагностики хирургическая лечебная тактика является вынужденным методом выбора для пациентов с цитологическим заключением III/IV по системе Bethesda.

Потенциальным методом уточняющей диагностики для этой когорты пациентов является молекулярно-генетическое исследование материала ТАБ. Первыми были предложены методы анализа характерных мутаций ДНК, например 7-gene panel test (7-генная панель), предполагающий анализ экспрессии генов *BRAF*, *RAS (H/N/K)*, *PAX8/PPARG*, *RET/PTC1* и *RET/PTC3*. В нескольких независимых исследованиях этот тест продемонстрировал высокое отрицательное прогностическое значение (ОПЗ) (81,8–82 [5], 91 [6] и 94 % [7]). Однако невысокое положительное прогностическое значение (ППЗ) этого теста оставило открытым вопрос о необходимости проведения операций.

При анализе единичных мутаций тесты на основе технологии глубокого секвенирования (deep sequencing) обладают заведомо более высоким диагностическим потенциалом, чем полимеразная цепная реакция (ПЦР). Например, ППЗ и ОПЗ теста ThyroSeq v3, предполагающего качественный анализ 112 генетических мутаций, составляют 78,2 и 75,9 % соответственно [8], теста Afirma GSC, с помощью которого проводят количественный анализ 167 молекул матричной РНК (мРНК), – 100 и лишь 58 % соответственно [9]. Вместе с тем при очевидной диагностической эффективности высокая стоимость этих исследований является существенным препятствием к их широкому использованию. Можно полагать, что сужение панели тестируемых генов будет решением проблемы (примеры: Thyro Track – определение 57 мутаций [10], FSZ-Thyroid NGS Panel – определение 14 мутаций [11]).

Принципиального снижения стоимости исследования можно добиться при использовании ПЦР. Например, ППЗ и ОПЗ теста ThyroidPrint, предполагающего количественный анализ мРНК 10 генов (*TIMP1*, *CLDN1*, *KTR19*, *AFAPL2*, *HMOX1*, *CXCR3*, *CXCL10*, *CCR3*, *CCR7*, *CXADR*), составили 78 и 95 % соответственно [12, 13], теста mir-THYpe, обеспечивающего количественный анализ 10 микроРНК (let-7a, miR-103, miR-125a-5p, let-7b, miR-145, -146b, -152, -155, -200b и -181b), – 66,2 и 95 % соответственно [14, 15]. Эти примеры показывают, что *a priori* диагностические потенциалы экономичных тестов на основе ПЦР и тестов на основе глубокого секвенирования сопоставимы. Очевидные перспективы имеют также методы, сочетающие различные технологии для анализа молекулярных маркеров разных классов. Например, анализ 8 генетических аномалий (7-генная панель + TERT), дополненный оценкой экспрессии 10 молекул микроРНК (ThyGenX-ThyraMIR), предложен исследователями из Медицинского центра Дартмута Хичкока (США) [16]. Комплексная оценка ряда параметров, включая мутации (*BRAFV*^{600E}), соотношение митохондриальной и ядерной ДНК, количественный анализ мРНК (GCM2, HMFA2) и микроРНК (miR-146b, -221, -375, -31, -551b -29b, -23a и -197), рассматривается в качестве метода дифференциальной диагностики узловых образований ЩЖ исследователями из Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук [17].

Глубокий сравнительный анализ наиболее перспективных методов молекулярно-генетических исследований материала ТАБ представлен R. Chowdhury и соавт. [18]. Выводы авторов указывают на нерешенные проблемы интерпретации и клинического применения разработанных тест-систем, с чем трудно не согласиться. Связь между маркерами, используемыми в ходе молекулярно-генетических исследований, и клинико-морфологическими особенностями узлов ЩЖ в ряде случаев известна и понятна. Поэтому существующие тесты зачастую основаны на эмпирических комбинациях молекулярных маркеров и не всегда могут однозначно решить клинические вопросы. Например, наиболее «продвинутые» продукты – ThyroSeq v3 и Afirma GSC – оказались малоинформативными при Гюртле-клеточных неоплазиях ЩЖ [19]. Классификатор ThyraMIR не позволяет дифференцировать доброкачественные и злокачественные образования ЩЖ, в которых обнаружена мутация в гене *RAS* [20].

В ряде ранее проведенных исследований мы показали возможность решения относительно узкой задачи – дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных узлов ЩЖ из фолликулярного эпителия путем анализа пар микроРНК с реципрокным характером ассоциированных с фолликулярным раком (ФР) экспрессионных изменений [21, 22]. Итогом этих исследований стало создание тест-системы «миР-ТИРОИД», процесс разработки и результаты клинической апробации которой представлены в данной статье.

Цель исследования – разработка и апробация набора реагентов («миР-ТИРОИД») для дифференциальной диагностики фолликулярной аденомы (ФА) и ФР ЩЖ с помощью реакции обратной транскрипции и последующей ПЦР (ОТ-ПЦР) молекул микроРНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологический материал. Перед включением в исследование биологические образцы и клинические данные были деперсонализированы. В работе использованы данные анализа, проведенного ранее с применением фиксированных в 10 % забуференном формалине и залитых в парафин 12 образцов ФА и 12 образцов высокодифференцированного ФР ЩЖ [21], а также цитологические препараты (материал ТАБ) ФА ($n = 20$) и ФР ($n = 20$). Во всех случаях пациенты, имеющие одиночные (солитарные) узлы ЩЖ, перенесли хирургическое лечение в течение 1–2 мес после ТАБ.

Результаты гистологических исследований операционного материала позволили сформировать группы образцов цитологического материала. В исследование не включались случаи несоответствия морфологических диагнозов (цитологического и послеоперационного гистологического) и случаи недостаточной клеточности материала ТАБ.

Выделение РНК. Цитологические препараты обрабатывали 600 мкл лизис-буфера (4 М гуанидинизотиоцианата, 25 мМ цитрата натрия, 0,3 % саркозила натрия, 3 % дитиотреитола), лизат переносили в пробирки. Далее для выделения РНК использовали набор ALPREP max (ООО «Альгимед-Техно», Республика Беларусь), основанный на обратимом связывании нуклеиновых кислот с поверхностью магнитных частиц, в соответствии с протоколом производителя. На финальном этапе проводили элюцию РНК в 100 мкл буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 6–7). Концентрацию и качество выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США).

ОТ-ПЦР. В исследовании использовали синтетические олигонуклеотиды (ОТ-, ПЦР-праймеры, зонды и синтетические аналоги микроРНК) производства компании «Синтол» (Россия), ревертазу ALZYME RT (ООО «Альгимед-Техно», Республика Бедарусь) и набор «БиоМастер» HS-Taq ПЦР (2×) («Биолабмикс», Россия). Анализ каждой микроРНК предполагал проведение двухфланговой (two-tailed) микроРНК-специфичной реакции ОТ с последующей ПЦР. Объем реакционных смесей ОТ и ПЦР составлял по 10 мкл; состав реакционных смесей и условия реакций соответствовали рекомендациям производителей ферментов и были детально описаны ранее [23, 24]. Интенсивность амплификации оценивали с помощью флуоресцентно-меченного ПЦР-зонда по каналу FAM. ОТ-ПЦР для каждого образца выполняли в 2 технических повторах, результаты усредняли. Все реакции ОТ-ПЦР проводили в амплификаторе CFX96 Touch™ (Bio-Rad, США).

Статистический анализ данных. Файл, содержащий прочитанные последовательности, сгенерирован с помощью программного обеспечения DNBSEQ-G400RS Software. Первичную оценку показателей качества секвенирования выполнили с использованием программы FastQC [25]. Следующие этапы анализа проведены с помощью BioPython – модуля языка программирования Python, содержащего дополнительные средства и функции для биоинформатического анализа [26]. Предварительный анализ данных включал фильтрацию по показателю качества идентификации азотистых оснований для исключения последовательностей с точностью прочтения ниже 99,9 %. Идентификация зрелых молекул микроРНК (mapping) проведена с помощью базы даных miRbase [27]; критерием идентификации служило полное совпадение последовательности. В целях сопоставления результатов анализа образцов для каждого из них число индивидуальных молекул было нормализовано относительно общего числа идентифицированных микроРНК (Reads Per Million, RPM).

В ходе дизайна систем ОТ-ПЦР-анализа использовали открытые ресурсы RNAstructure Software v6.5 [28] и PerlPrimer v1.1.21 [29]. Для предварительной оценки данных ОТ-ПЦР результаты нормализовывали относительно среднего значения порогового цикла (Ct) всех микроРНК (*n* = 22), полученных при анализе каждого образца по стандартной формуле: $dCt = 2^{Ct(miRNA)-Ct(average)}$. После выбора потенциально маркерных молекул использовали метод реципрокных пар, детально описанный ранее [23, 24].

Оценку статистической значимости разницы уровней экспрессии отдельных микроРНК в сравниваемых группах проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Диагностическую значимость определяли с использованием ROC-анализа, расчета показателей чувствительности, специфичности, ППЗ и ОПЗ.

Расчеты и иллюстрации выполнены с помощью программ DNBSEQ-G400RS Software, CFX Manager Software, Excel 10.0 и Sigma Plot 11,0 GraphPad Prizm 10.5.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выбор потенциально маркерных молекул. Выбор потенциально маркерных молекул микроРНК на основе анализа данных глубокого секвенирования проводили с учетом 3 параметров. Во-первых, молекулы (потенциально маркерные или потенциальные нормализаторы) должны быть достаточно многокопийными для их последующего анализа с помощью ПЦР. Во-вторых, необходимо, чтобы экспрессия потенциально маркерных молекул в образцах ФА и ФР была разной. Соотношение этих параметров ($\log_2$ (fold change) *vs* $\log_2$ (expression)) на массиве данных экспрессии всех молекул микроРНК, идентифицированных в 24 образцах (12 ФА и 12 ФР), представлено на рис. 1, *а*. В-третьих, различия в уровне экспрессии потенциально маркерных молекул (ФА *vs* ФР) должны быть статистически значимы. Соотношение параметров дифференциальной экспрессии ($\log_2$ (fold change)) и статистической значимости этих различий ($-\log_2$ (*p*-value)) на том же массиве данных представлено на рис. 1, *б*.

При выборе маркерных микроРНК учтены данные научной литературы для исключения молекул, не упомянутых ранее в контексте исследований злокачественных опухолей ЩЖ. На этом этапе выбраны 53 молекулы, включая потенциальные маркеры ФР, ФА и потенциальные нормализаторы.

Дизайн и тестирование аналитических систем. Для выбранных молекул проведен дизайн аналитических систем, включающих двухфланговый ОТ-праймер, прямой и обратный праймеры для ПЦР и зонд с учетом рекомендаций разработчиков технологии two-tailed RT-PCR [30] и собственного опыта [31]. Для эффективной и специфичной инициации ОТ ОТ-праймер должен формировать стабильную шпильку с 2 свободными флангами (рис. 2, *а*), комплементарными участкам микроРНК. Структуру ОТ-праймера моделировали с помощью программы RNAstructure Software. В ряде случаев последовательности флангов препятствовали формированию правильной структуры

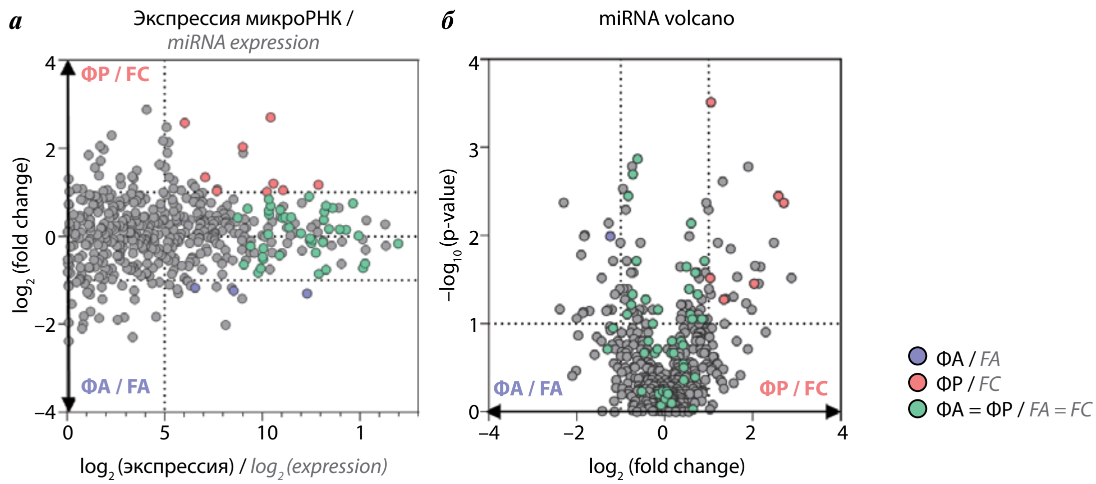


Рис. 1. *Экспрессия микроРНК в клетках фолликулярной аденомы (ФА) (n = 12) и фолликулярного рака (ФР) (n = 12): а – соотношение уровней общей и дифференциальной экспрессий. По оси абсцисс дано среднее для всех 24 образцов нормализованное значение экспрессии (expression – RPM, read per million), по оси ординат – соотношение количества молекул в образцах ФР относительно образцов ФА (fold change); б – соотношение уровней дифференциальной экспрессии и статистической значимости. По оси абсцисс дано соотношение количества молекул в образцах ФР относительно образцов ФА (fold change), по оси ординат – T-критерий Уилкоксона (p-value), характеризующий статистическую значимость различий в уровнях экспрессии. Результаты анализа данных глубокого секвенирования представлены в виде volcano-диаграмм, где каждая точка отражает характер экспрессии 1 молекулы в 2 группах образцов – ФА и ФР. Для наглядности результаты представлены как log_2. Цветом выделены молекулы, выбранные для следующих этапов анализа: потенциальные маркеры ФР, маркеры ФА и молекулы, которые могут быть использованы в качестве нормализаторов данной молекулы в 2 сравниваемых группах образцов (ФА и ФР)*

Fig. 1. *Expression of microRNAs in follicular adenoma (FA) (n = 12) and follicular cancer (FC) (n = 12) cells: a – ratio between total and differentail expresssion. On the x-axis, mean normalized expression (expression – RPM, reads per million) in all 24 samples is plotted, on the y-axis – ratio between the number of molecules in FC samples relative to FA samples (fold change); б – relationship between differential expression and statistical significance. On the x-axis, ratio between the number of moleculues in FC samples and in FA samples (fold change) is plotted; on the y-aixs – Wilcoxon T-criterion (p value) characterizing statistical significance of expression level differences. Results of analysis of deep sequencing data are presented as volcano plots where each point represents expression of 1 molecule in 2 sample groups: FA and FC. For clarity, the resuts are presented as log_2. Molecules selected for subsequent stages of analysis are colored: potential FC markers, FA markers, and molecules that can be used for normalization of this molecule in 2 comparison groups (FA and FC)*

при использовании определенной последовательности шпильки (рис. 2, *б*). Так, в ходе данной работы не удалось выбрать удачную последовательность ОТ-праймера для 3 молекул (miR-22-3p, -130a-3p и -139-5p), которые пришлось исключить из исследования.

После синтеза олигонуклеотидов эффективность каждой аналитической системы оценена путем проведения серии ОТ-ПЦР; в качестве анализируемых образцов использовали растворы синтетических аналогов микроРНК в концентрации от 10^2 до 10^{13} молекул

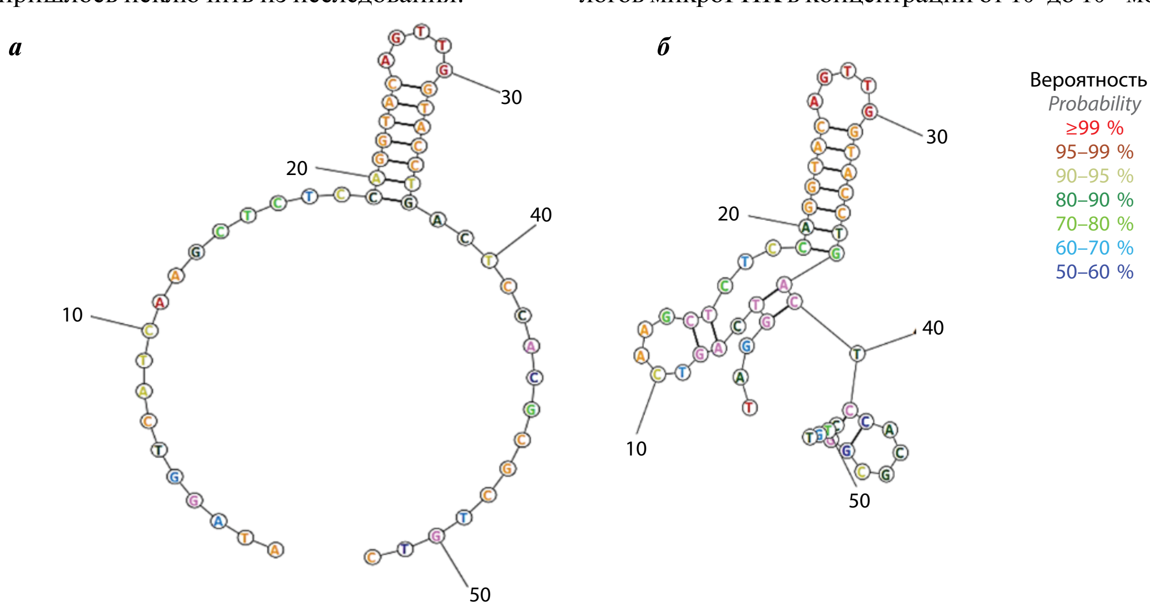


Рис. 2. *Модели структуры праймера для обратной транскрипции, рассчитанные с помощью программного обеспечения RNAstructure v.6.5 для молекулы hsa-miR-192-5p: а – оптимальный вариант праймера с правильной структурой; б – праймер с нестабильной пространственной структурой*

Fig. 2. *Primer structure models for reverse transcription, calculated using the software RNAstructure v.6.5 for the hsa-miR-192-5p molecule: a – optimal primer variant with the correct structure; б – primer with an unstable spatial structure*

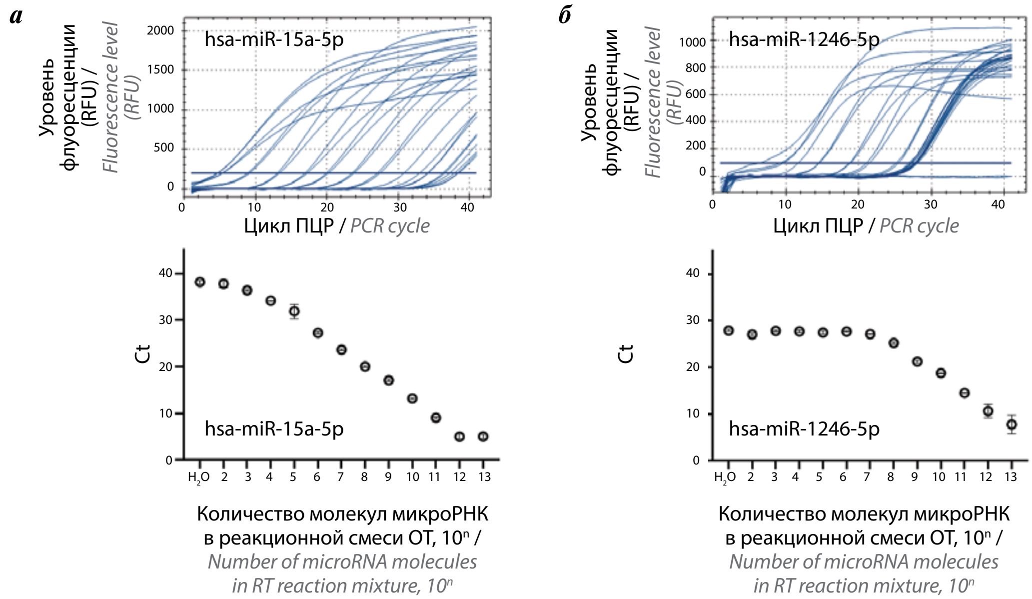


Рис. 3. *Результаты оценки аналитических характеристик систем для анализа 2 молекул hsa-miR-15a-5p (а) и hsa-miR-1246-5p (б) с помощью реакции обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). В качестве аналита использованы серии разведений синтетических аналогов микроРНК (от 10 до 10*^{13} *молекул в реакции ОТ). Все реакции проведены в двух повторах, результаты усреднены. Сверху приведены кривые амплификации, снизу – те же данные представлены в виде графиков зависимости значений пороговых циклов (Ct) ПЦР от концентрации аналитов*

Fig. 3. *Results of the evaluation of the analytical characteristics of systems for analysis of 2 molecules hsa-miR-15a-5p (a) and hsa-miR-1246-5p (б) by reverse transcription with following polymerase chain reaction (RT-PCR). Serial dilutions of synthetic microRNA analogs (10 to 10*^{13} *molecules in the reverse transcription (RT reaction mixture)) were used as the analyte; all reactions were performed in duplicate, and the results were averaged. Top – amplification curves. bottom – the same data are presented as graphs of the dependence of the threshold cycle (Ct) values of PCR on the concentration of analytes*

в реакции ОТ. На рис. 3, *а* представлены результаты такого исследования: кривые амплификации (сверху) и соответствующий график зависимости значений Ct от концентрации аналита (снизу). Каждая система имела определенный лимит детекции – нижний предел измеряемой концентрации микроРНК. При дальнейшем снижении концентрации микроРНК значение Ct не увеличивалось, формируя так называемое плато. Важной характеристикой системы являлся диапазон линейной зависимости между концентрацией микроРНК и значением Ct, который в идеале может составлять 9–11 порядков (от 10^3 до 10^{12} молекул в реакции ОТ). С учетом 2 параметров (предела чувствительности и диапазона аналитической эффективности) выбраны системы для дальнейших исследований. Десять неудачных систем (см. рис. 3, *б*) были исключены из дальнейшей работы, в том числе let-7a-5p, miR-17-5p, -21-5p, -29c-3p, -30a-5p, -146a-5p, -155-5p, -200b-3p, -200c-3p и -1246.

Еще одним критерием пригодности разработанных аналитических систем была эффективность анализа маркерных микроРНК в исследуемом биологическом материале. Этот параметр трудно предсказать или смоделировать, поскольку он определяется рядом факторов: концентрацией маркерной молекулы в тироцитах, наличием близких по структуре микроРНК, эффективностью выделения и стабильностью именно этих молекул, особенностями аналитической системы. Для оценки пригодности систем использована архивная коллекция 7 образцов ткани ЩЖ (блоки, фиксированные в формалине и залитые в парафин), из которых выделена РНК, и проведен анализ всех исследуемых микроРНК. Критерием оценки было число циклов (>7,5) между значением плато (результат ОТ-ПЦР воды) и средним значением Ct при анализе образцов, так называемый запас чувствительности. Примеры систем с достаточным (хорошие) и недостаточным (плохие) запасами аналитической чувствительности представлены на рис. 4.

По итогам оценки аналитических характеристик выбраны 22 системы для анализа потенциально маркерных молекул. Аналитические характеристики ОТ-ПЦР-систем анализа микроРНК представлены в табл. 1. Бóльшая часть потенциально маркерных молекул (31 из 53) последовательно исключены из исследования, так как не удалось разработать дизайн ОТ-праймера ($n = 3$), получить системы с удовлетворительными аналитическими характеристиками ($n = 10$), или чувствительность разработанных систем оказалась недостаточной для анализа молекул в составе ткани ЩЖ ($n = 18$).

