

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



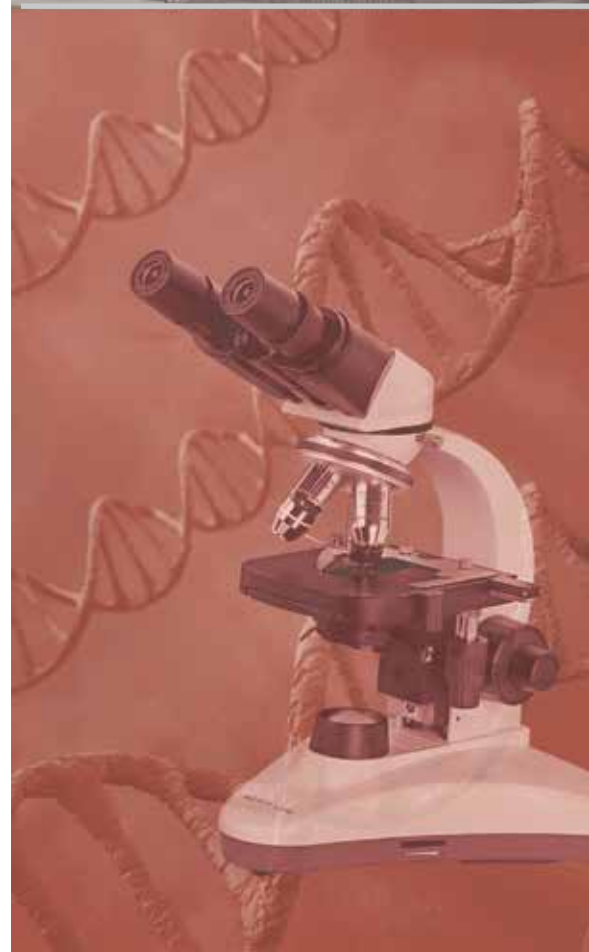
*Внеклеточные везикулы
в диагностике глиобластомы*

*МикроРНК
при нейроэндокринных
новообразованиях желудка*

*Рак желудка, ассоциированный
с вирусом Эпштейна–Барр*

*Экзосомы и регуляция
эстрогенового сигналинга
в клетках рака
молочной железы*

ТОМ 7 № 3
2020



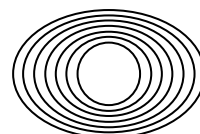
Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук.

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

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



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

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

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

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

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

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

3 ^{ТОМ 7}
'20

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

Адрес редакции:
115478, Москва, Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +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 Н.В. Жукова
Корректор Т.Н. Помилуйко
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук

Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

*Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору*

*в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций
(ПИ № ФС77-57560 от 08.04.2014)*

**При полной или частичной
перепечатке материалов ссылка
на журнал «Успехи молекулярной
онкологии» обязательна.**
**Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых рекламных
материалов.**
**В статьях представлена точка
зрения авторов, которая может
не совпадать с мнением редакции.**

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

Успехи молекулярной онкологии.
2020. Том 7. № 3. 1–64

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2020

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»
127273, Москва, Сигнальный проезд, 19.
Тираж 1000 экз.

Бесплатно.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Красильников Михаил Александрович, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующий отделом экспериментальной биологии опухолей (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

Карпухин Александр Васильевич, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» (Москва, Россия)

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

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

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

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

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

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., директор Департамента комплексных программ и проектов Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Москва, Россия)

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

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

Юрисич Владимир, профессор факультета медицинских наук Университета Крагуеваца (Крагуевац, Сербия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Белицкий Геннадий Альтерович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

Зарилзе Давид Георгиевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом эпидемиологии и профилактики опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Копнин Борис Павлович, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории цитогенетики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кушлинский Николай Евгеньевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии НИИ клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Лихтенштейн Анатолий Владимирович, д.б.н., руководитель группы биохимии опухолей отдела экспериментальной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

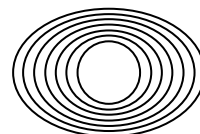
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

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

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

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

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



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

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

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

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

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

FOUNDED IN 2014

3 Vol. 7
'20

Founders:

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

Editorial Office:

Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Build. 15
Kashirskoe Shosse, Moscow
Tel./Fax: +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 N.V. Zhukova
Proofreader T.N. Pomiluyko
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

Subscription & Distribution Service
I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

The journal was registered
at the Federal Service for Surveillance
of Communications, Information

Technologies, and Mass Media
(III No. ФС77-57560 dated
08 April 2014).