Анализ экспрессии микроРНК в цитологических образцах. Оценка экспрессии 22 потенциально маркерных микроРНК проведена с помощью разработанных систем. Для снижения эффекта качества анализируемого материала определено среднее арифметическое

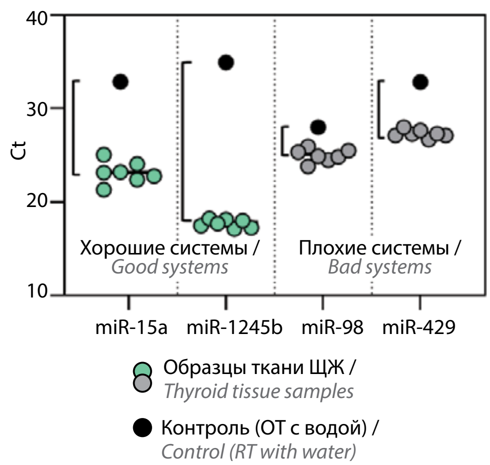


Рис. 4. *Репрезентативные примеры систем с разным запасом аналитической чувствительности при анализе микроРНК в образцах ткани щитовидной железы (ЩЖ) с помощью обратной транскрипции (ОТ) и последующей полимеразной цепной реакции. Результаты анализа воды (без аналита в ОТ) соответствуют уровню плато (черные точки). Образцы РНК, выделенные из 7 образцов ткани ЩЖ (блоки, фиксированные в формалине и залитые в парафин), были использованы для анализа маркерных молекул. Результаты (значения порогового цикла (Ct)) представлены в виде зеленых (достаточный запас аналитической чувствительности) и серых (недостаточный запас аналитической чувствительности) точек*

Fig. 4. *Representative examples of systems with different level of analytical sensitivity in reverse transcription (RT) and polymerase chain reaction analysis of microRNA in thyroid tissue samples. The result of water analysis (without analyte in RT) corresponds to the plateau level – black dots. Samples RNA extracted from seven thyroid tissue samples (formalin-fixed paraffin-embedded blocks) were used to analyze marker molecules. The results (threshold cycle (Ct) values) are presented as green (sufficient level of analytical sensitivity) and gray (insufficient level of analytical sensitivity) dots*

значение Ct (Ct_{av}) 22 молекул для каждого образца, результаты (Ct_{miR}) нормализованы относительно этого значения. Затем выполнено сравнение нормализованных значений Ct 2 групп – ФА ($n = 20$) и ФР ($n = 20$), вычислены показатели кратности наблюдаемых изменений (fold change), определены статистическая значимость различий (p-value) и диагностический потенциал каждой молекулы (см. табл. 1). Результаты анализа образцов ФА и ФР представлены в табл. 1.

Для молекул с повышенной экспрессией в образцах ФР (fold change >1) значение площади под кривой (aria under curve, AUC), полученное с помощью ROC-анализа, составило 0,5; молекул с относительно высоким уровнем экспрессии в образцах ФА (fold change <1) – <0,5. В случае, если разнонаправленные изменения экспрессионной активности молекул в образцах ФА и ФР ассоциированы друг с другом, соотношение экспрессионных изменений (или концентраций) таких молекул может иметь высокий диагностический потенциал. Молекулы формируют так называемые реципрокные пары. С учетом статистической значимости полученных результатов список потенциально маркерных молекул был сокращен до 10 (см. табл. 1, рис. 5).

Разработка аналитического алгоритма. Результатом многоэтапного исследования стала разработка панели из 10 молекул микроРНК (см. рис. 5). Наблюдались статистически значимые различия в уровнях экспрессии каждой из этих молекул между группами образцов ФА и ФР. Но ни одна микроРНК не позволяла четко дифференцировать эти нозологии, т. е. не могла служить в качестве самостоятельного диагностического маркера, что отмечалось и ранее в многочисленных исследованиях. Создание алгоритма эффективной компиляции и клинически понятной интерпретации результатов количественного анализа нескольких маркерных молекул является «узким местом» в процессе разработки диагностических тест-систем. Выбор оптимального метода представляет собой весьма творческий процесс, и разработчики используют разные подходы к решению этой задачи. Например, понимание связи между отдельными маркерами и биологическими характеристиками ткани узла ЩЖ позволило авторам метода ThyroidINFO сформировать «дерево решений» [17]. Если биологическая роль отдельных маркерных молекул неизвестна, их эффективные комбинации могут быть выбраны эмпирически [32], с помощью алгоритмов ранжирования признаков [15] или методов машинного обучения и формирования прогностических моделей [33]. Последний вариант был нами успешно использован ранее, но для его реализации необходим относительно большой массив данных (количество образцов) для обучающей и тестовой выборок. В рамках данного исследования алгоритм вычисления критерия дифференциальной диагностики ФА и ФР разработан на основе результатов анализа 10 маркерных молекул в материале только 40 образцов.

Во-первых, из 10 выбранных маркерных микроРНК сформированы все возможные пары, рассчитаны соотношения (ratio) значений Ct в каждой паре по стандартной формуле: $dCt = 2^{Ct(miR\text{-}1)-Ct(miR\text{-}2)}$ и проведена оценка диагностической значимости этих соотношений с помощью ROC-анализа. Семь из 10 молекул формировали 9 реципрокных пар с AUC >0,83. На рис. 6 представлены ROC-кривые и соответствующие значения AUC, для сравнения эти же значения подсчитаны с использованием данных секвенирования гистологических образцов.

Во-вторых, в группе анализируемых образцов (ФА ($n = 20$) + ФР ($n = 20$)) для значения ratio каждой реципрокной пары молекул микроРНК определен диапазон колебания: минимальное значение принято за 0 %, максимальное – за 100 %. Затем результаты анализа каждой пары микроРНК по всем образцам выражены в % от диапазона наблюдаемых колебаний в группе ($n = 40$). Такая нормализация обеспечила возможность последующей компиляции 9 значений ratio, полученных для каждого образца. Компиляция проведена путем вычисления среднего арифметического значения ratio – $ratio_{average}$. Этот расчетный параметр получил название «миР-Т».

Использование параметра «мир-Т» в качестве диагностического критерия позволило дифференцировать

Таблица 1. *Характеристики выбранных систем анализа микроРНК с помощью реакции обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции*

Table 1. *Characteristics of the selected systems of microRNA analysis using reverse transcription with subsequent polymerase chain reaction*

МикроРНК MicroRNA	Показатель Parameter				Результаты анализа образцов ФР (n = 20) и ФА (n = 20) щитовидной железы Results of thyroid FC (n = 20) and FA (n = 20) sample analysis		
	Ct плато Plateau Ct	Среднее пороговое значение Ct образцов (n =7) Mean threshold sample Ct (n =7)	Стандартное отклонение Standard deviation	Запас аналитической чувствительности (Ct плато – Ct образцов) Margin of analytical sensitivity (plateau Ct – sample Ct)	Кратность разницы экспрессии каждой молекулы в образцах ФР и ФА (fold change) ФА (fold change) Fold change of expression of each molecule in FC and FA samples	p	AUC
miR-7-5p	34,29	23,74	0,95	10,55	1,64	0,12	0,65
miR-15a-5p	32,9	23,16	1,30	9,75	**7,29**	**0,00**	**0,87**
miR-16-5p	31,55	18,81	0,64	12,74	1,40	0,75	0,53
miR-20a-5p	33,98	23,39	0,90	10,58	**2,70**	**0,02**	**0,73**
miR-23a-3p	31,03	22,26	0,38	8,77	1,03	0,62	0,45
miR-24-3p	29,43	19,67	0,62	9,76	**0,45**	**0,00**	**0,18**
miR-26b-5p	32,46	19,06	0,67	13,4	0,51	0,04	0,30
miR-27a-3p	30,08	20,88	0,38	9,19	1,31	0,89	0,51
miR-34a-5p	37,3	24,85	0,88	12,46	0,77	0,51	0,44
miR-93-5p	32,18	23,62	0,57	8,56	2,64	0,21	0,62
miR-106b-5p	38,12	26,87	0,52	11,26	**5,88**	**0,02**	**0,73**
miR-125b-5p	34,96	17,72	0,48	17,24	**0,30**	**0,01**	**0,26**
miR-126-3p	38,59	20,03	0,73	18,56	1,36	0,68	0,54
miR-141-3p	31,77	23,36	0,35	8,41	1,10	0,51	0,56
miR-143-3p	32,41	20,79	0,27	11,61	**0,61**	**0,02**	**0,27**
miR-146b-5p	35,04	27,31	0,65	7,73	**0,44**	**0,00**	**0,11**
miR-135b-5p	30,35	19,73	0,64	10,62	1,02	0,46	0,57
miR-182-5p	37,99	28,13	0,98	9,86	2,65	0,04	0,70
miR-185-5p	31,03	23,03	0,73	8	0,70	0,62	0,55
miR-191-5p	30,49	21,09	0,38	9,39	0,99	0,40	0,42
miR-192-5p	33,62	23,73	0,36	9,88	**2,39**	**0,01**	**0,77**
miR-221-3p	34,72	27,23	0,37	7,49	1,20	0,37	0,41

Примечание. *Жирным шрифтом выделены результаты анализа образцов фолликулярного рака (ФР) и фолликулярной аденомы (ФА), на основе которых соответствующие молекулы были выбраны и включены в следующие этапы исследования. Ct – пороговый цикл; AUC – площадь под ROC-кривой.*

Note. *Results of analysis of follicular cancer (FC) and follicular adenoma (FA) samples which served as the basis for selection of molecules for subsequent stages of the study are shown in bold. Ct – cycle threshold; AUC – area under ROC curve.*

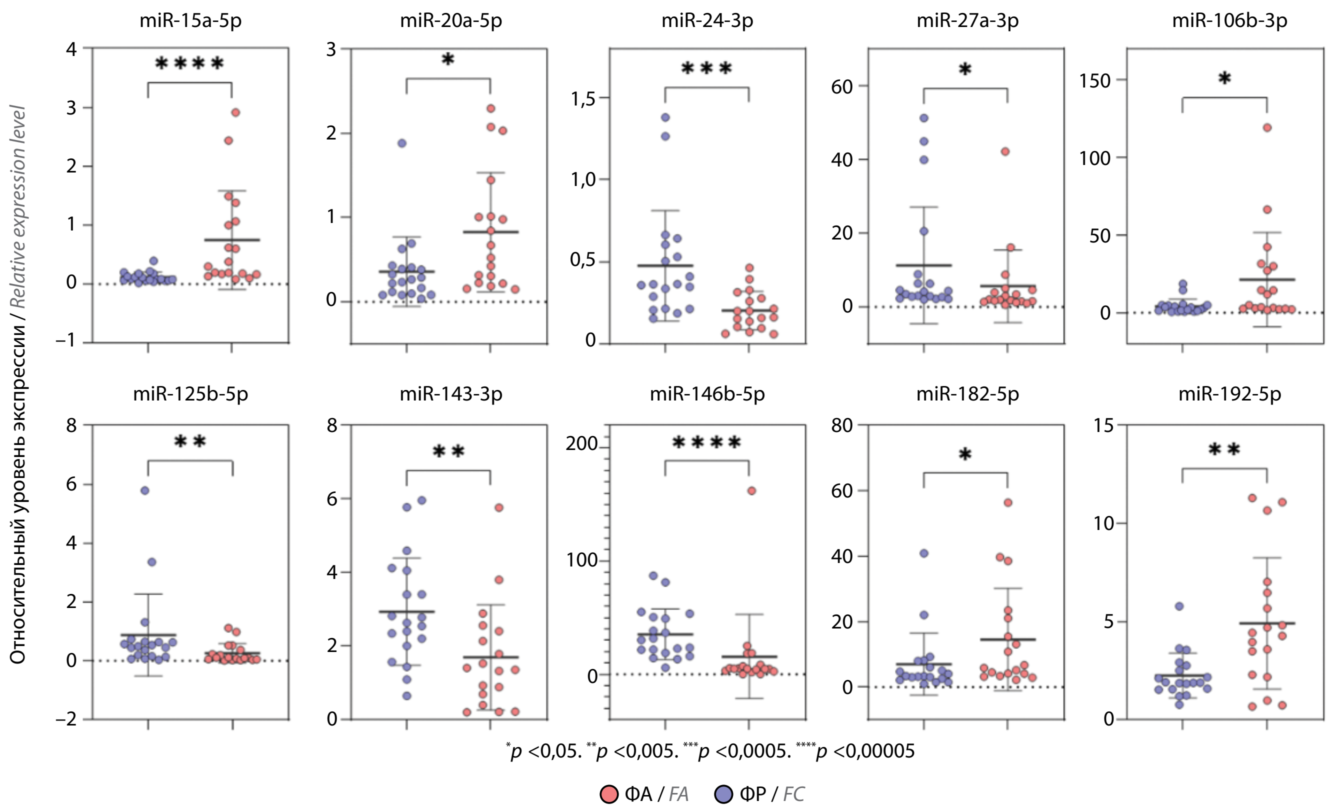
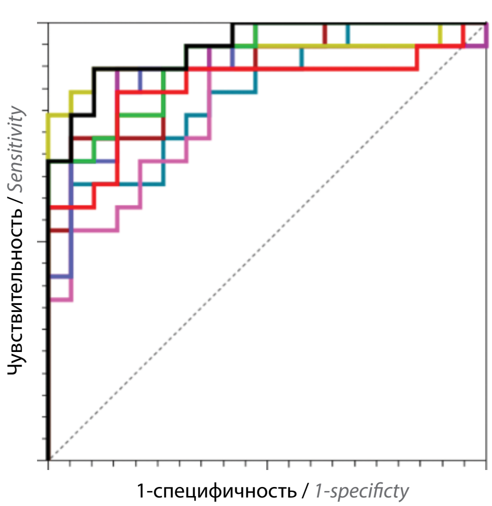


Рис. 5. *Результаты анализа экспрессии потенциально маркерных молекул микроРНК в образцах фолликулярной аденомы (ФА) и фолликулярного рака (ФР) щитовидной железы с помощью реакции обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Значения пороговых циклов (Ct) ПЦР нормализованы относительно среднего арифметического значения Ct 22 анализируемых молекул в рамках каждого образца. Статистическая значимость различий между уровнями экспрессии микроРНК в группах образцов оценена с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни*

Fig. 5. *Results of the analysis of the expression of potentially marker microRNA molecules in follicular adenoma (FA) and follicular carcinoma (FC) samples of the thyroid by reverse transcription with following polymerase chain reaction (RT-PCR). The PCR threshold cycle (Ct) values are normalized relative to the arithmetic mean of the Ct values of 22 analyzed molecules within each sample. The statistical significance of the differences between microRNA expression levels in the sample groups was assessed using the non-parametric Mann–Whitney U-test*



Реципрокная пара микро РНК *Reciprocal miRNA pair*	AUC	
	ПЦР-ОТ RT-PCR	Глубокое секвенирование *Deep sequencing*
miR-106b-5p/-143-3p	0,842	0,299
miR-106b-5p/-146b-5p	0,884	0,833
miR-106b-5p/-24-3p	0,839	0,431
miR-15a-5p/-143-3p	0,889	0,486
miR-15a-5p/-146b-5p	0,922	0,875
miR-15a-5p/-143-3p	0,903	0,580
miR-192-5p/-146b-5p	0,917	0,840
miR-192-5p/-24-3p	0,850	0,528
miR-20a-5p/-146b-5p	0,945	0,938

Рис. 6. *Результаты ROC-анализа значений соотношений порогового цикла (Ct) для 9 реципрокных пар микроРНК. В таблице представлено сопоставление значений площади под кривой (AUC), полученных при ROC-анализе данных реакции обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) и глубокого секвенирования*

Fig. 6. *Results of ROC analysis of ratios of Ct values for 9 reciprocal pairs of microRNAs. The table shows a comparison of the area under the curve (AUC) values obtained from ROC analysis of reverse transcription with following polymerase chain reaction (RT-PCR) and deep sequencing data*

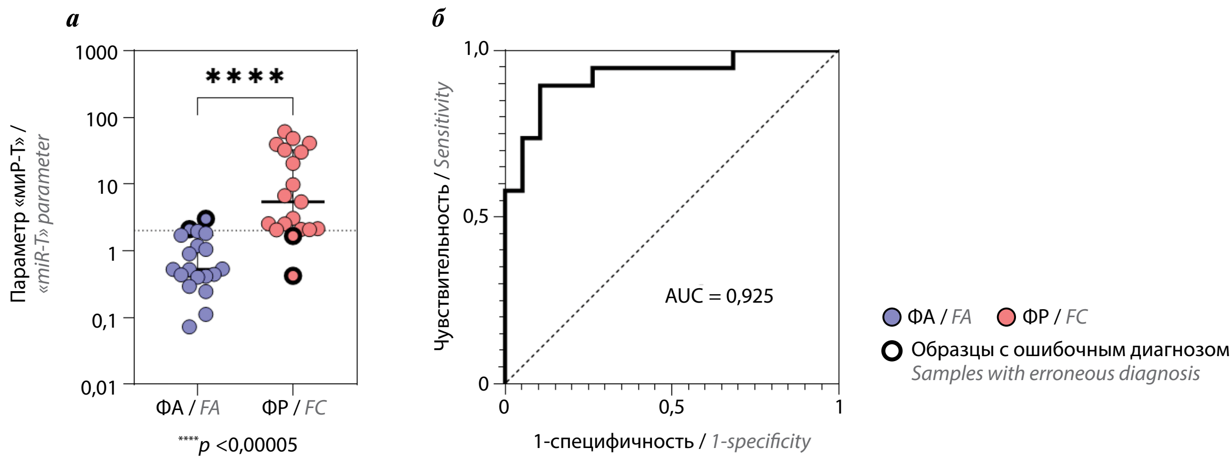


Рис. 7. *Диагностическая характеристика параметра «миР-Т» при дифференциальной диагностике фолликулярной аденомы (ФА) и фолликулярного рака (ФР) щитовидной железы: а — распределение значений параметра «мир-Т» в группах ФА и ФР. Статистическая значимость различий в значениях парметра «мир-Т» между группами ФА и ФР оценена с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни; б — ROC-кривая и значение площади под кривой (AUC) для параметра «миР-Т» в группах ФА и ФР*

Fig. 7. *Diagnostic characteristics of the "miR-T" parameter in the differential diagnosis of follicular adenoma (FA) and follicular carcinoma (FC) samples of the thyroid: a — distribution diagram of the "miR-T" parameter in the FA and FC groups. "miR-T" parameter values in groups FA vs FC was assessed using the non-parametric U-Mann–Whitney test; б — ROC curve and area under the curve (AUC) value for the "miR-T" parameter in the FA and FC groups*

ФА и ФР с чувствительностью 89,5 %, специфичностью 90 %, ППЗ 89,5 %, ОПЗ 90 % и точностью 89,7 %. Диагностическая характеристика параметра «мир-Т» при дифференциальной диагностике ФА и ФР представлена на рис. 7.

Разработанный диагностический критерий допустил ошибки в 4 из 40 случаев (результаты представлены на рис. 7, *а*). Это указывает на необходимость его дальнейшей оптимизации, для которой необходимо большее число цитологических образцов с верифицированным диагнозом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Этапы разработки. В статье представлен многоэтапный процесс создания тест-системы «миР-ТИРОИД» для дифференциальной диагностики ФА и ФР, который схематично представлен на рис. 8.

В нашем случае этот процесс занял более 7 лет, так как включал исследования, результаты которых не нашли практического применения, и был сопряжен с решением ряда методологических и организационных вопросов. Полученный опыт позволяет предположить, что при правильном планировании аналогичные тест-

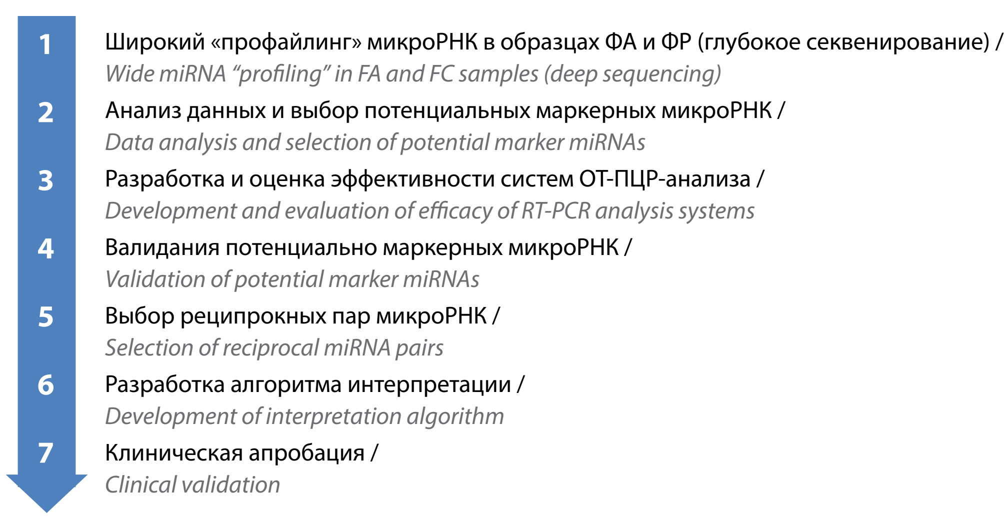


Рис. 8. *Процесс разработки тест-системы «миР-ТИРОИД». ФА — фолликулярная аденома; ФР — фолликулярный рак; ОТ-ПЦР — реакция обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией*

Fig. 8. *The development process of the miR-THYROID test-system. FA — follicular adenoma; FC — follicular carcinoma; RT-PCR — reverse transcription with following polymerase chain reaction*

системы на основе анализа микроРНК для решения других клинических задач могут быть разработаны в течение 2–3 лет. При этом важно понимать, что результаты, полученные с помощью разных аналитических технологий, могут не совпадать. Бóльшая часть молекул, выбранных на основе глубокого секвенирования, была исключена из работы на последующих этапах. В то же время 3 реципрокные пары, формируемые miR-24-3p, имеют высокий диагностический потенциал лишь при анализе с помощью ОТ-ПЦР, но не глубокого секвенирования (см. рис. 6). В целом существующие технологии анализа микроРНК еще далеки от совершенства, поэтому отбор потенциально маркерных молекул целесообразно начинать с широкого «профайлинга» и проводить тем методом, который в дальнейшем планируется использовать в диагностической тест-системе.

Ограничения исследования. Основным ограничением исследования представляется незначительный размер коллекции образцов биологического материала ($n = 40$). Имевшаяся коллекция образцов позволяла оценить диагностический потенциал технологии анализа микроРНК, но не обеспечивала возможность разработки и валидации надежного метода интерпретации результатов ПЦР. Комплексная оценка результатов количественного анализа нескольких взаимосвязанных маркеров может быть выполнена с учетом многих параметров и с применением методов машинного обучения [33], но эти подходы требуют использования относительно больших баз данных и многочисленных коллекций биологических образцов. В представленном исследовании применен аналитический алгоритм, адаптированный к небольшому количеству образцов, который включал определенную последовательность действий:

1) определение значений ratio для 9 реципрокных пар маркерных микроРНК;
2) нормализацию этих показателей в рамках исследуемой группы образцов;
3) вычисление для каждого образца среднего арифметического 9 специфических значений ratio. Полученное таким образом значение и являлось параметром «миР-Т».

Предполагалось, что диагностический параметр «миР-Т», отражающий комплексные изменения экспрессии 7 маркерных молекул микроРНК, будет иметь диагностический потенциал, что и было доказано. Для усовершенствования метода анализа и интерпретации результатов ПЦР предполагается провести дополнительные исследования, сформировать более репрезентативную когорту образцов и разработать более «аккуратные» аналитические алгоритмы.

Перспективы клинического применения. Показатели диагностической значимости тест-системы «миР-ТИРОИД» и других технологий, разработанных для

Таблица 2. *Показатели диагностической значимости тест-систем для анализа материала тонкоигольной аспирационной биопсии узлов щитовидной железы III–IV категории по системе Bethesda*

Table 2. *Diagnostic performance indicators of test systems for the analysis of fine needle aspiration material from thyroid nodules with Bethesda III–IV cytological diagnoses*

Тест-система Test system	Категория по системе Bethesda* Category per the Bethesda system*	Число образцов, *n* Number of samples, *n*	Чувствительность Sensitivity	Специфичность Specificity	ППЗ PPS	ОПЗ NPS	Источник References
7-генная панель 7-gene panel test	III	86	67	64	43	83	[5]
	IV	34	67	90	80	82	[5]
	III–IV	131	48	95	67	91	[6]
	III–IV	112	86	77	54	94	[7]
ThyroSeq v3	III–IV	74	–	–	78	76	[8]
	III	127	96	48	–	92	[34]
	IV		92	44	–	78	[34]
	III–IV	60	100	31	54	100	[35]
Afirma-GSC	III–IV	70	97	36	63	91	[35]
	III–IV	–	99	27	30	91	[36]
ThyGeNEXTThyraMIR	III–IV	–	89	85	66	96	[36]
	III–IV	47	57	65	–	–	[16]
ThyroidPrint	III–IV	270	91	88	78	95	[13]
mir-THYpe	III–IV	168	89	82	66	95	[14]
«миР-ТИРОИД»	IV	40	89	90	89	90	–

**III категория по системе Bethesda – атипия неясного значения/ фолликулярное поражение, IV категория по системе Bethesda – фолликулярная неоплазия/подозрение на фолликулярную неоплазию.*
***Примечание.** ППЗ – положительное прогностическое значение; ОПЗ – отрицательное прогностическое значение.*
**Category III per the Bethesda system is atypia of undetermined significance/follicular lesion; category IV per the Bethesda system is follicular neoplasm/ suspicious for follicular neoplasm.*
***Note.** PPS – positive prognostic significance; NPS – negative prognostic significance.*

вспомогательной диагностики узлов ЩЖ III–IV категории по системе Bethesda, представлены в табл. 2.

Важной характеристикой является баланс чувствительности и специфичности, который выгодно отличает «миР-ТИРОИД» от таких тест-систем, как 7-генная панель, ThyroSeq v3 и Afirma-GSC/GEC. Сравнение этой технологии с тест-системами, основанными на ОТ-ПЦР-анализе панелей молекул мРНК (ThyroidPrint) или микроРНК (mir-THYpe), демонстрирует сопоставимые результаты. В целом можно констатировать, что каждый из разработанных методов предполагает диагностические ошибки. Их число и потенциальный вред здоровью пациентов могут быть снижены при четком понимании ограничений каждой технологии. Тест-система «миР-ТИРОИД» разработана для решения задачи дифференциальной диагностики ФА и ФР, поэтому она должна применяться только в случае цитологического диагноза «фолликулярная неоплазия» (категория IV по системе Bethesda). Другие методы, представленные в табл. 2, имеют более широкие показания к применению. Кроме того, использование набора «миР-ТИРОИД» предполагает определенную серую зону значений параметра «мир-Т». Для безопасного применения этой тест-системы в клинической практике эта зона должна быть четко ограничена, что потребует дополнительных исследований.

Возможности оптимизации. Как показали представленные результаты, набор «миР-ТИРОИД» не идеален, но у разработчиков есть понимание путей его оптимизации. Во-первых, любые эпигенетические (в нашем случае – экспрессионные) изменения имеют количественный характер, поэтому их максимальная диагностическая эффективность может быть обеспечена расширением панели и сочетанием маркеров разной природы. Так, использование набора «миР-ТИРОИД» в сочетании с анализом генетических мутаций или экспрессии других типов РНК (мРНК, пивиРНК) может повысить его диагностический потенциал или расширить область его применения. Во-вторых, алгоритм интерпретации результатов ПЦР-анализа панели маркеров может быть оптимизирован с помощью методов машинного обучения. Как уже отмечалось, для эффективной реализации этих технологий необходимы большие массивы экспериментальных данных. Поэтому для оптимизации тест-системы «миР-ТИРОИД» нужно использовать набор в тестовом режиме, накапливать базу данных, разрабатывать и совершенствовать аналитические алгоритмы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внедрение в медицинскую практику методов анализа новых диагностических маркеров является длительным процессом, который включает решение технических, организационных и клинических вопросов. Разработка технологии анализа микроРНК и алгоритма интерпретации его данных является предметом молекулярной онкологии. Результаты этой работы представлены в настоящей статье. В соответствии с приказом Росздравнадзора от 05.12.2024 № 6903 в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Петрова организовано производство тест-системы «миР-ТИРОИД» и начато его применение в клинической практике, что является первым шагом в решении организационных задач.

Проделанная нами работа дает возможность для решения клинических вопросов, включая обоснование показаний к применению тест-системы «миР-ТИРОИД», оценку клинической и экономической целесообразности ее использования и разработку соответствующих клинических рекомендаций. В случае успеха итоги финального этапа внедрения данного набора будут представлены в научных публикациях в течение ближайших лет.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Гринева Е.Н. Узловые образования в щитовидной железе. Диагностика и врачебная тактика. Проблемы эндокринологии 2003;49(6):59–62.
   Grineva E.N. Thyroid nodal masses. Diagnosis and medical tactics. Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology 2003;49:59–62. (In Russ.). DOI: 10.14341/probl11794
2. Fisher S.B., Perrier N.D. The incidental thyroid nodule. CA. Cancer J Clin 2018;68(2):97–105. DOI: 10.3322/caac.21447
3. Чойнзонов Е.Л., Решетов И.В., Иванов С.А. и др. Проект клинических рекомендаций по диагностике и лечению дифференцированного рака щитовидной железы у взрослых пациентов. Эндокринная хирургия 2023;16:5–29. DOI: 10.14341/serg12792
   Choinzonov E.L., Reshetov I.V., Ivanov S.A. et al. Draft of clinical guidelines for the diagnosis and treatment of differentiated thyroid cancer in adult patients. Endokrinnaya khirurgiya = Endocrine Surgery 2023;16:5–29. (In Russ.). DOI: 10.14341/serg12792
4. Gharib H., Papini E., Garber J.R. et al. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Associazione Medici Endocrinologi Medical Guidelines for Clinical Practice for the diagnosis and management of thyroid nodules – 2016 update appendix. Endocr Pract 2016;22(5):622–39. DOI: 10.4158/EP161208.GL
5. Bellevicine C., Migliatico I., Sgariglia R. et al. Evaluation of BRAF, RAS, RET/PTC, and PAX8/PPARg alterations in different Bethesda diagnostic categories: a multicentric prospective study on the validity of the 7-gene panel test in 1172 thyroid FNAs deriving from different hospitals in South Italy. Cancer Cytopathol 2020;128(2):107–18. DOI: 10.1002/cncy.22217
6. Bardet S., Goardon N., Lequesne J. et al. Diagnostic and prognostic value of a 7-panel mutation testing in thyroid nodules with indeterminate cytology: the SWEETMAC study. Endocrine 2021;71(2):407–17. DOI: 10.1007/s12020-020-02411-4
7. Tolaba N., Spedalletti Y., Bazzoni P. et al. Testing of mutations on thyroid nodules with indeterminate cytology: a prospective study of 112 patients in Argentina. Endocrinol Diabetes Nutr (English ed.) 2022;69(2):122–30. DOI: 10.1016/j.endien.2022.02.002

8. Sirotnikov S., Griffith C.C., Lubin D. et al. ThyroSeqoverview on indeterminate thyroid nodules: an institutional experience. Diagn Cytopathol 2024;52(7):353–61. DOI: 10.1002/dc.25311
9. Munoz-Zuluaga C.A., Heymann J.J., Solomon J.P. et al. Use of the Afirma Xpression Atlas for cytologically indeterminate, Afirma Genomic Sequencing Classifier suspicious thyroid nodules: clinicopathologic analysis with postoperative molecular testing. Am J Clin Pathol 2024;161(5):463–8. DOI: 10.1093/ajcp/aqad169
10. Kannan S., Aggarwal S., Shivaprasad K. et al. Pilot results of a cost effective NGS panel for prognostication of thyroid nodules/cancers. Indian J Endocrinol Metab 2022;26:S14. DOI: 10.4103/2230-8210.363719
11. Song Y., Liu J., Wang W., Ma T. Significance of molecular detection in diagnosis of benign and malignant thyroid nodules in China. J Clin Oncol 2021;39:e15028. DOI: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.e15028
12. Olmos R., Domínguez J.M., Vargas-Salas S. et al. ThyroidPrint®: clinical utility for indeterminate thyroid cytology. Endocr Relat Cancer 2023;30(11):e220409. DOI: 10.1530/ERC-22-0409
13. Zafereo M., McIver B., Vargas-Salas S. et al. A Thyroid Genetic Classifier correctly predicts benign nodules with indeterminate cytology: two independent, multicenter, prospective validation trials. Thyroid 2020;30(5):704–12. DOI: 10.1089/thy.2019.0490
14. Santos M.T., Rodrigues B.M., Shizukuda S. et al. Clinical decision support analysis of a microRNA-based thyroid molecular classifier: a real-world, prospective and multicentre validation study. eBioMedicine 2022;82:104137. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104137
15. Santos M.T.D., Buzolin A.L., Gama R.R. et al. Molecular classification of thyroid nodules with indeterminate cytology: development and validation of a highly sensitive and specific new miRNA-based classifier test using fine-needle aspiration smear slides. Thyroid 2018;28(12):1618–26. DOI: 10.1089/thy.2018.0254
16. Glass R.E., Marotti J.D., Kerr D.A. et al. Using molecular testing to improve the management of thyroid nodules with indeterminate cytology: an institutional experience with review of molecular alterations. J Am Soc Cytopathol 2022;11(2):79–86. DOI: 10.1016/j.jasc.2021.08.004
17. Титов С., Лукьянов С., Козорезова Е. и др. Валидация дооперационной диагностики злокачественных опухолей щитовидной железы с помощью молекулярного классификатора. Вопросы онкологии 2022;68(6):741–51. DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-6-741-751
Titov S., Lukyanov S., Kozorezova E. et al. Validation of preoperative diagnosis of malignant thyroid tumors using a molecular classifier. Voprosy onkologii = Oncology Issues 2022;68(6):741–51. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-6-741-751
18. Chowdhury R., Hier J., Payne K.E. et al. Impact of molecular testing on surgical decision-making in indeterminate thyroid nodules: a systematic review and meta-analysis of recent advancements. Cancers (Basel) 2025;17(7):1156. DOI: 10.3390/cancers17071156
19. Raghunathan R., Longstaff X.R., Hughes E.G. et al. Diagnostic performance of molecular testing in indeterminate (Bethesda III and IV) thyroid nodules with Hürthle cell cytology. Surgery 2024;175(1):221–7. DOI: 10.1016/j.surg.2023.05.046
20. Tumati A., Egan C.E., Lee-Saxton Y.J. et al. Clinical utility of a microRNA classifier in cytologically indeterminate thyroid nodules with RAS mutations: a multi-institutional study. Surgery 2024;175(1):234–40. DOI: 10.1016/j.surg.2023.07.042
21. Бандык Я.А., Князева М.С., Гаранин А.Ю. и др. Возможности дифференциальной диагностики фолликулярных неоплазий щитовидной железы путем анализа малых некодирующих РНК. Вопросы онкологии 2024;70(2):189–201. DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-2-189-201
Bandyk Ya.A., Knyazeva M.S., Garanin A.Yu. et al. The possibilities of differential diagnosis of follicular neoplasia of the thyroid gland by analyzing small non-coding rnas. Voprosy onkologii = Oncology Issues 2024;70(2):189–201. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-2-189-201
22. Knyazeva M., Korobkina E., Karizky A. et al. Reciprocal dysregulation of MiR-146b and MiR-451 contributes in malignant phenotype of follicular thyroid tumor. Int J Mol Sci 2020;21(17):5950. DOI: 10.3390/ijms21175950
23. Князева М.С., Шестопалова Т.М., Забегина Л.М. и др. Возможность дифференциальной диагностики очаговых образований поджелудочной железы путем анализа микроРНК. Южно-Российский онкологический журнал 2023;4:20–35.
Knyazeva M.S., Shestopalova T.M., Zabegina L.M. et al. The possibility of differential diagnosis of pancreatic nodules by microRNA analysis. Yuzhno-Rossijskiy onkologicheskiy zhurnal = South Russian Journal of Oncology 2023;4:20–35. (In Russ.).
24. Князева М.С., Загоруйко В.А., Хохлова А.В. и др. Уровень экспрессии miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-367, miR-371, miR-372, miR-373, miR-10b, miR-21 и miR-93 клетками различных гистотипов герминогенных опухолей яичка. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(1):20–32. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-20-32
Knyazeva M.S., Zagoruiko V.A., Khokhlova A.V. et al. Expression of miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-367, miR-371, miR-372, miR-373, miR-10b, miR-21 and miR-93 in cells of different histotypes of testicular germ cell tumors. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2022;9(1):20–32. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-20-32
25. Wingett S.W., Andrews S. FastQ Screen: a tool for multi-genome mapping and quality control. F1000Research 2018;7:1338. DOI: 10.12688/f1000research.15931.2
26. Cock P.J.A., Antao T., Chang J.T. et al. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. Bioinformatics 2009;25(11):422–3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp163
27. Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. Nucleic Acids Res 2019;47(D1):D155–62. DOI: 10.1093/nar/gky1141
28. Mittal A., Ali S.E., Mathews D.H. Using the RNAstructure software package to predict conserved RNA structures. Curr Protoc 2024;4(11):e70054. DOI: 10.1002/cpz1.70054
29. Marshall O.J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. Bioinformatics 2004;20(15):2471–2. DOI: 10.1093/bioinformatics/bth254
30. Androvic P., Valihrach L., Elling J. et al. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. Nucleic Acids Res 2017;45(15):e144, DOI: 10.1093/nar/gkx588
31. Коробкина Е.А., Князева М.С., Киль Ю.В. и др. Сравнительный анализ методов детекции микроРНК с помощью метода обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Клиническая лабораторная диагностика 2018;63:722–8. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-11-722-728
Korobkina E.A., Knyazeva M.S., Kil Yu.V. et al. Comparative analysis of microRNA detection methods using reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics 2018;63:722–8. (In Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-11-722-728
32. Stokowy T., Wojtas B., Jarzab B. et al. Two-miRNA classifiers differentiate mutation-negative follicular thyroid carcinomas and follicular thyroid adenomas in fine needle aspirations with high specificity. Endocrine 2016;54(2):440–7. DOI: 10.1007/s12020-016-1021-7
33. Kniazeva M., Zabegina L., Shalaev A. et al. NOVAprep-miR-Cervix: new method for evaluation of cervical dysplasia severity based on analysis of six miRNAs. Int J Mol Sci 2023;24(11):9114. DOI: 10.3390/ijms24119114

34. Desai D., Lepe M., Baloch Z.W., Mandel S.J. ThyroSeq v3 for Bethesda III and IV: an institutional experience. Cancer Cytopathol 2021;129(2):164–70. DOI: 10.1002/cncy.22362
35. Livhits M.J., Zhu C.Y., Kuo E.J. et al. Effectiveness of molecular testing techniques for diagnosis of indeterminate thyroid nodules. JAMA Oncol 2021;7(1):70. DOI: 10.1001/jamaoncol.2020.5935
36. Vargas-Salas S., Martínez J.R., Urra S. et al. Genetic testing for indeterminate thyroid cytology: review and meta-analysis. Endocr Relat Cancer 2018;25(3):R163–77. DOI: 10.1530/ERC-17-0405

Благодарность. Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам отдела анализа и управления проектами по медицинским изделиям Центра трансфера медицинских технологий ФГБУ «Научный центр экспертизы медицинского применения» Минздрава России, главному аналитику Анастасии Александровне Полищук и ведущему аналитику Татьяне Витальевне Парфеновой за поддержку проекта.
Acknowledgment. The team of authors would like to thank the staff of the Department of Analysis and Project Management for Medical Devices at the Center for Medical Technology Transfer of the Scientific Center for Medical Application Expertise, Ministry of Health of Russia, chief analyst Anastasia Aleksandrovna Polishchuk and leading analyst Tatiana Vitalievna Parfenova for supporting the project.

Вклад авторов

А.В. Шалаев, М.С. Александрова, П.А. Локтева: выделение РНК, дизайн и тестирование систем для реакции обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией микроРНК, проведение полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией;
Л.М. Забегина: статистический анализ данных глубокого секвенирования и реакции обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией, разработка и тестирование алгоритма анализа данных полимеразной цепной реакции;
Я.А. Бандык: сбор данных, анализ данных секвенирования нового поколения;
Л.А. Красильникова, А.Г. Куляш, С.Л. Воробьев: морфологический анализ, редактирование;
Р.А. Черников, И.В. Слепцов: подбор пациентов, анализ клинических данных, редактирование;
А.В. Малек: разработка концепции и дизайна исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions

A.V. Shalaev, M.S. Aleksandrova, P.A. Lokteva: RNA isolation, design and testing of systems for reverse transcription with subsequent polymerase chain reaction of microRNAs, conducting polymerase chain reaction with reverse transcription;
L.M. Zabegina: statistical analysis of deep sequencing and reverse transcription with subsequent polymerase chain reaction, development and testing of an algorithm for analyzing polymerase chain reaction data;
Ya.A. Bandyk: data collection, analysis of next-generation sequencing data;
L.A. Krasil'nikova, A.G. Kulyash, S.L. Vorob'ev: morphological analysis, editing:
R.A. Chernikov, I.V. Sleptsov: selection of patients, analysis of clinical data, editing;
A.V. Malek: development of the concept and design of the research, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors
А.В. Шалаев / A.V. Shalaev: https://orcid.org/0000-0002-6148-6994
Л.М. Забегина / L.M. Zabegina: https://orcid.org/0000-0003-0827-1641
М.С. Александрова / M.S. Aleksandrova: https://orcid.org/0000-0002-2079-5061
П.А. Локтева / P.A. Lokteva: https://orcid.org/0009-0001-8720-5062
Я.А. Бандык / Ya.A. Bandyk: https://orcid.org/0000-0001-6148-6778
А.Г. Куляш / A.G. Kulyash: https://orcid.org/0000-0002-9916-6232
С.Л. Воробьев / S.L. Vorob'ev: https://orcid.org/0000-0002-7817-9069
Р.А. Черников / R.A. Chernikov: https://orcid.org/0000-0002-3001-664X
И.В. Слепцов / I.V. Sleptsov: https://orcid.org/0000-0002-1903-5081
А.В. Малек / A.V. Malek: https://orcid.org/0000-0001-5334-7292

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

Финансирование. Исследование финансировалось в рамках государственного задания Минздрава России на 2021–2023 гг. «Разработка и клиническая апробация методов диагностики и прогнозирования эффекта терапии онкологических заболеваний на основе анализа микроРНК в биопсийном материале» (НИОКР: 121032300206-4).
Funding. The study was supported within the framework of the State Assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation for 2021–2023 "Development and clinical testing of methods for diagnosing and predicting the effectiveness of cancer therapy based on the analysis of microRNA in mental biomaterial" (R&D: 121032300206-4).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (протокол № 1 от 28.01.2021).
Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the local ethics committee of N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 1 dated 28.01.2021).
All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 22.07.2025. **Принята к публикации:** 29.08.2025. **Опубликована онлайн:** 10.12.2025.
Article submitted: 22.07.2025. **Accepted for publication:** 29.08.2025. **Published online:** 10.12.2025.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-139-148

Роль дисульфид-изомераз в посттрансляционной модификации NaPi2b (*SLC34A2*) в клетках карциномы яичника

Р.А. Власенкова, И.А. Рыбачук, Р.Г. Киямова

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

Контакты: Рамзия Галлямовна Киямова *kiyamova@mail.ru;* Рамиля Ахметовна Власенкова *r.mukhamadeeva@yandex.ru*

Введение. Рак яичников характеризуется высокой частотой развития рецидивов и химиорезистентности, поэтому поиск новых маркеров для прогнозирования заболевания и понимания фундаментальных процессов при онкогенной трансформации клеток яичника остается актуальной задачей. Мембранный фосфатный транспортер NaPi2b, кодируемый геном *SLC34A2*, высоко экспрессируется при данной патологии и служит мишенью для противоопухолевой терапии моноклональными антителами, направленными против эпитопа MX35. Мы показали, что доступность эпитопа MX35 зависит от конформации его большого внеклеточного домена, обусловленной дисульфидными связями (S-S-связи) между цистеинами в положениях 303, 322, 328 и 350. Известно, что белки семейства дисульфид-изомераз (protein disulfide isomerase, PDI) регулируют образование и перестройку S-S-связей.

Цель исследования – сетевой анализ взаимодействий SLC34A2 и генов семейства PDI, а также их продуктов в образцах нормальной и опухолевой тканей яичников для выявления ключевых регуляторов посттрансляционной модификации NaPi2b в опухолевых клетках.

Материалы и методы. Из баз данных Gene Ontology, String, KEGG, Reactome, WikiPathways, InterPro и Pfam получены сведения о взаимодействиях продуктов отобранных генов. На основе информации о коэкспрессии и белок-белковых взаимодействиях построены и проанализированы сети взаимодействий для 16 генов семейства PDI и гена *SLC34A2* и их продуктов.

Результаты. В ходе топологического анализа выявлено отсутствие структурного сходства сетей (коэффициент кофенетической корреляции = 0,082), при этом в опухолях специфически ключевыми оказались гены *CASQ1*, *CASQ2*, *ERP29*, *PDIA5*, *TMX4* и *SLC34A2*. Важнейшим результатом является объединение генов *ERP29* и *SLC34A2* в общий функциональный модуль с обратной коэкспрессией (коэффициент корреляции Спирмена = –0,42; p <0,05) исключительно в сети взаимодействий в опухолевых клетках. Это указывает на потенциальную роль белка ERP29 в патологической перестройке дисульфидных связей внеклеточного домена NaPi2b и обеспечении доступности опухолеассоциированного эпитопа MX35 в трансформированных клетках.

Заключение. Сетевой анализ выявленных принципиальных различий во взаимодействиях генов PDI и гена *SLC34A2* в норме и при опухолевой трансформации, в частности взаимодействие генов *ERP29* и *SLC34A2*, открывает новые возможности для разработки терапевтических стратегий, в том числе для терапии моноклональными антителами рака яичников.