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

The editorial board is not responsible
for advertising content.

The authors, point of view given
in the articles may not coincide
with the opinion of the editorial board.

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

Uspekhi molekulyarnoy
onkologii. 2020. Vol. 7
No. 3. 1—64

© PH "ABV-Press", 2020
Pressa Rossii catalogue
index: 93562

Printed at the Mediacolor LLC.
19, Signalnyy Proezd,
Moscow, 127273.

1000 copies. Free distribution.

EDITOR-IN-CHIEF

Krasil'nikov Mikhail A., DSc, PhD, Professor, Deputy Director for Research Work of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Director of the Research Institute of Carcinogenesis, Head of Department of Experimental Biology of Tumors (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

EXECUTIVE EDITOR

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

EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

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

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

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

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

Karpukhin Aleksander V., DSc, PhD, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Genetics of Complex Inherited Diseases of the Medical Genetic Research Center (Moscow, Russia)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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

Kopnin Boris P., DSc, PhD, Professor, Head Researcher at the Cytogenetics Laboratory, Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

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

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

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

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

Информация для авторов

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

1. Общие правила

Статья должна сопровождаться официальным направлением учреждения, в котором проведена данная работа, с подписью руководителя, заверенной печатью учреждения.

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

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

Последняя страница должна содержать:

- Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
 - фамилия, имя, отчество полностью,
 - занимаемая должность,
 - ученая степень, ученое звание,
 - персональный международный идентификатор ORCID (подробнее: <http://orcid.org/>),
 - персональный идентификатор в РИНЦ (подробнее: http://elibrary.ru/projects/science_index/author_tutorial.asp),
 - контактный телефон,
 - рабочий адрес с указанием индекса,
 - адрес электронной почты.
- Скан подписей всех авторов статьи.

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

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

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

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

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

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

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

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

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

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

- при наличии финансирования исследования – указать его источник (грант и т. д.),
- благодарности (раздел не является обязательным).

7. Иллюстративный материал

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

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

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

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подписными 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 подписной подписи. Подписи к рисункам даются на русском и английском языках на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле. Все надписи на рисунках также должны быть переведены на английский язык.

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

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, полимеразная цепная реакция (ПЦР)).

9. Список литературы

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

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

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

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

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

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

При ссылке на **статьи из журналов** после авторов указывают название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы, DOI статьи (при наличии). При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания, число страниц. В ссылках на русскоязычные источники необходимо дополнительно указывать информацию для цитирования на латинице.

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

Общие положения:

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

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

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

- А.И. Рябова, В.А. Новиков, Н.В. Юнусова, А.А. Пономарева, Л.В. Спирина, О.В. Грибова*
Роль внеклеточных везикул в диагностике прогрессирования глиобластомы 8
- И.Н. Перегородиев, С.В. Винокурова, В.Ю. Бохян, В.В. Делекторская, О.А. Малихова,
В.А. Горбунова, Б.И. Сакибов, Д.С. Елкин, И.С. Стилиди*
Роль микроРНК при нейроэндокринных новообразованиях желудка 19
- Е.О. Игнатова, Д.А. Серяк, М.Ю. Федянин, А.А. Трякин, И.А. Покатаев, С.Ф. Меньшикова,
Ю.В. Вахабова, М.С. Карбышев, К.В. Смирнова, С.А. Тюляндин*
Молекулярный портрет рака желудка, ассоциированного с вирусом Эпштейна–Барр 27

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- М.А. Зайцева, А.П. Шехтман, Л.И. Папуша, Э.Ф. Валиахметова, Л.А. Ясько, А.Е. Друй*
Анализ генетических aberrаций в глиомах высокой степени злокачественности у детей 37
- Н.Н. Мазуренко, И.В. Цыганова, В.В. Стрельников, А.В. Балбуцкий, Т.Ф. Маливанова, Е.Б. Кузнецова,
В.А. Драудин-Крыленко, О.В. Шаньгина, А.Ф. Мукерия, В.Б. Матвеев, Д.Г. Заридзе*
Спектр мутаций гена *VHL* при спорадическом светлоклеточном почечно-клеточном раке 48

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

- Д.В. Сорокин, О.Е. Андреева, Е.И. Михаевич, Ю.Ю. Щеголев, А.М. Щербаков,
М.В. Гудкова, М.А. Красильников*
**Эффект негативной регуляции эстрогенового сигналинга под действием экзосом:
роль в развитии резистентности клеток рака молочной железы** 58
-