Ключевые слова: NaPi2b, *SLC34A2*, дисульфид-изомеразы, PDI, рак яичника, экспрессия гена, белок-белковое взаимодействие

Для цитирования: Власенкова Р.А., Рыбачук И.А., Киямова Р.Г. Роль дисульфид-изомераз в посттрансляционной модификации napi2b (*SLC34A2*) в клетках карциномы яичника. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(4):139–48.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-139-148

The role of disulfide isomerases in post-translational modification of NaPi2b (*SLC34A2*) in ovarian carcinoma cells

R.A. Vlasenkova, I.A. Rybachuk, R.G. Kiyamova

Biomarker Research Laboratory, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University; Bld. 1, 18 Kremlyovskaya St., Kazan 420008, Russia

Contacts: Ramziya Gallyamovna Kiyamova *kiyamova@mail.ru;* Ramilia Akhmetovna Vlasenkova *r.mukhamadeeva@yandex.ru*

Introduction. Ovarian cancer is characterized by high recurrence rate and chemoresistance, therefore identification of new markers for prognosis of disease progression and understanding of fundamental processes during oncogenic transformation remain important problems. Membrane phosphate transporter NaPi2b coded by the *SLC34A2* gene is highly expressed in this pathology and serves as a target for antitumor therapy with monoclonal antibodies against MX35 epitope. We have shown that availability of MX35 epitope depends on the conformation of its large extracellular domain determined by disulfide bonds (S-S-bonds) between cysteines in positions 303, 322, 328 and 350. Protein disulfide isomerase (PDI) family proteins regulate formation and rearrangement of S-S-bonds.

Aim. Network analysis of interactions between *SLC34A2* and PDI family genes, as well as their products in samples of normal and tumor ovarian tissues for identification of key regulators of posttranslational modification of NaPi2b in tumor tissues.

Materials and methods. Data on interactions of the selected genes were obtained from the Gene Ontology, String, KEGG, Reactome, WikiPathways, InterPro and Pfam databases. Based on the information on co-expression and protein-protein interactions, networks of interactions between 16 genes of the PDI family and *SLC34A2* gene and their products were constructed and analyzed.

Results. Topological analysis revealed absence of structural similarity of the networks (cophenetic correlation coefficient = 0.082), and in tumors specific key genes were identified: *CASQ1*, *CASQ2*, *ERP29*, *PDIA5*, *TMX4* and *SLC34A2*. The main result is conflation of *ERP29* and *SLC34A2* genes into common functional module with reverse co-expression (Spearman's rank correlation coefficient = –0.42; p <0.05) only in the tumor cell interaction network. This indicates potential role of ERP29 protein in pathological rearrangement of disulfide bonds of the NaPi2b extracellular domain and maintenance of availability of tumor-associated MX35 epitope in transformed cells.

Conclusion. Network analysis of the principal differences in interactions between PDI genes and *SLC34A2* gene in normal conditions and in tumor transformation, interaction of *ERP29* and *SLC34A2* genes in particular, opens new possibilities for development of therapeutic strategies, including monoclonal antibodies, for ovarian cancer treatment.

Keywords: NaPi2b, *SLC34A2*, protein disulfide isomerase, PDI, ovarian cancer, gene expression, protein-protein interaction

For citation: Vlasenkova R.A., Rybachuk I.A., Kiyamova R.G. The role of disulfide isomerases in post-translational modification of NaPi2b (*SLC34A2*) in ovarian carcinoma cells. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(4):139–48. (In Russ.).
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-139-148

ВВЕДЕНИЕ

Рак яичников (РЯ) занимает 8-е место по распространенности и 2-е по летальности среди заболеваний женской репродуктивной системы [1]. Более чем у 60 % пациенток диагностируют заболевание на III–IV стадии, что обусловливает низкие показатели 5-летней выживаемости – лишь 31 % [2]. При высокозлокачественной серозной карциноме яичников риск развития рецидива в первые 18–24 мес после завершения платиново-таксановой химиотерапии достигает 80–90 % [3, 4]. Стандартная тактика лечения РЯ включает радикальную циторедукцию с последующей химиотерапией на основе карбоплатина и паклитаксела [4, 5]. Несмотря на оптимальную резекцию органа при подобном диагнозе, большинство опухолей трансформируется в химиорезистентные клоны, что приводит к возникновению медикаментозно-невосприимчивых рецидивов и снижает общую выживаемость [3]. Проблема усугубляется тем, что на сегодняшний день для пациенток с карциномой яичника не существует высокоэффективной таргетной терапии в связи с отсутствием специфичных мишеней.

Одной из многообещающих мишеней для таргетной терапии, в том числе моноклональными антителами, в последнее время считается Na-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b [6, 7]. Этот транспортер (ген *SLC34A2*) содержит от 8 до 10 трансмембранных доменов и большой внеклеточный домен (ВКД), где располагается опухолеассоциированный эпитоп MX35, доступность которого обеспечивается конформацией, обусловленной дисульфидными связями в районе его ВКД [8]. В настоящее время разработан целый ряд антител, коньюгированных с цитостатиками, направленных против транспортера NaPi2b, включая эпитоп MX35 [9–13]. Цистеинсодержащие мотивы в ВКД образуют сеть дисульфидных мостиков между цистеинами в положениях 303, 322, 328 и 350, в то время как аспарагиновые мотивы в ВКД определяют N-гликозилирование в положениях 295, 308, 313, 321, 335 и 340, обусловливающих фолдинг белка и доступность эпитопа MX35 [8, 14, 15]. Мы предполагаем, что восстановление дисульфидных связей дитиотреитолом маскирует эпитоп и снижает иммунореактивность NaPi2b *in vitro*, тогда как гипоксически измененное pH и изменения микростромы опухоли могут приводить к реаранжировке S-S-связей и изменению паттерна гликозилирования, делая MX35 более экспонированным и обеспечивая селективное накопление терапевтических конъюгатов в опухолевых клетках.

Известно, что белки семейства дисульфид-изомераз (protein disulfide isomerase, PDI) катализируют образование, изомеризацию и разрыв S-S-связей. Результаты иммуногистохимического исследования 415 образцов серозного РЯ показали гиперэкспрессию нескольких генов семейства PDI (PDI, PDIA6, PDIR, ERp57, ERp72 и AGR3), коррелирующую с ухудшением прогноза заболевания [16]. Необратимый ингибитор PACMA-31 ковалентно блокирует активные цистеиновые остатки PDI, подавляя рост овариальных клеточных линий и ксенотрансплантатов *in vivo* без токсичности для нормальных тканей [16], что подтверждает ключевую роль дисульфидного «клея» в маскировании или экспозиции эпитопов мембранных антигенов, возможно, включая и NaPi2b.

Для системного изучения взаимодействий генов и их продуктов применяют сетевой анализ, позволяющий моделировать сети взаимных корреляций генов и их продуктов, а также выявлять кластеры с похожими паттернами взаимодействий. Подобная методика уже успешно использовалась для поиска иммуноассоциированных маркеров при РЯ и аннотации иммунных подтипов CAF-ассоциированных генов, что демонстрирует устойчивость метода к вариабельности и техническим артефактам, и его способность интегрировать мультиомиксные данные для идентификации ключевых хаб-генов [17].

Гипотеза нашего исследования сводится к тому, что дисрегуляция отдельных PDI-изоформ изменяет сетевую топологию взаимодействий *SLC34A2* и генов PDI, что может приводить к аномальному формированию S-S-связей в ВКД NaPi2b и повышать иммунодоступность опухолеассоциированного эпитопа MX35 в опухолевых клетках.

Цель исследования – выявление ключевых генов и их продуктов, вовлеченных в посттрансляционную модификацию NaPi2b, и оценка их потенциала в качестве диагностических и терапевтических мишеней при РЯ, а также для понимания возможного механизма распознавания эпитопа MX35 моноклональными антителами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источники данных и отбор образцов тканей яичника. В настоящем исследовании мы использовали данные из исследования E-MTAB-3732 [18], доступные в базе ArrayExpress [19]. Были собраны клинические характеристики пациентов (идентификаторы образцов, тип рака, локализация опухоли) и сведения об уровнях экспрессии генов семейства PDI человека, а также гена *SLC34A2*.

Отбор данных об образцах тканей яичника проводили на основании аннотации: наличие/отсутствие заболевания. В группу образцов опухолей вошли образцы карциномы, аденокарциномы, серозной карциномы яичников, РЯ, серозного эпителиального РЯ, папиллярной серозной аденокарциномы, пограничной серозной опухоли яичников, эндометриоидного РЯ и папиллярной серозной аденокарциномы яичников ($n = 539$). В контрольную группу (условно-нормальных образцов) включены образцы с аннотацией “normal” ($n = 40$)

Анализ коэкспрессии генов и идентификация белковых взаимодействий с использованием биоинформатических баз данных. В настоящем исследовании сведения о взаимодействиях продуктов отобранных генов получены из баз данных Gene Ontology, String, KEGG, Reactome, WikiPathways, InterPro и Pfam (табл. 1). Из каждой базы извлекали сведения о совместной субкле-

Таблица 1. *Количество выявленных белок-белковых взаимодействий NaPi2b и белков дисульфид-изомераз (по базам данных)*
Table 1. *Number of identified protein-protein interactions between NaPi2b and protein disulfide isomerase (by databases)*

База данных Database	Количество найденных взаимодействий, *n* Number of identified interactions, *n*	Тип взаимодействия Type of interaction
Gene Ontology	189	Субклеточная локализация, участие в биологических процессах Subcellular location, participation in biological processes
String	145	Субклеточная локализация, кластеры, участие в биологических процессах Subcellular location, clusters, participation in biological processes
KEGG	113	Участие в биологических процессах Participation in biological processes
Reactome	89	Семейства белков Protein families
WikiPathways	37	Участие в биологических процессах Participation in biological processes
InterPro	174	Кластеры, семейства белков Clusters, protein families
Pfam	125	Кластеры, семейства белков Clusters, protein families

точной локализации, участии белков в одних и тех же биологических процессах и семействах, а также оценочные коэффициенты взаимодействия NaPi2b и белков семейства PDI. При p <0,05 взаимодействия отбирали по уровню значимости, в противном случае учитывали все доступные коэффициенты.

Мы провели анализ коэкспрессии гена *SLC34A2* и генов семейства PDI в образцах нормальной и опухолевой тканей яичников. Для каждой пары генов рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена, после чего формировали корреляционные матрицы. Для дальнейшего анализа учитывали только статистически значимые взаимодействия (p <0,05).

Основной задачей данного этапа было объединение разрозненной информации в один набор, содержащий обобщенные данные о коэкспрессии гена *SLC34A2* и генов семейства PDI и взаимодействии продуктов данных генов; при дублировании одной пары белков в нескольких базах использовали медиану оценок взаимодействия.

Построение и сравнение сетей коэкспрессии и белок-белковых взаимодействий. При построении сетей вершины соответствовали отобранным генам или их продуктам, а ребра отражали выявленные взаимодействия. Вес ребра рассчитывали как интегральную оценку 2 типов связей – коэффициентов коэкспрессии генов и оценок белок-белковых взаимодействий из открытых баз данных – с последующей нормализацией методом Z-преобразования. Оба типа данных рассматривались как равнозначные без применения весовых коэффициентов. Интеграция обоих источников без априорного приоритета одного над другим позволяет выявить функциональные связи, подтвержденные как на транскриптомном, так и на протеомном уровнях, что повышает достоверность результатов. При наличии данных об одном и том же согласованном взаимодействии из нескольких источников использовали медиану полученных оценок взаимодействий. Все вершины в сетях коэкспрессии и белок-белковых взаимодействий были обозначены символами генов.

В рамках топологического анализа определяли центральные гены, входившие в верхние 20 % узлов (генов) по показателю центральности узла (показатель важности гена в сети на основе его связей). Для выявления функциональных модулей (кластеры плотно связанных генов) применяли алгоритм обнаружения сообществ на основе параметра связности.

Сравнение сетей коэкспрессии и белок-белковых взаимодействий проводили методом агломеративной иерархической кластеризации с полной связностью. По каждой сети строили дендрограмму, а затем объединяли их в танглограмму – визуализацию, показывающую перемещения объектов между иерархиями. Для количественной оценки различий между структурами сетей рассчитывали корреляцию между матрицами кофенетических расстояний полученных дендрограмм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика набора данных образцов нормальной и опухолевой тканей яичников. Для анализа экспрессии генов из исследования E-MTAB-3732 [18] из базы ArrayExpress [19] отобраны 539 образцов опухолей яичника и 40 образцов условно-нормальной ткани. Из полученных наборов данных извлечены показатели экспрессии гена *SLC34A2* и генов семейства PDI человека (табл. 2).

Таблица 2. *Гены семейства дисульфид-изомераз человека, включенные в анализ*

Table 2. *Human protein disulfide isomerase family genes included in the analysis*

Ген Gene	Другие названия гена/белка Other names of the gene/protein	Белок Protein	Локализация на хромосоме Location on chromosome
AGR2	*XAG-2, HAG-2, AG2, PDIA17*	Гомолог белка 2 переднего градиента Anterior gradient protein 2 homolog	7p21.3
AGR3	*HAG3, hAG-3, BCMP11, PDIA18*	Гомолог белка 3 переднего градиента Anterior gradient protein 3 homolog	7p21.1
CASQ1	*PDIB1*	Кальсеквестрин-1 Calsequestrin-1	1q21
CASQ2	*PDIB2*	Кальсеквестрин-2 Calsequestrin-2	1p13.3-p11
DNAJC10	*MTHr, ERdj5*	Гомолог DnaJ (Hsp40), член подсемейства C10 DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10	2q32.1
ERP27	*FLJ32115, PDIA8,* ERp27	Белок эндоплазматического ретикулума 27 Endoplasmic reticulum resident protein 27	12p12.3
ERP29	*PDIA9*, ERp28, ERp31, ERp29PDI–DB	Белок эндоплазматического ретикулума 29 Endoplasmic reticulum resident protein 29	12q24.13

Окончание табл. 2
End of table 2

Ген Gene	Другие названия гена/белка Other names of the gene/protein	Белок Protein	Локализация на хромосоме Location on chromosome
ERP44	*KIAA0573, PDIA10*	Белок эндоплазматического ретикулума 44 Endoplasmic reticulum resident protein 44	9q22.33
P4HB	*DIA1, PROHB, DSI, GIT, PDI, PO4HB,* P4Hb	Дисульфидизомераза белка, β-субъединица пролил-4-гидроксилазы Protein disulfide-isomerase, β-subunit prolyl 4-hydroxylase	17q25
PDIA2	*PDA2, PDIp*	Дисульфид-изомераза A2 Protein disulfide-isomerase A2	16p13.3
PDIA3	*HsT17083*, P58, ERp61, ERp57, ERp60, GRP57, PI-PLC	Дисульфид-изомераза A3 Protein disulfide-isomerase A3	15q15
PDIA4	ERP70, ERP72	Дисульфид-изомераза A4 Protein disulfide-isomerase A4	7q35
PDIA5	*PDIR, FLJ30401*	Дисульфид-изомераза A5 Protein disulfide-isomerase A5	3q21.1
PDIA6	P5, ERp5	Дисульфид-изомераза A6 Protein disulfide-isomerase A6	2p25.1
PDILT	*PDIA7*, ERp65	Дисульфид-изомераза-подобный белок яичка Protein disulfide-isomerase-like protein of the testis	16p12.3
TMX1	*TMX, PDIA11*	Тиоредоксин-связанный трансмембранный белок 1 Thioredoxin-related transmembrane protein 1	14q22.1
TMX2	*PDIA12*	Тиоредоксин-связанный трансмембранный белок 2 Thioredoxin-related transmembrane protein 2	11cen-q22.3
TMX3	*FLJ20793, KIAA1830, PDIA13*	Тиоредоксин-связанный трансмембранный белок 3 Thioredoxin-related transmembrane protein 3	18q22
TMX4	*DJ971N18.2, KIAA1162, PDIA14*	Тиоредоксин-связанный трансмембранный белок 4 Thioredoxin-related transmembrane protein 4	20p12
TXNDC5	*MGC3178, FLJ21353, FLJ90810, PDIA15, EndoPDI, Hcc-2, ERp46*	Белок, содержащий тиоредоксиновый домен 5 Thioredoxin domain-containing protein 5	6p24.3
TXNDC12	*TLP19, hAG-1, AGR1, PDIA16,* ERP18, ERP19	Белок, содержащий тиоредоксиновый домен 12 Thioredoxin domain-containing protein 12	1p32.3

Далее мы провели анализ коэкспрессии генов семейства PDI и гена *SLC34A2* для обеих категорий образцов. Полные матрицы корреляций представлены в виде тепловых карт (рис. 1).

Параллельно собраны сведения о взаимодействиях изучаемых белков (21 ген семейства PDI и ген *SLC34A2*), включающие со-встречаемость мутаций, совместную субклеточную локализацию, участие в одних и тех же биологических процессах и наличие общих белковых доменов. В результате объединения данных из всех источников идентифицировано 971 взаимодействие транспортера NaPi2b и белков семейства PDI (см. табл. 1).

По результатам анализа коэкспрессия и белок-белковые взаимодействия обнаружены между 16 генами семейства PDI (*AGR2*, *CASQ1*, *CASQ2*, *DNAJC10*, *ERP29*, *ERP44*, *P4HB*, *PDIA2*, *PDIA3*, *PDIA4*, *PDIA5*, *PDIA6*, *TMX1*, *TMX2*, *TMX4*, *TXNDC5*) и геном *SLC34A2* (NaPi2b). На основе этих данных создана единая платформа для последующего анализа *in silico* этих взаимодействий.

Сравнение сетей коэкспрессии и белок-белковых взаимодействий гена *SLC34A2*, генов семейства PDI и их продуктов в нормальной и опухолевой тканях. Для выявления различий в регуляции генов семейства PDI и белка NaPi2b в нормальной и опухолевых

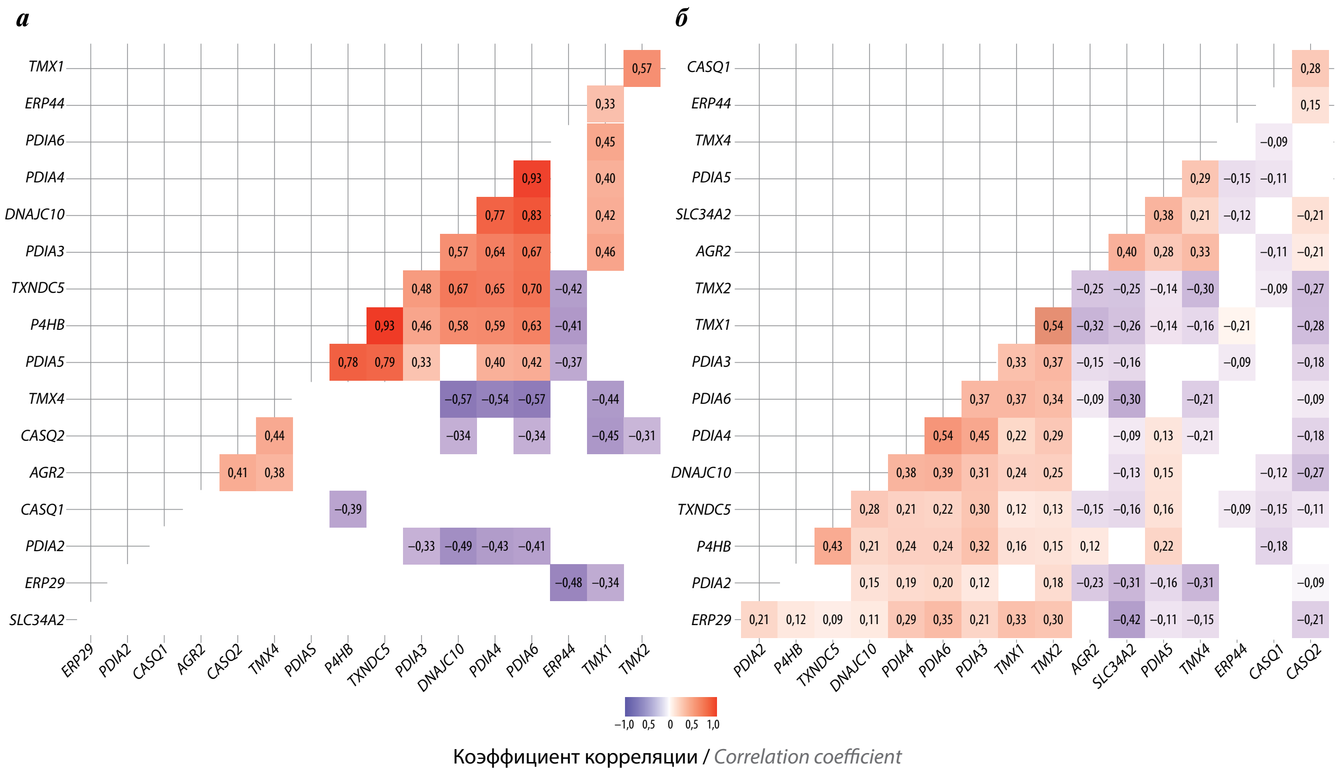


Рис. 1. *Тепловые карты коэкспрессии 17 генов (SLC34A2 + 16 генов дисульфид-изомераз (PDI)) в нормальной (а) и опухолевой (б) тканях яичников. Указаны только значимые коэффициенты корреляции (p <0,05)*

Fig. 1. *Heatmaps of the co-expression of 17 genes (SLC34A2 + 16 protein disulfide isomerase (PDI) genes) in normal (a) and tumors (б) tissues of the ovaries. Only significant correlation coefficients are indicated (p <0.05)*

тканях яичников построены и сравнены 2 сети коэкспрессии и белок-белковых взаимодействий, каждая из которых включала 17 узлов (ген *SLC34A2* и 16 генов семейства PDI). В этих сетях ребра соответствовали найденным взаимодействиям, а для каждой пары генов использовалось значение медианы оценок взаимодействия из всех открытых баз данных. Вес ребер рассчитывали как сумму всех найденных взаимодействий с последующей Z-нормализацией, а вес каждой вершины определяли как сумму весов инцидентных ребер.

Для выявления структурных различий между сетями нормальной и опухолевой тканей яичников выполнен сравнительный анализ с помощью агломеративной иерархической кластеризации по методу полной связности. Для каждой сети коэкспрессии и белок-белковых взаимодействий построена дендрограмма, после чего обе дендрограммы объединены в одну танглограмму – визуализацию сравнения 2 дендрограмм (рис. 2), позволяющую наглядно отследить смещения узлов между иерархиями в нормальных образцах и образцах опухолей.

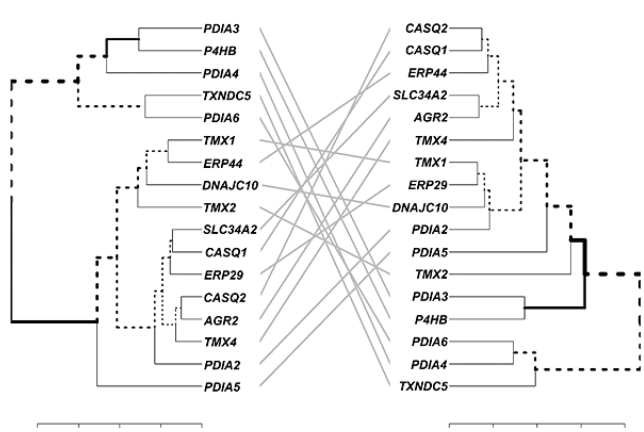


Рис. 2. *Дендрограммы сетей коэкспрессии и белок-белковых взаимодействий, построенные на основе данных по образцам нормальной (слева) и опухолевой тканей (справа) яичников (кофенетическая корреляция = 0,082)*

Fig. 2. *Dendrograms of interaction networks constructed from samples of normal tissue (left) and tumors (right) of the ovary (cophenetic correlation = 0.082)*

Значение кофенетической корреляции 2 дендрограмм (0,082) свидетельствует об отсутствии сходства их структур, что отражает различные топологические свойства сетей коэкспрессии и белок-белковых взаимодействий *SLC34A2* и генов семейства PDI в нормальной и опухолевой тканях. Полученные результаты свидетельствуют о фундаментальной реорганизации паттернов коэкспрессии и белок-белковых взаимодействий между исследуемыми генами, что указывает на отсутствие консервативности данных сетевых модулей при патологическом состоянии ткани.

Выделение ключевых генов на основе центральности и идентификация функциональных модулей в сетях коэкспрессии и белок-белковых взаимодействий гена *SLC34A2*, генов семейства PDI и их продуктов. Для оценки изменений сетевого окружения гена *SLC34A2* в опухолевых клетках проведен сравнительный анализ топологических характеристик сетей в нормальной и опухолевой тканях. Согласно базам данных, содержащих информацию о белок-белковых взаимодействиях, NaPi2b не имеет прямых взаимодействий с классическими PDI. Это делает особенно интересным поиск непрямых регуляторных связей, которые могут влиять на посттрансляционную модификацию его большого ВКД.

Для выявления ключевых генов по построенным сетям определяли гены на основе параметров концентрирования и промежуточности узлов сети (рис. 3). Параметр промежуточности показывает количество кратчайших путей (ребер), проходящих через узлы, параметр концентрирования – количество связей гена с другими генами в сети. Важно отметить, что ген *SLC34A2* и его продукт NaPi2b не имеют взаимодействий с генами семейства PDI.

Для выявления ключевых генов и белков на основе построенных сетей отобраны узлы, входившие в верхние 20 % узлов по показателям концентрирования (количество связей узла) и промежуточности (количество кратчайших путей, проходящих через узел). В нормальной ткани яичника к таким ключевым узлам относятся гены *DNAJC10*, *ERP44*, *P4HB*, *PDIA2*, *PDIA3*, *PDIA4*, *PDIA6*, *TXNDC5* и *TMX1*. В сети опухолей найдены гены *DNAJC10*, *ERP44*, *P4HB*, *PDIA2*, *PDIA3*, *PDIA4*, *PDIA6* и *TXNDC5,* а также дополнительно выделены гены *CASQ1*, *CASQ2*, *ERP29*, *PDIA5* и *SLC34A2*.

Анализ топологических характеристик выявил кардинальную реорганизацию сетевой архитектуры при опухолевой трансформации. Ключевой находкой является то, что ген *SLC34A2*, не входящий в число центральных узлов в нормальной ткани, при онкотрансформации становится опухоль-специфичным ключевым геном. Вопрос о том, с какими генами *SLC34A2* формирует функциональные связи в опухолевых клетках, исследован с помощью модульного

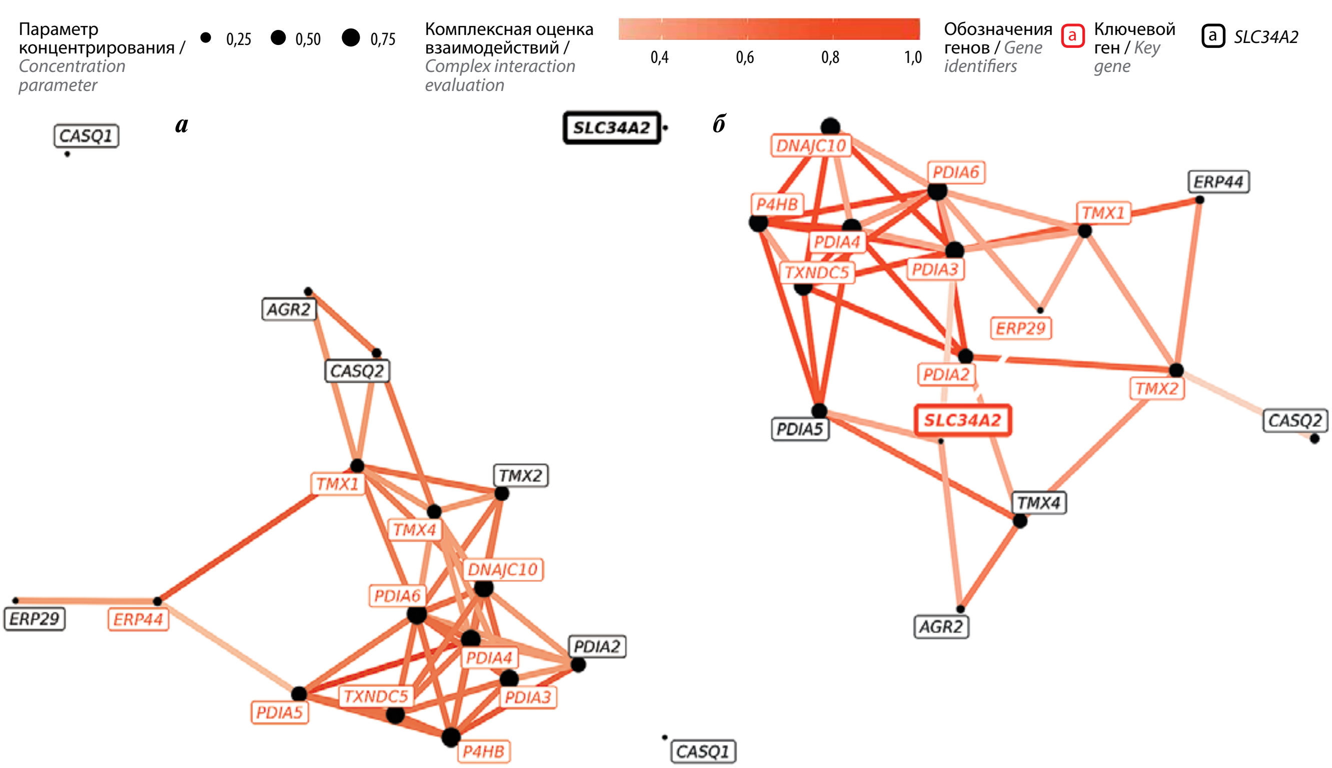


Рис. 3. *Сети коэкспрессии и белок-белковых взаимодействий SLC34A2 и генов семейства дисульфид-изомераз в нормальной (а) и опухолевой (б) тканях яичников. На рисунке показаны взаимодействия с коэффициентом >0,3 по модулю*

Fig. 3. *Networks of co-expression and protein-protein interactions between SLC34A2 and genes of disulfide isomerase family in normal (a) and tumor (б) ovarian tissue. The figure shows interactions with absolute coefficient value >0.3*

Таблица 3. *Выявленные модули генов в сетях коэкспрессии и белок-белковых взаимодействий в образцах нормальной и опухолевой тканей яичников*

Table 3. *Identified gene modules in co-expression and protein-protein interaction networks in samples of normal and tumor ovarian tissue*

Нормальная ткань Normal tissue	Опухолевая ткань Tumor tissue
AGR2, CASQ2, DNAJC10, PDIA2, PDIA3, PDIA4, PDIA6, TMX1, TMX2, TMX4	**ERP29**, PDIA6, **SLC34A2**, TMX1, TMX2
ERP44, PDIA5	AGR2, TMX4

Примечание. *Жирным шрифтом выделены гены ERP29 и SLC34A2, которые специфичны для опухолей.*
Note. *ERP29 and SLC34A2 genes specific for tumors are shown in bold.*

анализа сетей, позволяющего выявить кластеры плотно взаимосвязанных генов, что указывает на их потенциальное функциональное взаимодействие и координированную регуляцию. Итоговый список модулей и включенные в них гены представлены в табл. 3.

Таким образом, результаты сетевого анализа продемонстрировали, что в опухолевых клетках яичника происходит реорганизация регуляторного окружения гена *SLC34A2*. Ключевой особенностью этой реорганизации является формирование специфического для опухолей функционального модуля генов *SLC34A2* и *ERP29*, характеризующегося обратной коэкспрессией генов (коэффициент Спирмена $\rho = -0{,}42$; $p < 0{,}05$; см. рис. 1). Эта ассоциация может иметь прямое отношение к изменению конформации ВКД NaPi2b и доступности терапевтического эпитопа MX35 в опухолевых клетках за счет аномальной дисульфид-изомеризации белка NaPi2b, благодаря участию *ERP29*, что требует дальнейшего изучения.

Таким образом, ген *SLC34A2*, не являясь центральным узлом в сети взаимодействий генов в нормальной ткани, при онкотрансформации становится опухольспецифичным ключевым геном и входит в функциональное взаимодействие с геном *ERP29*, демонстрируя значимую обратную коэкспрессию исключительно в опухолевых клетках.

ОБСУЖДЕНИЕ

Целью нашего исследования было изучение взаимодействия мембранного транспортера NaPi2b (*SLC34A2*) с генами семейства PDI, отвечающими за образование и потенциальную перестройку S-S-связей внутри его большого ВКД, чтобы выявить ключевые гены-маркеры, ассоциированные с посттрансляционными модификациями ВКД NaPi2b в опухолевых клетках яичника и доступностью эпитопа MX35. Для этого мы проанализировали 17 генов семейства PDI и ген *SLC34A2*, а также их продукты в 539 образцах опухолей яичников и 40 образцах нормальной ткани яичников, построив и сравнив сети коэкспрессии и белок-белковых взаимодействий.

В обеих сетях выделены ключевые узлы на основе показателей концентрирования (количество связей узла) и промежуточности (количество кратчайших путей, проходящих через узел). В ходе топологического анализа выявлено отсутствие структурного сходства сетей (мера сходства иерархических структур – коэффициент кофенетической корреляции = 0,082) при этом в опухолях специфически ключевыми оказались гены *CASQ1*, *CASQ2*, *ERP29*, *PDIA5*, *TMX4* и *SLC34A2*. Основным результатом нашего анализа является специфическое для опухолей яичника выявление генов *ERP29* и *SLC34A2* в качестве центральных узлов, объединенных в один функциональный модуль (кластеров плотно связанных генов) и демонстрирующих значимую обратную коэкспрессию.

Ген *ERP29* (endoplasmic reticulum protein 29) представляет собой люминальный шаперон эндоплазматического ретикулума, участвующий в координации фолдинга и транспорта секреторных и мембранных белков. В нормальных клетках белок ERP29 обеспечивает правильную сборку дисульфидных связей и предотвращает преждевременную агрегацию полипептидов, взаимодействуя с другими шаперонами, такими как BiP/GRP78 и GRP94 [20]. Под действием стресса эндоплазматического ретикулума (ER) экспрессия *ERP29* усиливается через пути UPR (ATF6, IRE1α, PERK), что способствует восстановлению протеостаза и адаптации клетки к нагрузке белкового синтеза [21].

В опухолевых клетках белок ERP29 выполняет многоаспектную роль, регулируя выживаемость, миграцию и ответ на терапию. В моделях фарингеальных карцином его подавление снижает уровень маркеров ER-стресса (GRP78, CHOP) и апоптоза, что повышает устойчивость к цисплатину и стимулирует пролиферацию, тогда как его сверхэкспрессия усиливает ER-стресс-опосредованный апоптоз и снижает выживаемость резистентных клеток [20, 22]. Кроме того, снижение регуляции гена *ERP29* ведет к эпителиально-мезенхимальному переходу через уменьшение уровня экспрессии E-кадгерина и увеличение экспрессии виментина, что усиливает миграцию и инвазивность опухолевых клеток [22].

Обнаружение значимой обратной коэкспрессии генов *ERP29* и *SLC34A2* дает возможность предположить, что белок ERP29 может играть определенную роль в посттрансляционной модификации транспортера NaPi2b при РЯ. Полученные данные позволяют выдвинуть гипотезу о том, что дисрегуляция белка ERP29 в опухолевых клетках может влиять на фолдинг большого ВКД белка NaPi2b посредством прямого шаперонного взаимодействия, модуляции активности других генов семейства PDI или изменения редокс-статуса эндоплазматического ретикулума [21]. Это, в свою очередь, может привести к изменению конформации ВКД вследствие аномальной ре-аранжировки дисульфидных связей, способствуя большей доступности опухоль-ассоциированного эпитопа MX35 для терапевтических моноклональных антител в опухолевых клетках яичника. Хотя в ходе нашего исследования выявлены сильная корреляционная связь и сетевая ассоциация гена *ERP29* с геном *SLC34A2*, прямые функциональные взаимодействия этих генов требуют экспериментального подтверждения. Включение *ERP29* и *SLC34A2* в один модуль исключительно в опухолях и обратная коэкспрессия данных генов указывают на локальный кластер, отвечающий за модификацию, что может привести к изменению конформации ВКД, а следовательно, к маскированию/демаскированию эпитопа MX35. Выявленная ассоциация подчеркивает потенциал белка ERP29 и его взаимодействия с NaPi2b в качестве новой оси для разработки диагностических подходов (оценка коэкспрессии/уровней белков) и терапевтических стратегий при РЯ. Перспективными направлениями могут быть таргетинг активности белка ERP29 для нормализации фолдинга NaPi2b или использование информации об экспозиции опухолеассоциированного эпитопа MX35, потенциально усиленной дисфункцией ERP29 для направленной доставки терапевтических антител.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный комплексный сетевой анализ взаимодействий гена *SLC34A2* и генов семейства PDI выявил принципиальное сходство топологии сетей коэкспрессии и белок-белковых взаимодействий в нормальной и опухолевой тканях яичников. Ключевым отличием, имеющим потенциальное патогенетическое значение, является специфическое для опухолей включение генов *ERP29* и *SLC34A2* в число центральных узлов сети и их объединение в один функциональный модуль, характеризующийся значимой обратной коэкспрессией. Эти данные предполагают возможную роль белка-шаперона ERP29 в дисрегуляции посттрансляционной модификации, в частности реорганизации дисульфидных связей ВКД транспортера NaPi2b, в клетках РЯ, что может влиять на доступность опухолеассоциированного эпитопа MX35.

Полученные данные обосновывают приоритетность дальнейшего экспериментального изучения функциональной связи между ERP29 и NaPi2b, а также оценки этих белков (особенно в контексте экспрессии MX35) в качестве новых молекулярных маркеров и мишеней для разработки таргетных терапевтических стратегий, в том числе комбинированной терапии РЯ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Siegel R.L., Miller K.D., Wagle N.S., Jemal A. Cancer statistics, 2023. CA Cancer J Clin 2023;73(1):17–48. DOI: 10.3322/caac.21763
2. Gaitskell K., Hermon C., Barnes I. et al. Ovarian cancer survival by stage, histotype, and pre-diagnostic lifestyle factors, in the prospective UK Million Women Study. Cancer Epidemiol 2022;76:102074. DOI: 10.1016/j.canep.2021.102074
3. Salas Bolívar P., Gonzalez-Benitez C., Carbonell López M. et al. Prognostic factors after the first recurrence of ovarian cancer. J Clin Med 2025;14(2):470. DOI: 10.3390/jcm14020470
4. Gutic B., Bozanovic T., Mandic A. et al. Preliminary outcomes of five-year survival for ovarian malignancies in profiled Serbian Oncology Centre. Clinics (Sao Paulo) 2023;78:100204. DOI: 10.1016/j.clinsp.2023.100204
5. Cheng X., Li P., Jiang R. et al. ADC: a deadly killer of platinum resistant ovarian cancer. J Ovarian Res 2024;17(1):196. DOI: 10.1186/s13048-024-01407-2
6. Киямова Р.Г., Власенкова Р.А., Булатова Л.Ф. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b как мишень для таргетной терапии: особенности структуры, функции и экспрессии. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):74–84. DOI: 10.17650/2313-805X-2024-11-2-74-84
Kiyamova R.G., Vlasenkova R.A., Bulatova L.F. Sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b as a candidate for targeted therapy: features of structure, function, and expression. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(2):74–84. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2024-11-2-74-84
7. Banerjee S., Drapkin R., Richardson D.L., Birrer M. Targeting NaPi2b in ovarian cancer. Cancer Treat Rev 2023;112:102489. DOI: 10.1016/j.ctrv.2022.102489
8. Bulatova L., Savenkova D., Nurgalieva A. et al. Toward a topology-based therapeutic design of membrane proteins: validation of NaPi2b topology in live ovarian cancer cells. Front Mol Biosci 2022;9:895911. DOI: 10.3389/fmolb.2022.895911
9. Moore K.N., O'Malley D.M., Vergote I. et al. Phase 1b study of anti-NaPi2b antibody-drug conjugate lifastuzumab vedotin (DNIB0600A) in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. Gynecol Oncol 2020;158(3):631–9. DOI: 10.1016/j.ygyno.2020.05.043
10. Schmitt S., Mai I., Machui P. et al. Abstract 2622: TUB-040, a novel Napi2b-targeting ADC built with ethynylphosphonamidate conjugation chemistry, demonstrates high and long-lasting anti-tumor efficacy via topoisomerase-I inhibition and excellent tolerability predictive of a wide therapeutic window in humans. Cancer Res 2024;84(7_Suppl):2622. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2024-2622
11. Xiao L., Lian W., Liu Q. et al. Abstract 1894: preclinical development of YL205, a novel NaPi2b-targeting antibody-drug conjugate (ADC) with novel topoisomerase I inhibitor-based

linker-payload for treatment of solid tumors. Cancer Res 2024;84(6_Suppl):1894. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2024-1894

12. Huang W., Liu Z., Li Y. et al. Abstract 5907: pre-clinical evaluation of a novel antibody drug conjugate (ADC) LM-317 targeting NaPi2b. Cancer Res 2024;84(6_Suppl):5907. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2024-5907
13. Horsley E., Jabeen A., Veillard N. et al. Abstract 5085: preclinical development of NaPi2b-PL2202, a novel camptothecin-based antibody-drug conjugate targeting solid tumors expressing NaPi2b. Cancer Res 2024;84(6_Suppl):5085. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2024-5085
14. Коротаева А.В., Булатова Л.Ф., Власенкова Р.А. и др. Распознавание Na-зависимого фосфатного транспортера NAPI2B моноклональными антителами в клетках бактерий и эукариот. Биотехнология 2022;38(5):66–72. DOI: 10.1134/S0234575522050078
Korotaeva A.V., Bulatova L.F., Vlasenkova R.A. et al. Recognition of the Na-dependent phosphate transporter NAPI2B by monoclonal antibodies in bacterial and eukaryotic cells. Biotekhnologiya = Biotechnology 2022;38(5):66–72. (In Russ.). DOI: 10.1134/S0234575522050078
15. Bulatova L.F., Skripova V.S., Sagdeeva A.R. et al. T330M substitution in the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b abolishes the efficacy of monoclonal antibodies against MX35 epitope. Antibodies 2025;14(2):30. DOI: 10.3390/antib14020030
16. Xu S., Butkevich A.N., Yamada R. et al. Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment. Proc Natl Acad Sci USA 2012;109(40):16348–53. DOI: 10.1073/pnas.1205226109
17. Feng S., Xu Y., Dai Z. et al. Integrative analysis from multicenter studies identifies a WGCNA-derived cancer-associated fibroblast signature for ovarian cancer. Front Immunol 2022;13:951582. DOI: 10.3389/fimmu.2022.951582
18. Torrente A., Lukk M., Xue V. et al. Identification of cancer related genes using a comprehensive map of human gene expression. PLoS One 2016;11(6):e0157484. DOI: 10.1371/journal.pone.0157484
19. Athar A., Füllgrabe A., George N. et al. ArrayExpress update – from bulk to single-cell expression data. Nucleic Acids Res 2019;47(D1):711–5. DOI: 10.1093/nar/gky964
20. Bose A., Kasle G., Jana R. et al. Regulatory role of endoplasmic reticulum resident chaperone protein ERp29 in anti-murine β-coronavirus host cell response. J Biol Chem 2023;299(2):102836. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102836
21. McLaughlin T., Falkowski M., Wang J.J., Zhang S.X. Molecular chaperone ERp29: a potential target for cellular protection in retinal and neurodegenerative diseases. Adv Exp Med Biol 2018;1074:421–7. DOI: 10.1007/978-3-319-75402-4_52
22. Carron J., Coser L., Lima C.S.P. et al. The impact of ERP29 on the progression of pharyngeal squamous cell carcinoma. Sci Rep 2024;14:25681. DOI: 10.1038/s41598-024-76210-6

Вклад авторов
Р.А. Власенкова, И.А. Рыбачук: анализ данных, написание текста статьи;
Р.Г. Киямова: разработка концепции, руководство исследованием, написание текста статьи.
Authors' contributions
R.A. Vlasenkova, I.A. Rybachuk: data analysis, article writing;
R.G. Kiyamova: concept development, research management, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors
Р.А. Власенкова / R.A. Vlasenkova: https://orcid.org/0000-0003-0082-6833
И.А. Рыбачук / I.A. Rybachuk: https://orcid.org/0009-0003-3161-2210
Р.Г. Киямова / R.G. Kiyamova: https://orcid.org/0000-0002-2547-2843

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

Финансирование. Исследование выполнено за счет средств Программы стратегического академического лидерства ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» «Приоритет-2030».
Funding. The study was carried out at the expense of the Strategic Academic Leadership Program of the Kazan (Volga Region) Federal University "Priority-2030".

Статья поступила: 29.08.2025. **Принята к публикации:** 27.10.2025. **Опубликована онлайн:** 10.12.2025.
Article submitted: 29.08.2025. **Accepted for publication:** 27.10.2025. **Published online:** 10.12.2025.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-149-157

Токсичность и переносимость препарата MM-D37K – таргетного высокомолекулярного ингибитора циклинзависимых киназ 4/6

Т.М. Кулинич, Е.А. Кудинова, О.И. Гончарова, И.А. Пучков, Я.Ю. Киселева, К.Г. Аминулла, В.К. Боженко, В.А. Солодкий

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Профсоюзная, 86

Контакты: Ольга Игоревна Гончарова *olia.goncharo2013@yandex.ru*

Введение. Дисрегуляция клеточного цикла, связанная с нарушениями сигнального пути CDK4/6-pRb, является характерной чертой многих онкологических заболеваний. Препарат MM-D37K – инновационный химерный пептид, имитирующий эндогенный ингибитор p16INK4a. В отличие от традиционных АТФ-конкурентных (АТФ – аденозинтрифосфат) ингибиторов, MM-D37K обладает высокой селективностью. Он состоит из цитотоксического фрагмента p16INK4a и транспортного пептида pANTP, обеспечивающего эффективную внутриклеточную доставку. Результаты доклинических исследований показали выраженное цитотоксическое действие MM-D37K на широкий спектр опухолевых клеток и синергетический эффект с химиотерапевтическими препаратами.

Цель исследования – оценить влияние препарата MM-D37K на биохимические показатели крови, а также определить дозолимитирующую токсичность и максимально-переносимую дозу у пациентов с распространенными солидными опухолями.

Материалы и методы. Исследование проводилось по схеме эскалации дозы «3 + 3». Начальная доза MM-D37K составила 7,5 мг/м^2, дальнейшая эскалация дозы препарата MM-D37K в клиническом исследовании происходила двукратно на каждом уровне дозирования (7,5; 15; 30; 60; 120 и 240 мг/м^2). Препарат вводили внутривенно 3 раза в неделю в течение 2 нед. Дозолимитирующая токсичность оценивалась по критериям гематологической и негематологической токсичности согласно классификации Национального института рака (National Cancer Institute, NCI) США Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v. 4.0.

Результаты. При внутривенном введении MM-D37K в монорежиме в диапазоне доз от 7,5 до 240 мг/м^2 признаков дозолимитирующей токсичности не зафиксировано. Статистически значимых различий в анализируемых лабораторных и инструментально-диагностических показателях на фоне внутривенного введения исследуемого препарата обнаружено не было, что позволило сделать заключение о безопасности и удовлетворительном профиле переносимости максимально протестированной дозы препарата MM-D37K – 240 мг/м^2.

Заключение. При первом клиническом применении у человека нового противоопухолевого препарата, таргетного ингибитора циклинзависимых киназ 4/6, MM-D37K подтверждены его безопасность и возможность дальнейших клинических испытаний при выбранной дозе 240 мг/м^2.

Ключевые слова: MM-D37K, p16, ингибитор циклинзависимых киназ, токсичность, клиническое исследование I/IIa фазы

Для цитирования: Кулинич Т.М., Кудинова Е.А., Гончарова О.И. и др. Токсичность и переносимость препарата MM-D37K – таргетного высокомолекулярного ингибитора циклинзависимых киназ 4/6. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(4):149–57.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-149-157

The toxicity and tolerability of MM-D37K, a targeted high-molecular inhibitor of cyclin-dependent kinases 4/6

T.M. Kulinich, E.A. Kudinova, O.I. Goncharova, I.A. Puchkov, Ya.Yu. Kiseleva, K.G. Aminulla, V.K. Bozhenko, V.A. Solodkiy

Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Ministry of Health of Russia; 86 Profsoyuznaya St., Moscow 117997, Russia

Contacts: Olga Igorevna Goncharova *olia.goncharo2013@yandex.ru*

Introduction. Cell cycle dysregulation associated with errors in the CDK4/6-pRb signaling pathway is characteristic of many oncological diseases. The MM-D37K drug is an innovative chimeric peptide imitating endogenous inhibitor p16INK4a. Unlike traditional ATP-competitive (adenosine triphosphate) inhibitors, MM-D37K is highly selective. It consists of p16INK4a cytotoxic fragment and pANTP transport peptide promoting effective intracellular delivery. Results of preclinical studies showed high cytotoxic effect of MM-D37K in a wide variety of tumor cells and synergy with chemotherapeutic drugs.

Aim. To evaluate the effect of MM-D37K drug on biochemical characteristics of blood and to determine dose-limiting toxicity and maximal tolerable dose in patients with advanced solid tumors.

Materials and methods. The study was performed in accordance with the 3 + 3 escalation dose scheme. Starting MM-D37K dose was 7.5 mg/m², further dose escalation for MM-D37K drug in the clinical trial was two-fold at each dosing level (7.5; 15; 30; 60; 120 and 240 mg/m²). The drug was administered intravenously 3 times a week for 2 weeks. Dose-limiting toxicity was evaluated according to the hematological and non-hematological toxicity criteria per the National Cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v. 4.0 classification.

Results. Intravenous administration of MM-D37K in the dose range between 7.5 and 240 mg/m² did not show signs of dose-limiting toxicity. There were no statistically significant differences in the analyzed laboratory, instrumental and diagnostic parameters during intravenous administration of the drug which allowed to conclude that the maximal tested dose of the MM-D37K drug 240 mg/m² is safe and has satisfactory tolerability profile.

Conclusion. First clinical use of the new antitumor drug – targeted inhibitor of cyclin-dependent kinases 4/6 – MM-D37K in humans confirmed its safety and possibility of further clinical trials with the selected dose 240 mg/m².

Keywords: MM-D37K, p16, cyclin-dependent kinase inhibitor, toxicity, phase I/IIa clinical trial

For citation: Kulinich T.M., Kudinova E.A., Goncharova O.I. et al. The toxicity and tolerability of MM-D37K, a targeted high-molecular inhibitor of cyclin-dependent kinases 4/6. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(4):149–57. (In Russ.).
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-149-157

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время онкологические заболевания остаются одной из главных причин смертности во всем мире, что обусловливает непрерывный поиск новых, более эффективных и селективных терапевтических подходов [1].

Ключевым регулятором клеточного цикла и важным супрессором опухолевого роста является белок p16INK4a. Его главная биологическая функция заключается в регулировании перехода клетки из фазы G1 в фазу S. p16INK4a осуществляет это путем ингибирования активности циклинзависимых киназ (CDK) 4 и 6, тем самым блокируя прогрессию клеточного цикла по pRb-зависимому механизму [2]. В нормальных физиологических условиях активность комплексов CDK/циклин жестко контролируется как в пространстве, так и во времени.

Дисрегуляция циклиновых комплексов отмечается при многих типах онкологических заболеваний [3], что приводит к нарушению координации клеточного цикла и процессов пролиферации и апоптоза, способствует бесконтрольному росту раковых клеток. Существуют 2 основных семейства цинлинкиназных ингибиторов (cyclin kinase inhibitor, CKI) – белков, осуществляющих ингибирование CDK. Представители 1-го семейства CKI–Cip/Kip – p21, p27 и p57 – ингибируют циклиновые комплексы CDK 2 и CDK 4/6, осуществляя G1/S- и G2-контроль [4]. Представители 2-го семейства INK4 (inhibitor of kinase 4) – p15, p16, p18 и p19 – узкоспецифичны для циклин D-комплексов CDK 4/6 и осуществляют аналогичные функции.

Известно, что ген, кодирующий ингибитор опухолевого роста p16INK4A, часто инактивирован в опухолях различной локализации [5]. Инактивация может происходить различными путями, включая гомозиготную делецию, метил-ассоциированную ингибицию транскрипции и др. Нарушение функции p16INK4a характерно для широкого спектра онкологических заболеваний; восстановление его функций или имитация его действия рассматривается как перспективная терапевтическая стратегия [6]. В связи с этим изучение механизмов, позволяющих восстановить стабильность и функцию p16INK4a, например с помощью наноантител, представляет особый интерес [2].

Таким образом, CDK представляют собой привлекательные фармакологические мишени для разработки новых противоопухолевых препаратов [4]. Структурные особенности некоторых CDK и молекулярные механизмы их регуляции в настоящее время довольно хорошо изучены и описаны, что создает предпосылки для разработки лекарственных препаратов – ингибиторов CDK. Большинство из них представляют собой низкомолекулярные ингибиторы, имеющие сродство к АТФ-зависимому «карману связывания» (АТФ – аденозинтрифосфат). В то же время многие клеточные киназы имеют гомологичную структуру АТФ-связывающей области, что приводит к неспецифическому взаимодействию низкомолекулярных ингибиторов CDK с данной областью, вследствие чего наблюдается большое количество нежелательных явлений (НЯ) при их применении *in vivo*.

В контексте поиска новых методов воздействия на опухолевые клетки, характеризующиеся дефектом регуляции клеточного цикла, на базе Российского научного центра рентгенорадиологии разработан препарат MM-D37K – ингибитор CDK4/6, который не имеет перекрестного реагирования с другими киназами, поскольку его действие основано на высокоспецифическом межбелковом взаимодействии CDK 4/6 и природного ингибитора этих киназ – белка p16INK4a. Он представляет собой химерный пептид, состоящий из 2 основных фрагментов: цитотоксического фрагмента p16INK4a (аминокислотная последовательность 84–103 или 84–106) и транспортного фрагмента pANTP, за счет которого происходит эффективная внутриклеточная доставка молекулы пептида. Следует отметить, что для таких крупномолекулярных соединений, как пептиды, внутриклеточный транспорт является одной из основных проблем при создании на их основе новых лекарственных средств. Часто для получения биологического эффекта и создания необходимой/действующей внутриклеточной концентрации требуется введение в организм большого количества препарата, что сопровождается побочными эффектами и токсическим влиянием на здоровые ткани. Поэтому поиск новых средств доставки лекарственных средств является актуальной задачей современной медицины.

Транспортная последовательность pANTP, полученная из белка Antennapedia (pAntp), регулирующего процессы развития плодовой мухи (*Drosophila melanogaster*), относится к группе интернализуемых пептидов (cell penetrating peptides, CPPs) и обеспечивает эффективное проникновение терапевтического фрагмента внутрь опухолевых клеток. MM-D37K функционирует как не-АТФ-конкурентный ингибитор CDK4/6 [7], что потенциально обеспечивает ему преимущества перед традиционными АТФ-конкурентными ингибиторами CDK4/6 [8].

Результаты доклинических исследований препарата MM-D37K продемонстрировали его выраженное цитотоксическое действие на опухолевые клетки широкого спектра злокачественных новообразований, включая колоректальный рак, рак почек, легкого, молочной, предстательной и поджелудочной желез, мочевого пузыря, матки, желудка, яичников, глиомы и глиобластомы. Более того, обнаружен выраженный синергетический эффект при совместном применении MM-D37K с уже существующими химиотерапевтическими противоопухолевыми препаратами, такими как таксол, этопозид и 5-фторурацил [9, 10].

С учетом многообещающих результатов доклинических исследований и уникального механизма действия MM-D37K мы изучили безопасность и фармакологические свойства этого препарата в клинических условиях.

Цель исследования – определение переносимости, дозолимитирующей токсичности (ДЛТ) и максимально-переносимой дозы (МПД) препарата MM-D37K у пациентов с распространенными солидными опухолями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика пептидного препарата MM-D37K. MM-D37K представляет собой искусственно синтезированный методом твердофазного синтеза пептид, включающий функциональную группу – фрагмент белка p16INK4a и вектор, pAntp, обеспечивающий внутриклеточную интернализацию (рис. 1). Молекулярная формула препарата – $C_{201}H_{326}N_{66}O_{49}S_1$; молекулярная масса – 4483,3 а. е. м.

$$NH_2\text{-}\underbrace{\text{DAAREGFLDTLVVLHRAGAR}}_{\text{p16INK4a}}\text{-}\underbrace{\text{RQIKWFQNRRMKWKK}}_{\text{pAntp}}\text{-COOH}$$

Рис. 1. *Структура противоопухолевого препарата MM-D37K – пептидного ингибитора циклиновых киназ 4/6*

Fig. 1. *Structure of the MM-D37K antitumor drug, a 4/6 cyclin kinase peptide inhibitor*

Препарат в виде лиофилизата был упакован в стеклянные флаконы по 100 мг действующего вещества. Перед введением содержимое емкости растворяли в 5 мл воды для инъекций до концентрации 20 мг/мл. Раствор препарата был стабилен в течение 48 ч при хранении во флаконах при температуре 2–8 °C. Их содержимое предназначалось только для однократного применения у 1 пациента.

Выбор доз. На основе результатов доклинических токсикологических исследований и экстраполяции данных о летальной дозе, способной вызвать гибель 10 % животных ($ЛД_{10}$), – 100 мг/кг (300 мг/м^2), с учетом пересчета дозы в эквивалентную для человека (коэффициент – 12,3) и факта первого клинического применения препарата на основе CPPs у человека принято решение о начальной дозе MM-D37K, равной 7,5 мг/м^2. Дальнейшая эскалация дозы препарата MM-D37K в клиническом исследовании происходила двукратно на каждом уровне дозирования (7,5; 15; 30; 60; 120 и 240 мг/м^2).

Согласно руководству по определению максимальной безопасной стартовой дозы в клинических исследованиях I фазы (Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutic in Adult Healthy Volunteers) для веществ с большим молекулярным весом, назначаемых внутривенно и не метаболизирующихся в крови, а удаляемых путем эндоцитоза или проникающих в клетки крови, применяется аллометрический пересчет дозировок. Результаты исследования биораспределения исследуемого препарата MM-D37K у мышей, проведенного в отделении ядерной медицины Университетской клиники Гейдельберга (Германия), показали, что пептид преимущественно проникает в хорошо васкуляризированные ткани (почки, печень, селезенка и легкие), но в меньших количествах определяется в тканях с худшей васкуляризацией (например, в мышцах). Поскольку опухолевая ткань зачастую не обладает высокой васкуляризацией, достижение эффективной терапевтической концентрации лекарственного средства крайне важно, и его эквивалентная доза у человека без конверсионного фактора в данном случае позволила более адекватно предсказать фармакологически активную дозу. Исходя из этого, дизайн исследования подобран таким образом, чтобы достичь дозы исследуемого препарата по крайней мере 5 мг/кг у человека, что в пересчете на мг/м^2 составило 240 мг/м^2.

Двукратное повышение дозы MM-D37K на каждом следующем уровне дозирования является стандартным для исследований, посвященных лечению онкологических заболеваний. Таким образом, выбранная начальная доза этого препарата для первого введения человеку, равная 7,5 мг/м^2, в 80 раз меньше эквивалента ЛД$_{10}$ у самого чувствительного вида животных (крыс) и в 2 раза меньше эквивалента минимальной эффективной дозы по данным доклинических испытаний.

Дозу для каждой последующей когорты увеличивали в 2 раза до достижения уровня 240 мг/м^2. Таким образом, на этапе эскалации дозы запланировано применение следующих доз препарата MM-D37K: 7,5; 15; 30; 60; 120 и 240 мг/м^2.

Дизайн исследования. В ходе настоящего многоцентрового открытого нерандомизированного исследования с эскалацией дозы по схеме «3 + 3» препарат MM-D37K был впервые применен у онкологических больных с распространенными солидными опухолями. Исследование проводилось с целью определения МПД, при которой ДЛТ наблюдалась не более чем у 1 из 6 пациентов во время применения препарата в 1-м цикле терапии, а также безопасности его использования при многократном введении выбранной дозы.

Оценка наличия ДЛТ проводилась в течение первых 4 нед терапии. Эскалацию дозы проводили постепенно для каждой новой когорты пациентов, используя следующий алгоритм повышения дозы.

- Если ДЛТ не наблюдалась ни у одного из 3 пациентов когорты, то в исследование набирали пациентов в следующую когорту.
- Если ДЛТ наблюдалась у 1 из 3 пациентов когорты, то в эту когорту набирали еще 3 пациентов. Если ДЛТ не развивалась ни у одного из новых 3 пациентов, то в исследование набирали пациентов в следующую когорту. Если у одного или более новых пациентов развивалась ДЛТ (у 2 из 6 больных), то повышение дозы останавливали, а доза ниже этой на один уровень становилась МПД.
- Если ДЛТ наблюдалась у 2 из 3 пациентов, то повышение дозы прекращали, а доза ниже этой на один уровень становилась МПД (рис. 2).

Кроме этапа эскалации/подбора дозы исследование включало 2-й этап, целью которого являлось подтверждение дозы, определенной на 1-м этапе. Всего в него вошли 30 пациентов: 18 на 1-м этапе и 12 пациентов с распространенными опухолями желудочно-кишечного тракта на 2-м этапе.

Процедуры скрининга выполнялись в течение 14 дней до назначения 1-й дозы препарата. Цикл терапии включал 28 дней, начальная доза препарата MM-D37K для введения 1-й когорте пациентов составила 7,5 мг/м^2 при введении 3 раза в неделю в течение 2 нед. Дозы у последующих 5 когорт пациентов составили 15, 30, 60, 120 и 240 мг/м^2, режим введения тот же (3 раза в неделю в течение 2 нед). Пациенты находились в стационаре с 1-го по 5-й день 1-го цикла терапии, в 5-й день за состоянием больных наблюдали в течение 8 ч после введения препарата, затем они могли покинуть стационар. В остальные дни 1-го и 2-го циклов терапии введение MM-D37K и проведение необходимых процедур исследования осуществлялись в условиях амбулаторного визита, при этом в дни инфузий за состоянием пациентов наблюдали в течение 2 ч после инъекции.

Препарат вводили внутривенно капельно. Первую инфузию исследуемого препарата проводили в течение 1 ч. В дальнейшем, если пациент хорошо переносил процедуру, длительность инфузии могла быть сокращена до 30 мин. За больными наблюдали в течение 30 ± 3 дня после последнего введения препарата. В конце периода наблюдения был заключительный визит.

Дозолимитирующую токсичность оценивали в течение первых 4 недель терапии. ДЛТ определялась как возникновение НЯ, имеющих связь с препаратом, а именно: негематологическая токсичность III степени и выше, нейтропения IV степени, которая длилась 5 дней и более, нейтропения III степени в сочетании с инфекционным осложнением с повышением температуры (более 38,5 °C), тромбоцитопения IV степени или тромбоцитопения III степени в сочетании с кровотечением, а также любая другая токсичность, которая требовала перерыва в введении препарата на срок более 7 дней в течение первых 2 недель цикла. Эскалацию дозы проводили постепенно для каждой новой когорты пациентов, используя алгоритм повышения дозы, представленный на рис. 2.

Этап эскалации/подбора дозы. В когорту 1 (доза MM-D37K 7,5 мг/м^2) были включены 3 пациента. ДЛТ не наблюдалась ни у одного из них, что позволило перейти к набору пациентов в следующую, 2-ю, когорту ($n = 3$). При эскалации дозы до когорты 6 включительно (доза MM-D37K 240 мг/м^2) признаков ДЛТ зафиксировано не было.

Включение пациентов в каждую новую когорту допускалось только после того, как последний больной из текущей когорты прошел 1 цикл терапии (28 дней). Решение о включении пациентов в новую когорту принималось на основании информации о наблюдаемой токсичности (нежелательные лекарственные реакции) в когорте с предыдущей дозой.

Степень тяжести всех НЯ, включая те, которые соответствовали критериям ДЛТ, определяли по классификации Национального института рака (National Cancer Institute, NCI) США Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v.4.0. Во время 2-го и последующих циклов терапии у всех пациентов с ДЛТ дозу препарата могли снизить до предыдущего или промежуточного уровня после обсуждения

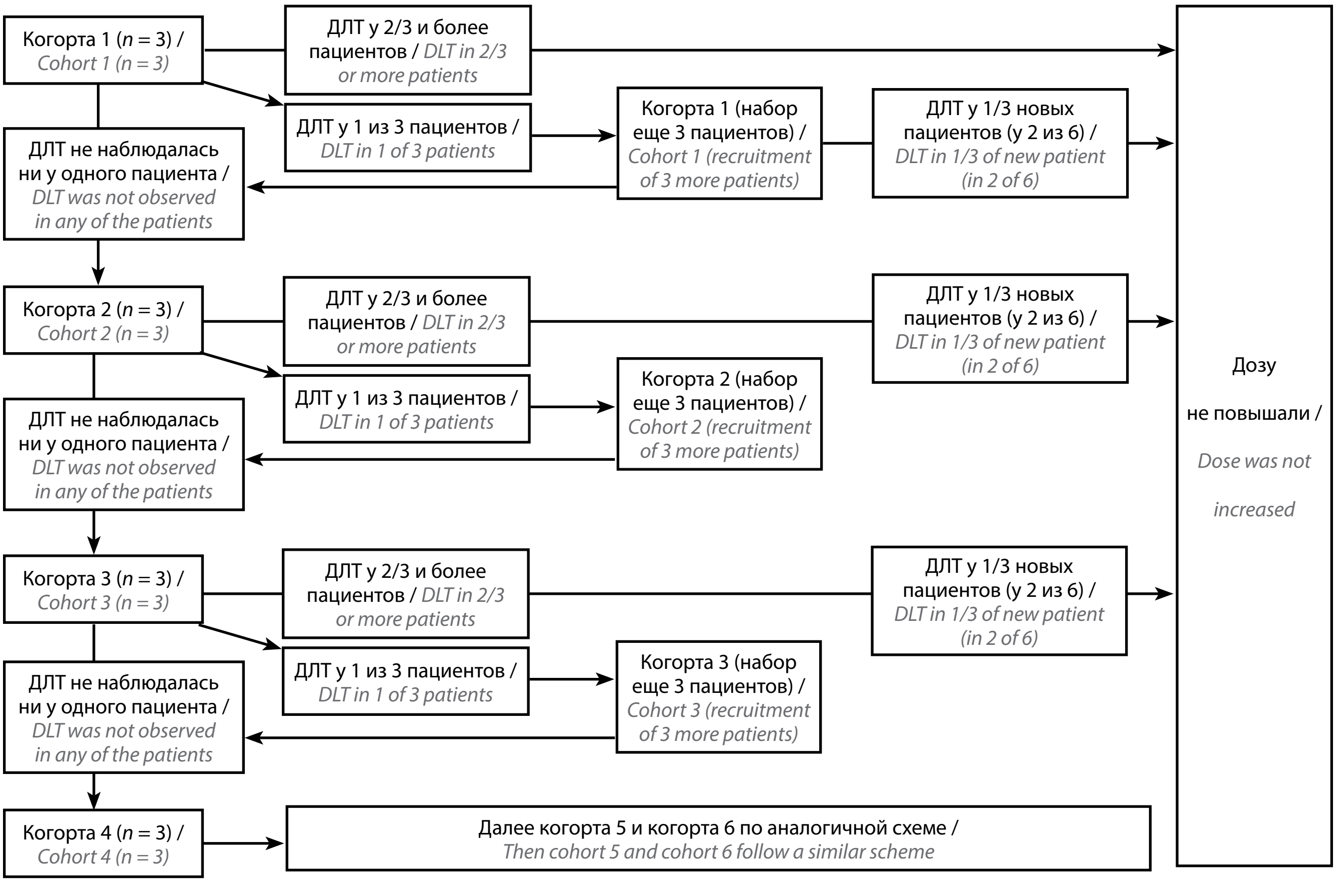


Рис. 2. *Алгоритм оценки дозолимитирующей токсичности (ДЛТ) и эскалации дозы MM-D37K*
Fig. 2. *Algorithm for assessing dose-limiting toxicity (DLT) and dose escalation of MM-D37K*

со спонсором и главным исследователем. Согласно дизайну исследования для каждого больного было допустимо снижение дозы не более 2 раз за период исследования, однако ситуаций, требующих снижения дозы препарата, не зафиксировано.

Этап подтверждения выбора дозы. После определения параметров переносимости и безопасности терапии MM-D37K в ходе 1-го этапа исследования проведен набор еще 12 пациентов с распространенными опухолями желудочно-кишечного тракта и наличием хотя бы одного измеряемого патологического очага по критериям оценки ответа солидных опухолей (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors 1.1, RECIST 1.1). Этим больным проводили терапию данным препаратом в дозе, выбранной на основании результатов 1-го этапа исследования для получения дополнительной информации о его безопасности, переносимости и противоопухолевой активности в выбранной дозе.

В ходе 2-го этапа исследования пациентам назначены 2 цикла терапии MM-D37K, каждый продолжительностью 28 дней. Введение препарата осуществлялось 3 раза в неделю в течение первых 14 дней, далее следовал перерыв в 14 дней.

Общая продолжительность участия пациента в каждом из этапов исследования составила около 3 мес (период скрининга – 2 нед, период терапии – 8 нед, период последующего наблюдения – 2,5 нед), что соответствовало 30 дням после последнего введения препарата MM-D37K.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Основной задачей исследования было определение переносимости, ДЛТ и МПД MM-D37K у пациентов с распространенными солидными опухолями. Оценку параметров безопасности и переносимости препарата проводили в соответствии с протоколом с учетом:

- отклонений в показателях жизненно важных функций;
- выявления нарушений при физикальном осмотре;
- отклонений в лабораторных показателях (общий и биохимический анализы крови, коагулограмма, общий анализ мочи);
- отклонений в показателях электрокардиографии;
- отклонений во фракции выброса левого желудочка (на основании результатов эхокардиографии);
- развития НЯ.

Согласно полученным данным динамика большинства жизненно важных показателей на протяжении исследования характеризовалась случайностью и разнонаправленностью колебаний, преимущественно в диапазоне референсных значений. Отклонения от нормальных значений в большинстве случаев не были клинически значимыми, не требовали терапевтической коррекции и носили транзиторный, разнонаправленный характер. В качестве иллюстрации в табл. 1 и 2 представлена динамика уровня креатинина и аланинаминотрансферазы в периферической крови в когортах пациентов при введении разных доз пептидного препарата MM-D37K.

Результаты исследования показали, что при внутривенном введении MM-D37K в течение 2 циклов монотерапии в диапазоне доз от 7,5 до 240 мг/м^2 наблюдалась его удовлетворительная переносимость. ДЛТ не была достигнута ни на одном из исследованных дозовых уровней. Это позволило установить МПД на уровне максимальной использованной дозы – 240 мг/м^2.

Общий профиль безопасности MM-D37K характеризовался низким уровнем токсичности: большинство зарегистрированных НЯ соответствовало I–II степени тяжести по классификации NCI CTCAE v4.0, они носили транзиторный характер и не требовали отмены

Таблица 1. *Уровень креатинина в крови в зависимости от доз препарата MM-D37K, мкмоль/л*

Table 1. *Blood creatinine level depending on the doses of the drug MM-D37K, mmol*

Доза, мг/м^2 Dose, mg/m^2	Показатель Parameter	Скрининг Screening	Визит Visit								
			2	3	6	7	8	10	13	14	15
7,5	Mean	88,67	89	92,33	88,33	84,33	81,67	84	85,5	89	78,05
	Median	95	93	93	83	81	81	84	85,5	89	78,05
	Min	74	74	73	81	70	70	76	83	77	71,1
	Max	97	100	111	101	102	94	92	88	101	85
15	Mean	72,333	60	64,333	66	71	71	74	64	75	84
	Median	64	60	57	60	63	71	74	64	75	84
	Min	60	59	57	58	62	54	53	55	57	84
	Max	93	61	79	80	88	88	95	73	93	84
30	Mean	67	77,333	74	65,5	78,333	65	65	68	71,5	71
	Median	64	65	69	65,5	71	65	65	68	71,5	71
	Min	63	65	65	65	68	64	65	68	71	70
	Max	74	102	88	66	96	66	65	68	72	72
60	Mean	77,25	82,95	82,75	86,467	101,733	86,7	85	105,15	87,467	85,9
	Median	77,5	77	76	75	104,2	83	81	105,15	79	78
	Min	72	52,8	66	68,4	71	53,1	55	52,1	47,4	52,7
	Max	82	125	113	116	130	124	119	158,2	136	127
120	Mean	81,333	75,367	75,833	76,8	79,333	82,4	75,05	77,05	82,55	81,45
	Median	78,7	82,9	74,6	67,6	79,7	82,4	75,05	77,05	82,55	81,45
	Min	73,3	60,3	66	67,1	78,5	78,6	67,4	74,8	82,2	76,7
	Max	92	82,9	86,9	95,7	79,8	86,2	82,7	79,3	82,9	86,2
240	Mean	88,475	75,475	84,5	92,1	93,467	91	96,95	107,65	111,3	116,9
	Median	78,45	77,7	79,85	80,4	82,7	91	96,95	107,65	111,3	116,9
	Min	66	39	66	74	77,8	75	77,9	104,2	111,3	116,9
	Max	131	107,5	112,3	121,9	119,9	107	116	111,1	111,3	116,9

***Примечание.** Здесь и в табл. 2: mean – среднее арифметическое, median – медиана, min – минимум, max – максимум.*

***Note.** Here and in the table 2: mean – arithmetic mean, median – median, min – minimum, max – maximum.*

Таблица 2. *Уровень аланинаминотрансферазы в крови в зависимости от доз препарата MM-D37K, Ед/л*

Table 2. *Alanine aminotransferase level in the blood, depending on the doses of MM-D37K, Units/l*

Доза, мг/м² Dose, mg/m²	Показатель Parameter	Скрининг Screening	Визит Visit								
			2	3	6	7	8	10	13	14	15
7,5	Mean	19,867	18	19,533	22,5	24,933	25,167	20,4	15,7	22,4	17,3
	Median	15,3	12	15,6	14,8	25,4	26,1	23	15,7	22,4	17,3
	Min	5	6	6	9,7	20,4	20,4	14,2	11,4	10,7	7,6
	Max	39,3	36	37	43	29	29	24	20	34,1	27
15	Mean	24,133	19,667	24,5	25	31,333	38	34,3	39,95	54,75	52,1
	Median	17	18	16	14	21	38	34,3	39,95	54,75	52,1
	Min	15	11	12	9	18	21	21	29	34	52,1
	Max	40,4	30	45,5	52	55	55	47,6	50,9	75,5	52,1
30	Mean	17,667	18,333	16,333	18,5	22,667	18	17,5	14	20,5	18
	Median	15	18	16	18,5	22	18	17,5	14	20,5	18
	Min	14	17	14	15	21	15	15	14	15	11
	Max	24	20	19	22	25	21	20	14	26	25
60	Mean	13,975	14,3	13,45	20,167	20,167	20,433	19,3	26,55	17,4	21,133
	Median	13,3	16,3	13,25	22,3	20,5	22,7	19,4	26,55	19,9	25,1
	Min	5,3	4,6	7,4	15,2	13	12,6	13,8	12,3	9,7	13,1
	Max	24	20	19,9	23	27	26	24,7	40,8	22,6	25,2
120	Mean	18,3	21,6	23,633	20,967	22,767	21,1	19,65	18,75	26,65	28
	Median	20,1	18,9	22,3	20	17,3	21,1	19,65	18,75	26,65	28
	Min	8,5	15,9	16,6	19,9	13,4	17,8	17,7	15,1	23,1	25,3
	Max	26,3	30	32	23	37,6	24,4	21,6	22,4	30,2	30,7
240	Mean	25,1	23,6	25,025	25,733	47,9	24,65	28,25	22,05	33	27,2
	Median	23,3	19,15	21,4	19,2	53,9	24,65	28,25	22,05	33	27,2
	Min	17,9	16	15,3	16,9	16,6	16,4	27,1	17,7	33	27,2
	Max	35,9	40,1	42	41,1	73,2	32,9	29,4	26,4	33	27,2

терапии. Случаев досрочного вывода пациентов из исследования в связи с развитием ДЛТ зафиксировано не было. В связи с этим достигнутая в ходе 1-го этапа максимальная запланированная доза когорты 6 (240 мг/м²) выбрана для 2-го этапа исследования.

Всего в ходе исследования у 17 пациентов зарегистрированы 63 случая развития НЯ, 62 из которых не отвечали критериям серьезности. Большинство выявленных в ходе настоящего исследования побочных эффектов представляли собой нарушения работы кровеносной и лимфатической систем. Причинно-следственная связь с применяемой терапией не была выявлена в 23 случаях, расценивалась как возможная — в 28, как вероятная — в 6, как определенная — в 6. Определенная связь с исследуемым препаратом установлена в 4 случаях развития кожных НЯ (в месте ведения признаки дерматита — покраснение, шелушение, зуд), которые возникли на следующий день после инъекции. У 1 пациента после введения препарата на следующие сутки отмечены общее недомогание и слабость. В 1 случае через 48 ч после инъекции развились нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта, диарея. Зарегистрировано 1 серьезное НЯ, соответствующее прогрессированию основного заболевания в период последующего наблюдения. Отсутствие серьезной негематологической и гематологической токсичности, соответствующей критериям ДЛТ, подтверждает потенциал MM-D37K как безопасного терапевтического агента. Таким образом, согласно полученным нами данным профиль безопасности препарата MM-D37K признан удовлетворительным при применении во всем диапазоне изучаемых доз: от 7,5 до 240 мг/м^2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка новых селективных противоопухолевых препаратов, нацеленных на ключевые механизмы онкогенеза, является приоритетной задачей современной онкологии. Использование технологии CPPs в качестве векторов доставки лекарственных соединений активно изучается в настоящее время, проводится ряд доклинических и клинических исследований, посвященных возможности использования лекарственных средств на основе этих пептидов для терапии и диагностики широкого спектра заболеваний, в том числе в онкологии. Доказаны перспективность использования CPPs и низкая токсичность таких векторов. Однако в настоящее время нет зарегистрированных лекарственных препаратов с использованием этих пептидов. Разрабатываемое лекарственное средство – пептидный ингибитор CDK4/6, включающий CPPs, способен эффективно и специфически воздействовать на молекулярную мишень, обладает высокой биодоступностью и низкой токсичностью. Применение препарата MM-D37K – химерного пептида, имитирующего действие эндогенного ингибитора p16INK4a и функционирующего как не-АТФ-конкурентный ингибитор CDK4/6, – представляет собой инновационный подход к терапии злокачественных новообразований.

Данные, полученные в ходе первого клинического исследования инновационного MM-D37K, показали его удовлетворительную переносимость и безопасность при многократном внутривенном введении в дозах до 240 мг/м^2, что демонстрирует возможность проведения дальнейших клинических исследований противоопухолевой эффективности этого препарата.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Yuan K., Wang X., Dong H. et al. Selective inhibition of CDK4/6: a safe and effective strategy in cancer therapy. Acta Pharm Sin B 2020;11(1):30–54. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.05.001
2. Burbidge O., Pastok M.W., Papini D. et al. Nanobodies restore stability to cancer-associated mutants of p16INK4a. Structure 2025;33(11):1984–97. DOI: 10.1016/j.str.2025.07.017
3. Yang L., Chen Y., Wang N., Han W. A narrative review of the clinical development of CDK4/6 inhibitors. Transl Breast Cancer Res 2022;3:1–10. DOI: 10.21037/tbcr-21-36
4. Abukhdeir A.M., Park H.B. p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. Expert Rev Mol Med 2008;10:e19. DOI: 10.1017/S1462399408000744
5. LaPak K.M., Burd C.E. The molecular balancing act of p16(INK4a) in cancer and aging. Mol Cancer Res 2013;12(2):167–83. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0350
6. Xue Y., Zhai J. Strategy of combining CDK4/6 inhibitors with other therapies in cancer treatment. Int J Clin Exp Pathol 2024;17(7):189–207. DOI: 10.62347/HGNI4903
7. Scheiblecker L., Kollman K., Sexl V. CDK4/6 and MAPK– crosstalk as opportunity for cancer therapy. Pharmaceuticals (Basel) 2020;13(12):418. DOI: 10.3390/ph13120418
8. Wang H., Ba J., Kang Y. et al. Recent progress in CDK4/6 inhibitors and PROTACs. Molecules 2023;28(24):8060. DOI: 10.3390/molecules28248060
9. Кулинич Т.М., Болдырев А.Н., Боженко В.К. Исследование противоопухолевой активности химерного пептида p16_antp *in vivo*. Молекулярная медицина 2014;4:36–9.
   Kulinich T.M., Boldyrev A.N., Bozhenko V.K. Investigation of the antitumor activity of the chimeric peptide p16_antp *in vivo*. Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine 2014;4:36–9. (In Russ.).
10. Уханова Е.М., Кулинич Т.М., Кудинова Е.А. и др. Терапевтические дозовые характеристики химерного пептида MM-D37K при парентеральном введении мышам Balb/c nude с колоректальным раком. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(3):69–74. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-36-41
    Uchanova E.M., Kulinich T.M., Kudiniva E.A. et al. Therapeutic dose characteristics of the chimeric peptide of MM-D37K at parenteral introduction to the Balb/c nude mice with human colorectal carcinoma HCT-116. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2017;16(2):36–41. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-36-41
11. Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. U.S. Department of Health and Human Services. FDA, Pharmacology and Toxicology, 2005. Available at: https://www.fda.gov/media/72309/download

Вклад авторов

Т.М. Кулинич: разработка концепции и дизайна исследования, сбор и обработка материала, анализ полученных данных, написание текста статьи;
Е.А. Кудинова, О.И. Гончарова: анализ клинико-экспериментальных результатов исследования, написание текста статьи, редактирование;
И.А. Пучков: формирование групп пациентов, анализ результатов, написание текста статьи, редактирование;
Я.Ю. Киселева: анализ статистических данных;
К.Г. Аминулла: сбор и обработка данных, написание текста статьи;
В.К. Боженко: разработка концепции и дизайна исследования, редактирование;
В.А. Солодкий: разработка концепции и дизайна исследования, редактирование.

Authors' contributions

T.M. Kulinich: development of the concept and design of the study, collection and processing of the material, analysis of the data obtained, article writing;
E.A. Kudinova, O.I. Goncharova: analysis of clinical and experimental research results, article writing, editing;
I.A. Puchkov: formation of patient groups, analysis of results, article writing, editing;
Ya.Yu. Kiseleva: analysis of statistical data;
K.G. Aminulla: data collection and processing, article writing;
V.K. Bozhenko: development of the research concept and design, editing;
V.A. Solodkiy: development of the research concept and design, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.М. Кулинич / T.M. Kulinich: https://orcid.org/0000-0003-2331-5753
Е.А. Кудинова / E.A. Kudinova: https://orcid.org/0000-0002-5530-0591
О.И. Гончарова / O.I. Goncharova: https://orcid.org/0009-0001-5114-8182
И.А. Пучков / I.A. Puchkov: https://orcid.org/0009-0001-6651-8975
Я.Ю. Киселева / Ya.Yu. Kiseleva: https://orcid.org/0000-0002-8352-4787
В.К. Боженко / V.K. Bozhenko: https://orcid.org/0000-0001-8351-8152
В.А. Солодкий / V.A. Solodkiy: https://orcid.org/0000-0002-1641-6452

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

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Минздрава России (регистрационный номер 1024101400019-9-3.2.21).
Funding. The study was performed with financial support from the Ministry of Health of Russia (registration number 1024101400019-9-3.2.21).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования № MM-D37K-101. Версия 3.2 от 12 декабря 2014 г. разрешен и одобрен Минздравом России (№ 63 от 17 февраля 2014 г.). Одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России.
Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Ministry of Health of Russia.
All patients signed an informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 07.11.2025. **Принята к публикации:** 30.11.2025. **Опубликована онлайн:** 10.12.2025.
Article submitted: 07.11.2025. **Accepted for publication:** 30.11.2025. **Published online:** 10.12.2025.

DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-158-164

Варианты экспрессии EpCAM в циркулирующих и диссеминированных опухолевых клетках при раке молочной железы

В.М. Перельмутер[1, 2], В.В. Алифанов[1], Е.С. Григорьева[1], Л.А. Таширева[1], Е.С. Пудова[1], О.Е. Савельева[1, 3], Е.Ю. Гарбуков[1], М.А. Вострикова[1], М.В. Завьялова[1, 4], Н.В. Чердынцева[1, 2]

[1]Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; Россия, 634009 Томск, пер. Кооперативный, 5;
[2]ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»; Россия, 634050 Томск, пр-кт Ленина, 36;
[3]ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России; Россия, 194100 Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2;
[4]ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2

Контакты: Надежда Викторовна Чердынцева *nvch@tnimc.ru*

Введение. Потеря мембранной экспрессии гликопротеина адгезии эпителия EpCAM – основного маркера циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) – зачастую ассоциирована с эпителиально-мезенхимальным переходом, который способствует опухолевой диссеминации. Различия фенотипических вариантов опухолевых клеток без экспрессии мембранного EpCAM как среди ЦОК в крови, так и среди диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) в костном мозге позволят идентифицировать клетки, способные к интра- и экстравазации, т. е. выявить популяции, обладающие метастатическим потенциалом.
Цель исследования – определить наличие и соотношение в ЦОК и ДОК клеток опухоли с мембранной (mEpCAM) и внутриклеточной (icEpCAM) локализацией и выраженностью экспрессии EpCAM (низкой и высокой) при раке молочной железы.
Материалы и методы. Объектом исследования были ЦОК и ДОК пациенток с раком молочной железы. Фенотипирование проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием антител к CD45, EpCAM и пан-цитокератину. Экспрессию EpCAM анализировали с учетом локализации (мембранная/внутриклеточная) и уровня экспрессии (низкий/высокий).
Результаты. Клетки с отсутствием мембранной экспрессии EpCAM преобладали среди ЦОК, тогда как в костном мозге они практически не обнаруживались. Не все фенотипы ЦОК присутствовали в ДОК, что может объясняться селекцией клеток на этапе экстравазации или клеточной пластичностью. Примечательно, что в отличие от первичной опухоли, в ЦОК и ДОК полностью отсутствовали клетки с коэкспрессией мембранного и внутриклеточного EpCAM.
Заключение. Таким образом, можно сделать вывод о потенциале ЦОК к интра- и экстравазации с различными вариантами экспрессии EpCAM. Однако их способность формировать клинически выявляемые метастазы требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: циркулирующие опухолевые клетки, диссеминированные опухолевые клетки, рак молочной железы, EpCAM

Для цитирования: Перельмутер В.М., Алифанов В.В., Григорьева Е.С. и др. Варианты экспрессии EpCAM в циркулирующих и диссеминированных опухолевых клетках при раке молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(4):158–64.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-158-164

EpCAM expression patterns in circulating and disseminated tumor cells in breast cancer

V.M. Perelmuter[1, 2], V.V. Alifanov[1], E.S. Grigorieva[1], L.A. Tashireva[1], E.S. Pudova[1], O.E. Savelieva[1, 3], E.Yu. Garbukov[1], M.A. Vostrikova[1], M.V. Zavyalova[1, 4], N.V. Cherdyntseva[1, 2]

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

[2]National Research Tomsk State University; 36 Lenina Prospekt, Tomsk 634050, Russia;
[3]Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Litovskaya St., Saint Petersburg 194100, Russia;
[4]Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moskovsky Trakt, Tomsk 634050, Russia

Contacts: Nadezhda Viktorovna Cherdyntseva *nvch@tnimc.ru*

Introduction. Loss of membrane expression of the epithelial adhesion glycoprotein EpCAM, the primary marker of circulating tumor cells (CTCs), is often associated with epithelial-mesenchymal transition, which facilitates tumor dissemination. Distinguishing phenotypic variants of tumor cells lacking membrane EpCAM expression in both blood and disseminated tumor cells (DTC) in bone marrow will enable the identification of cells capable of intra- and extravasation, i. e. the identification of populations with metastatic potential.
Aim. To determine the presence and ratio of tumor cells with membrane (mEpCAM) and intracellular (icEpCAM) localization and the degree of EpCAM expression (low and high) among CTCs and DTCs in breast cancer.
Materials and methods. The study involved CTCs and DTCs from breast cancer patients. Phenotyping was performed by flow cytometry using antibodies to CD45, EpCAM and pan-cytokeratin. EpCAM expression was analyzed based on localization (membrane/intracellular) and expression level (low/high).
Results. Cells lacking membrane EpCAM expression predominate among CTCs, whereas they were virtually undetectable in bone marrow. Not all CTC phenotypes are present in DTCs, which may be explained by cell selection during extravasation or cellular plasticity. Notably, unlike in primary tumors, CTCs and DTCs completely lack cells co-expressing membrane and intracellular EpCAM.
Conclusion. This study suggests the potential for intra- and extravasation of CTCs with different EpCAM expression patterns. However, their ability to form clinically detectable metastases requires further study.

Keywords: circulating tumor cells, disseminated tumor cells, breast cancer, EpCAM

For citation: Perelmuter V.M., Alifanov V.V., Grigorieva E.S. et al. EpCAM expression patterns in circulating and disseminated tumor cells in breast cancer. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(4):158–64. (In Russ.).
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-4-158-164

ВВЕДЕНИЕ

Гематогенное метастазирование – основная причина неблагоприятного исхода рака молочной железы (РМЖ). Непосредственным источником метастазов являются диссеминированные опухолевые клетки (ДОК), которые колонизируют ткани в результате экстравазации циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК). При этом лишь небольшая часть гетерогенной популяции ЦОК способна преодолеть все этапы метастатического каскада и стать источником ДОК [1].

Одним из важных маркеров опухолевых клеток, ассоциированных с метастатическим потенциалом, является EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) [2] – трансмембранный белок, участвующий в межклеточной адгезии и передаче сигналов, регулирующих пролиферацию и стволовые свойства клеток. Хотя клетки с мембранной экспрессией EpCAM (mEpCAM$^+$) традиционно считаются основными участниками метастатического процесса, накапливается все больше данных о важности клеток, на мембране которых EpCAM не экспрессируется (mEpCAM$^-$) [3].

Потеря мембранной экспрессии EpCAM (mEpCAM$^-$) зачастую ассоциируется с фенотипом эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [4]. Отсутствие экспрессии mEpCAM может либо сочетаться с внутриклеточной экспрессией EpCAM (icEpCAM+) вследствие его транслокации, либо быть связанным с полным отсутствием EpCAM, что может быть одним из признаков гибридного, мезенхимального или терминального фенотипов ЭМП [5]. Анализ различных фенотипических вариантов опухолевых клеток без экспрессии мембранного EpCAM как в крови, так и в костном мозге актуален для идентификации клеток, ассоциированных с метастазами.

Цель исследования – определить среди ЦОК и ДОК наличие и соотношение клеток опухоли с мембранной (mEpCAM) и внутриклеточной (icEpCAM) локализацией и выраженностью экспрессии EpCAM (низкой (mEpCAM^{low}) и высокой (mEpCAM^{high})) при РМЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследование включены пациентки с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа (T1–4N0–3M0), получавшие лечение по показаниям в Научно-исследовательском институте онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра в период с 2017 по 2024 г.

Детекция и фенотипирование ЦОК у пациенток с РМЖ. Материалом для изучения фенотипов ЦОК послужила венозная кровь пациенток ($n = 48$). Оценку фенотипических вариантов ЦОК осуществляли методом проточной цитофлуориметрии с применением коктейля моноклональных антител против маркеров CD45, EpCAM, цитокератинов (CK) (CK 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 15, 16, 19) и N-кадгерина.

Оценивали как мембранную, так и внутриклеточную экспрессию EpCAM. Окрашивание проводили в 2 этапа. На 1-м этапе осуществляли окрашивание поверхностных маркеров BV570-anti-CD45 (клон HI30, мышиные IgG1, Sony Biotechnology, США), R718-anti-EpCAM (клон EBA-1, мышиные IgG2a, BD Biosciences, США), PE-Cy7-анти-N-cadherin (клон 8C11, мышиные IgG1, Sony Biotechnology, США).

В контрольный образец добавляли соответствующий изотипический контроль в аналогичной концентрации, затем – по 250 мкл лизирующего буфера OptiLyse (Beckman Coulter, США) в неокрашенный контроль и окрашенную пробу. К каждому неокрашенному, окрашенному и контрольному образцу добавляли 250 мкл пермеабилизирующего раствора BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, США) и инкубировали в темноте 30 мин при 4 °C. К пробам добавляли 50 мкл буфера BD Perm/Wash (BD Biosciences, США), 5 мкл Fc-блока (Sony Biotechnology, США), перемешивали на вортексе и инкубировали 10 мин при 4 °C.

На 2-м этапе проводили внутриклеточное окрашивание антителами BV605-anti-EpCAM (клон 9C4, мышиные IgG2b, Sony Biotechnology, США), AF647-анти-CK7/8 (клон CAM5.2, мышиные IgG2a, BD Pharmingen, США), eFluor 660-анти-pan Cytokeratin (клон AE1/AE3, eBioscience, США) и PE-анти-ALDH1A1 (клон 03, мышиные IgG1, Sino Biological, Китай) или 5 мкл соответствующего изотипического контроля. Образцы анализировали на проточном цитометре NovoCyte 3000 (ACEA Biosciences, Agilent, США). Гейтирование популяций клеток проводили на основе определения параметров малого углового светорассеяния (FSC) и бокового светорассеяния (SSC). Затем клетки анализировали на наличие флуоресценции в режимах Density Plot и Dot Plot. Полученные результаты выражали в количестве клеток на 1 мл крови. Экспрессию mEpCAM оценивали как высокую (high) и низкую (low). Сигнал в 5-й декаде логарифмической шкалы интенсивности флуоресценции, определенный по неокрашенному контролю, служил границей для отнесения ЦОК к EpCAM^{low}. Эмпирически установленная граница в 6-й декаде использовалась для определения клеток с высоким уровнем экспрессии EpCAM^{high} в ЦОК.

Детекция и фенотипирование ДОК у пациенток с РМЖ. Для оценки количества ДОК и их фенотипов использовали аспират костного мозга, который был взят из грудины во время хирургического этапа лечения пациенток (*n* = 12). Полученный аспират стабилизировали этилендиаминтетрауксусной кислотой и проводили процедуру отрицательной селекции лейкоцитарных антигенов с использованием RosetteSep™ Human CD45 Depletion Cocktail (STEMCELL Technologies, США).

Цитофлуориметрическое окрашивание выполняли аналогично методике, приведенной в предыдущем разделе. На 1-м этапе проводили окрашивание поверхностных антигенов следующими антителами: BV570-anti-CD45 (клон HI30, мышиные IgG1, Sony Biotechnology, США), AF488-anti-EpCAM (клон EBA-1, мышиные IgG2a, BD Biosciences, США), PE-Cy7-анти-N-cadherin (клон 8C11, мышиные IgG1, Sony Biotechnology, США), APC/Cyanine7-anti-CD235a (glycophorin A) (клон HI264, мышиные IgG2a, Biolegend, США), PE-anti-CD71 (клон CY1G4, мышиные IgG2a, Sony Biotechnology, США). На 2-м этапе выполняли окрашивание внутриклеточных мишеней: BV605-anti-EpCAM (клон 9C4, мышиные IgG2b, Sony Biotechnology, США), PE-анти-CK7/8 (клон CAM5.2, мышиные IgG2a, BD Pharmingen, США), eFluor 660-анти-pan Cytokeratin (клон AE1/AE3, eBioscience, США). Полученные результаты выражали в количестве клеток на 1 мл костного мозга и определяли частоту встречаемости различных вариантов экспрессии EpCAM у пациенток (рис. 1).

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием программного пакета Prism GraphPad 10. Различия между двумя независимыми группами оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Частоту встречаемости внутри групп оценивали с использованием χ^2-критерия и точного критерия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Частота встречаемости и количество ЦОК различных фенотипов в крови пациенток с РМЖ. При анализе фенотипических вариантов ЦОК обнаружено, что опухолевые клетки с тотальным отсутствием EpCAM (CD45^{-}mEpCAM^{-}icEpCAM^{-}panCK^{+}) встречаются в периферической крови чаще других и в наибольшем количестве. Частота выявления и количество mEpCAM^{low}-ЦОК в сочетании с отсутствием внутриклеточного домена EpCAM (CD45^{-}mEpCAM^{low}icEpCAM^{-}panCK$^{+/-}$) были сопоставимы с частотой и количеством ЦОК, экспрессирующих EpCAM внутриклеточно (CD45^{-}mEpCAM^{-}icEpCAM^{+}panCK$^{+/-}$). Распространенность и количество субпопуляций ЦОК с фенотиом mEpCAM^{low} (CD45^{-}mEpCAM^{low}icEpCAM^{-}panCK$^{+/-}$) и icEpCAM (CD45^{-}mEpCAM^{-}icEpCAM^{+}panCK$^{+/-}$) оказались выше, чем клеток с фенотипом mEpCAM^{high} (CD45^{-}mEpCAM^{high}icEpCAM^{-}panCK$^{+/-}$). Среди исследуемых ЦОК отсутствовали клетки, сочетающие экспрессию mEpCAM и icEpCAM (рис. 2).

Анализ фенотипических вариантов ДОК в костном мозге пациенток с РМЖ. В исследованных образцах костного мозга отсутствовали mEpCAM^{+}-ДОК, кроме 1 случая, в котором обнаружена 1 клетка с фенотипом CD45^{-}mEpCAM^{+}icEpCAM^{-}CK7/8^{-}panCK^{-} в 1 мл костного мозга. Выявлены 3 субпопуляции mEpCAM^{-}-ДОК (см. рис. 2). В большем количестве обнаружены ДОК с фенотипами CD45^{-}mEpCAM^{-}icEpCAM^{-}CK7/8^{-}panCK^{-}, CD45^{-}mEpCAM^{-}icEpCAM^{+}CK7/8^{-}panCK^{-} и CD45^{-}mEpCAM^{-}icEpCAM^{-}CK7/8^{+}panCK^{-} (рис. 3). Частота ДОК с экспрессией CD45^{-}mEpCAM^{-}icEpCAM^{+}CK7/8^{-}panCK^{-} составила 41,7 % (5/12), CD45^{-}mEpCAM^{-}icEpCAM^{-}CK7/8^{+}panCK^{-} – 58,3 % (7/12). При этом у 4 пациенток обнаружены клетки обоих фенотипов одновременно, но отсутствовали клетки с коэкспрессией маркеров icEpCAM^{+} и CK7/8^{+}. Приме-

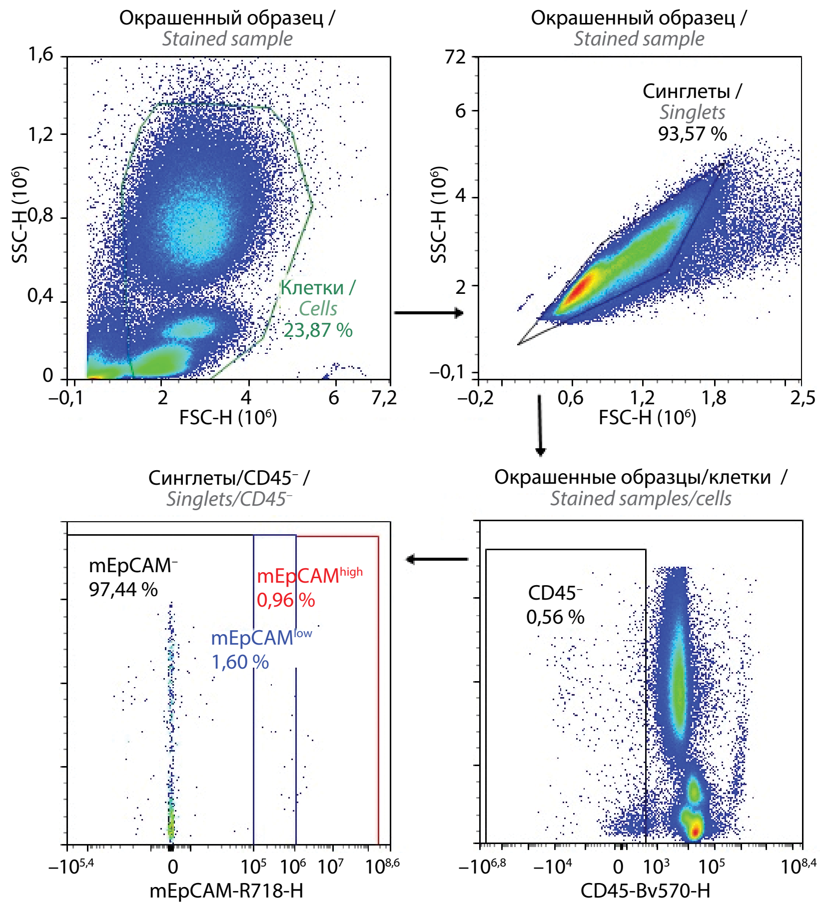


Рис. 1. *Результаты анализа образца периферической крови пациентки с раком молочной железы методом проточной цитометрии для выявления циркулирующих опухолевых клеток с высоким (mEpCAM^{high}) и низким (mEpCAM^{low}) уровнями экспрессии mEpCAM. Применялось последовательное гейтирование: сначала выделялась клеточная популяция по параметрам размера (FSC) и зернистости (SSC), а затем проводилась дискриминация дублетов для отбора синглетов. В этой популяции оценивалась экспрессия панлейкоцитарного маркера CD45 для исключения клеток CD45^{+}, что позволило идентифицировать события CD45^{-} для дальнейшей идентификации циркулирующих опухолевых клеток mEpCAM^{high} и mEpCAM^{low}. FSC – малое угловое светорассеяние; SSC – боковое светорассеяние*

Fig. 1. *The results of the flow cytometry analysis of a peripheral blood sample from a breast cancer patient for circulating tumor with high (mEpCAM^{high}) and low (mEpCAM^{low}) levels of mEpCAM expression. Sequential gating was applied, first isolating the cell population based on size (FSC) and granularity (SSC) parameters, followed by discrimination of doublets to select singlets. Within this population, expression of the pan-leukocyte marker CD45 was assessed to exclude CD45^{+} cells, enabling identification of CD45^{-} events for subsequent classification of mEpCAM^{high} and mEpCAM^{low} circulating tumor cells. FSC – forward scatter; SSC – side scatter*

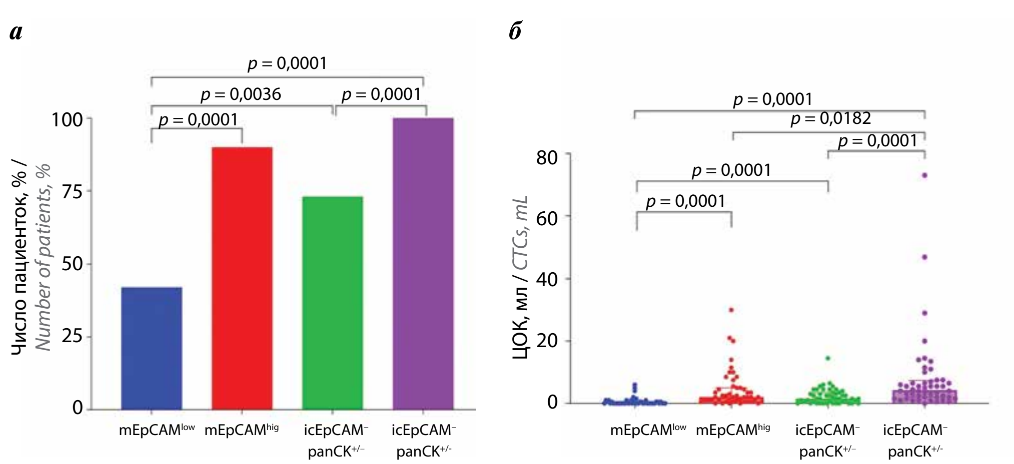


Рис. 2. *Частота встречаемости (а) и количество (б) циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) с различными вариантами экспрессии EpCAM у больных раком молочной железы*

Fig. 2. *Frequency of occurrence (а) and number (б) of circulating tumor cells (CTCs) exhibiting different variants of EpCAM expression in breast cancer patients*

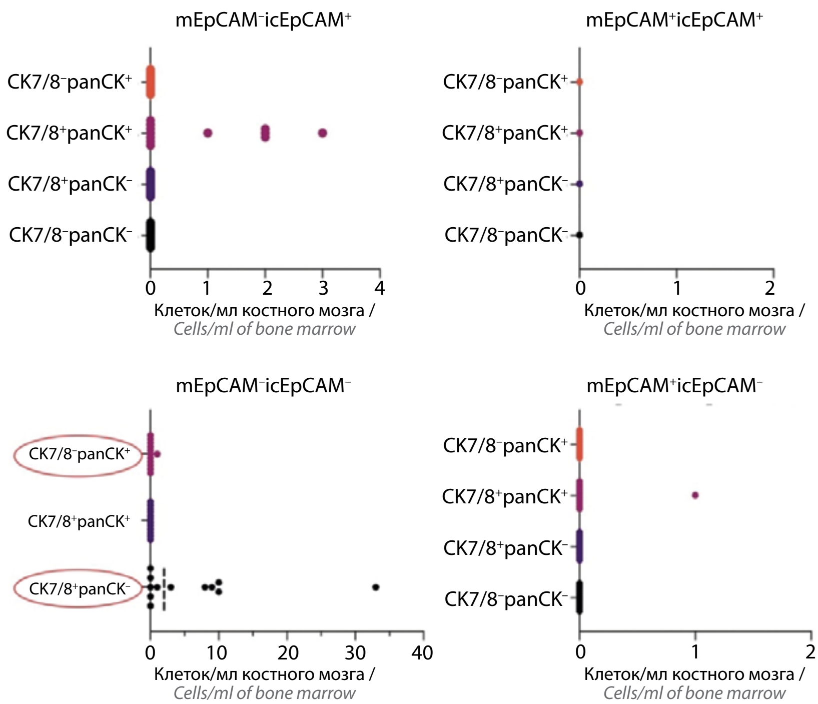


Рис. 3. *Количество диссеминированных опухолевых клеток разных фенотипов в материале костного мозга пациенток с раком молочной железы, клеток/мл*
Fig. 3. *Number of disseminated tumor cells detected in bone marrow samples from patients with breast cancer, cells/mL*

чательно, что у 1 из 4 больных наряду с двумя вышеуказанными популяциями выявлена 1 кл/мл ДОК с фенотипом CD45$^-$mEpCAM$^-$icEpCAM$^-$CK7/8$^-$panCK$^+$.

Сравнительный анализ фенотипических вариантов ЦОК и ДОК. Уточнение фенотипов 2 основных популяций mEpCAM и icEpCAM показало, что ДОК с моноэкспрессией icEpCAM (CD45$^-$mEpCAM$^-$icEpCAM$^+$CK7/8$^-$panCK$^-$) характеризуются отсутствием экспрессии N-кадгерина. Для выявления субпопуляции опухолевых клеток, которые наиболее успешно преодолели начальные этапы метастатического каскада (интравазация, выживание в циркуляции и экстравазация), проведен сравнительный анализ фенотипических вариантов ЦОК в периферической крови и ДОК в костном мозге. Оказалось, что частота встречаемости клеток с моноэкспрессией icEpCAM (CD45$^-$mEpCAM$^-$icEpCAM$^+$CK7/8$^-$panCK$^-$) среди ЦОК составила 50 % (6/12), а среди ДОК – 41,7 % (5/12). Наблюдались случаи, когда клетки с указанным фенотипом присутствовали в ЦОК, но не обнаруживались в костном мозге (33,3 %; 4/12). Отмечался и противоположный вариант, когда клетки с таким фенотипом отсутствовали в ЦОК, но были выявлены в ДОК (25 %; 3/12). Только в 2 из 12 (16,6 %) случаев клетки CD45$^-$mEpCAM$^-$icEpCAM+CK7/8$^-$panCK$^-$ присутствовали как в ЦОК, так и в ДОК.

Клетки с моноэкспрессией CK7/8 (CD45$^-$mEpCAM$^-$icEpCAM$^-$CK7/8$^+$panCK$^-$) встречались у всех 12 пациенток в ЦОК и у 7/12 (59,9 %) в ДОК, клетки с моноэкспрессией panCK (CD45$^-$mEpCAM$^-$icEpCAM$^-$CK7/8$^-$panCK$^+$) – у 11 (91 %) пациенток в ЦОК и только в 1 из 12 (8,3 %) случаев в ДОК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Помимо классических EpCAM-положительных и EpCAM-отрицательных опухолевых клеток, существуют и промежуточные варианты, к которым относятся клетки с выраженной или слабой мембранной экспрессией EpCAM в отсутствие внутриклеточной экспрессии (mEpCAM^{high}icEpCAM$^-$ и mEpCAM^{low}icEpCAM$^-$ соответственно), а также клетки без мембранной, но с внутриклеточной экспрессией (mEpCAM$^-$icEpCAM$^+$). Каждое из этих состояний может иметь различный потенциал к участию в метастатическом процессе. В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ ЦОК и ДОК в зависимости от варианта экспрессии EpCAM, сделан акцент на соотношении мембранной и внутриклеточной экспрессиях EpCAM.

Клетки с тотальным отсутствием EpCAM составляли большинство ЦОК. Частота выявления и количество icEpCAM и mEpCAM^{low} не различались и превышали количество клеток с фенотипом mEpCAM^{high}. Среди ДОК не обнаружено случаев с mEpCAM. Опухолевые клетки без экспрессии EpCAM на клеточной мембране широко представлены как среди ЦОК, так и среди ДОК.

Потеря мембранной экспрессии EpCAM часто ассоциирована с ЭМП [4]. В контексте опухолевой прогрессии процесс ЭМП способствует появлению подвижности опухолевых клеток и их способности к инвазии, интравазации, выживанию в крови и формированию метастазов после экстравазации в отдаленных органах [5, 6].

Ранее мы показали, что в популяции mEpCAM⁻-ЦОК присутствуют все варианты стволовых клеток, определяемых по комбинациям экспрессии маркеров CD44/CD24 и CD133. По этим признакам mEpCAM⁻-ЦОК подобны mEpCAM⁺-ЦОК. Кроме этого, mEpCAM⁻-ЦОК характеризовались гиперэкспрессией генов, участвующих в провоспалительных реакциях [7]. Есть все основания предполагать, что mEpCAM⁻-ЦОК и mEpCAM⁻-ДОК могут иметь потенциал к метастазированию.

Наряду с фенотипами mEpCAM⁻, которые обнаруживались как среди ЦОК, так и среди ДОК, имеются клетки, которые выявляются либо среди ЦОК, либо среди ДОК. Абсолютного тождества фенотипов ЦОК и ДОК и не следовало ожидать. Это обусловлено тем, что, по-видимому, не все ЦОК обладают потенциями к экстравазации, а часть клеток, проникших в костный мозг, вследствие пластичности могут изменить свой фенотип. Наличие среди ДОК CD45⁻-клеток, не экспрессирующих эпителиальные маркеры, исследованные в работе, может быть объяснено формированием состояния терминального ЭМП, с потерей эпителиальных маркеров. По данным ряда исследований, при раннем РМЖ выявление ДОК связано с худшим прогнозом и уменьшением общей выживаемости. Примерно у 30 % таких пациенток в костном мозге обнаруживают микрометастазы, источником которых являются ДОК [8].

Обращает на себя внимание феномен отсутствия случаев среди ЦОК и ДОК коэкспрессии mEpCAM и icEpCAM, хотя такие клетки постоянно обнаруживались в большинстве первичных опухолей (не опубликованные данные). Кроме этого, в костном мозге отсутствовали и mEpCAM⁺-ДОК. Не исключено, что оба феномена обусловлены тем, что клетки с коэкспрессией mEpCAM и icEpCAM не обладают способностью к интравазации, а ЦОК с мембранной экспрессией EpCAM – к экстравазации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования демонстрируют сложный и неоднородный характер экспрессии EpCAM в ЦОК и ДОК. Установлено, что среди них преобладают mEpCAM⁻-клетки. В то же время mEpCAM⁺-клетки отсутствуют в костном мозге. Это указывает на то, что потеря мембранной экспрессии EpCAM, ассоциированная с ЭМП, является ключевым признаком клеток, способных к диссеминации и, вероятно, к метастазированию. Важной находкой также можно считать отсутствие абсолютного тождества между фенотипами ЦОК и ДОК, что может быть объяснено как наличием селекции, так и клеточной пластичностью.

Особого внимания заслуживает феномен отсутствия среди ЦОК и ДОК клеток с сочетанием мембранной и внутриклеточной экспрессий EpCAM, хотя такие клетки часто встречаются в первичной опухоли. Это позволяет предположить, что данный фенотип не обладает инвазивным потенциалом или способностью к интравазации.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Thery L., Meddis A., Cabel L. et al. Circulating tumor cells in early breast cancer. JNCI Cancer Spectrum 2019;3(2):pkz026. DOI: 10.1093/jncics/pkz026
2. Gires O., Pan M., Schinke H. et al. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? Cancer Metastasis Rev 2020;39(3):969–87. DOI: 10.1007/s10555-020-09898-3
3. Ye F., Qiu Y., Li L. et al. The presence of EpCAM(–)/CD49f(+) cells in breast cancer is associated with a poor clinical outcome. J Breast Cancer 2015;18(3):242–8. DOI: 10.4048/jbc.2015.18.3.242
4. Zhang D., Yang L., Liu X. et al. Hypoxia modulates stem cell properties and induces EMT through N-glycosylation of EpCAM in breast cancer cells. J Cell Physiol 2020;235(4):3626–33. DOI: 10.1002/jcp.29252
5. Перельмутер В.М., Таширева Л.А., Григорьева Е.С. и др. Патогенетическое и клиническое значение особенностей экспрессии EpCAM в опухоли и циркулирующих опухолевых клетках. Сибирский онкологический журнал 2024;23(5):133–45. DOI: 10.21294/1814-4861-2024-23-5-133-145
   Perelmuter V.M., Tashireva L.A., Grigoryeva E.S. et al. Pathogenetic and clinical signifcance of EpCAM expression features in tumors and circulating tumor cells. Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology 2024;23(5):133–45. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2024-23-5-133-145
6. Aiello N.M., Kang Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. J Exp Med 2019;216(5):1016–26. DOI: 10.1084/jem.20181827
7. Perelmuter V.M., Grigoryeva E.S., Alifanov V.V. et al. Characterization of EpCAM-positive and EpCAM-negative tumor cells in early-stage breast cancer. Int J Mol Sci 2024;25(20):11109. DOI: 10.3390/ijms252011109
8. Domschke C., Diel I.J., Englert S. et al. Prognostic value of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with operable primary breast cancer: a long-term follow-up study. Ann Surg Oncol 2013;20(6):1865–71. DOI: 10.1245/s10434-012-2814-4

Вклад авторов
В.М. Перельмутер: разработка концепции и дизайна исследования, анализ полученных данных;
В.В. Алифанов: проведение исследований по определению циркулирующих опухолевых клеток, обобщение полученных данных, подготовка иллюстративного материала;
Е.С. Григорьева: анализ полученных данных, написание текста статьи;
Л.А. Таширева: проведение исследований, анализ и обобщение полученных данных;
Е.С. Пудова: обработка и анализ полученных данных;
О.Е. Савельева: курация проведения инструментальных исследований, анализ полученных данных;
Е.Ю. Гарбуков: сбор анамнеза пациенток и анализ клинических данных;
М.А. Вострикова: сбор и анализ клинических данных;
М.В. Завьялова: обработка полученных данных, редактирование;
Н.В. Чердынцева: планирование и организациия исследований, анализ и обработка полученных данных, редактирование.
Authors' contributions
V.M. Perelmuter: development of the research concept and design, analysis of the data obtained;
V.V. Alifanov: conducting research to identify circulating tumor cells, summarizing the data obtained, preparing illustrative material;
E.S. Grigorieva: analysis of the data obtained, article writing;
L.A. Tashireva: conducting research, analyzing and summarizing the data obtained;
E.S. Pudova: processing and analysis of the received data;
O.E. Savelieva: curation of instrumental research, analysis of the data obtained;
E.Yu. Garbukov: collecting patient anamnesis and analyzing clinical data;
M.A. Vostrikova: collection and analysis of clinical data;
M.V. Zavyalova: processing of the received data, editing;
N.V. Cherdyntseva: planning and organization of research, analysis and processing of the received data, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors
В.М. Перельмутер / V.M. Perelmuter: https://orcid.org/0000-0002-7633-9620
Е.С. Григорьева / E.S. Grigorieva: https://orcid.org/0000-0003-4737-8951
Л.А. Таширева / L.A. Tashireva: https://orcid.org/0000-0003-2061-8417
О.Е. Савельева / O.E. Savelieva: https://orcid.org/0000-0002-0301-8455
Е.Ю. Гарбуков / E.Yu. Garbukov: https://orcid.org/0000-0002-2917-8158
М.В. Завьялова / M.V. Zavyalova: https://orcid.org/0000-0001-9429-9813
Н.В. Чердынцева / N.V. Cherdyntseva: https://orcid.org/0000-0003-1526-9013

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-15-00135).
Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 23-15-00135).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики
Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук».
Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Compliance with patient rights and principles of bioethics
The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences.
All patients signed informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 12.09.2025. **Принята к публикации:** 28.10.2025. **Опубликована онлайн:** 10.12.2025.
Article submitted: 12.09.2025. **Accepted for publication:** 28.10.2025. **Published online:** 10.12.2025.