REVIEWS

<i>A.I. Ryabova, V.A. Novikov, N.V. Yunusova, A.A. Ponomareva, L.V. Spirina, O.V. Gribova</i> The role of extracellular vesicles in the diagnosis of glioblastoma progression	8
<i>I.N. Peregorodiev, S.V. Vinokurova, V.Yu. Bohyan, V.V. Delektorskaya, O.A. Malikhova, V.A. Gorbunova, B.I. Sakibov, D.S. Elkin, I.S. Stilidi</i> Role of microRNAs in neuroendocrine neoplasms of the stomach	19
<i>E.O. Ignatova, D.A. Seryak, M.Yu. Fedyanin, A.A. Tryakin, I.A. Pokataev, S.F. Menshikova, Yu.V. Vakhobova, M.S. Karbyshev, K.V. Smirnova, S.A. Tulyandin</i> Molecular portrait of stomach cancer associated with the Epstein–Barr virus	27

EXPERIMENTAL REPORTS

<i>M.A. Zaytseva, A.P. Shekhtman, L.I. Papusha, E.F. Valiakhmetova, L.A. Yasko, A.E. Druy</i> Analysis of genetic aberrations in pediatric high-grade gliomas	37
<i>N.N. Mazurenko, I.V. Tsyganova, V.V. Strelnikov, A.V. Balbutsky, T.F. Malivanova, E.B. Kuznetsova, V.A. Draudin-Krilenko, O.V. Shangina, A.F. Mukeria, V.B. Matveev, D.G. Zaridze</i> Spectrum of <i>VHL</i> mutations in clear cell renal cell carcinoma	48

SHORT REPORT

<i>D.V. Sorokin, O.E. Andreeva, E.I. Mikhaevich, Yu. Yu. Shchegolev, A.M. Scherbakov, M.V. Gudkova, M.A. Krasil'nikov</i> Effect of the exosome-mediated suppression of the estrogen signaling: the role in the progression of the hormonal resistance of breast cancer cells	58
---	----

Роль внеклеточных везикул в диагностике прогрессирования глиобластомы

А.И. Рябова¹, В.А. Новиков^{1,2}, Н.В. Юнусова¹, А.А. Пономарева¹,
Л.В. Спирина^{1,2}, О.В. Грибова¹

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

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

Контакты: Анастасия Игоревна Рябова ranigor@mail.ru

В статье проведен обзор исследований, в которых освещена роль внеклеточных везикул в неинвазивной диагностике рецидива глиобластомы. Глиобластома является самой частой злокачественной опухолью головного мозга у взрослых и характеризуется фатальным прогнозом. Своевременное лечение рецидива опухоли позволяет увеличить выживаемость пациентов, улучшить функциональный исход и снизить нагрузку на ухаживающих. Стандартный метод диагностики рецидива — нейровизуализационные исследования, которые на ранних этапах не позволяют дифференцировать рецидив опухоли от постлучевых изменений. Жидкостная биопсия и выявление маркеров в циркулирующих внеклеточных везикулах считаются перспективным направлением в современной онкологии и позволяют осуществить раннюю и дифференциальную диагностику опухоли, определить молекулярно-генетический статус опухоли в динамике и ответ на лечение, диагностировать рецидив опухоли в ранние сроки. В этом плане для диагностики глиобластом наиболее перспективным является изучение экспрессии глияльного фибриллярного кислого белка (GFAP), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), его мутантного варианта EGFRvIII, подопланина (PDPN) и изоцитратдегидрогеназы 1 (IDH1) на внеклеточных везикулах; для первичной диагностики глиобластомы и раннего рецидива — микроРНК-210, -301a, -222, -124-3p, -21; для контроля эффективности иммунотерапии больных с рецидивными формами глиобластом после стандартной терапии — оценка CD9+/GFAP+/survivin+ экзосом плазмы крови.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, жидкостная биопсия, рецидив глиобластомы, неинвазивная диагностика, обзор

Для цитирования: Рябова А.И., Новиков В.А., Юнусова Н.В. и др. Роль внеклеточных везикул в диагностике прогрессирования глиобластомы. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(3):8–18.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-3-8-18



The role of extracellular vesicles in the diagnosis of glioblastoma progression

A.I. Ryabova¹, V.A. Novikov^{1,2}, N.V. Yunusova¹, A.A. Ponomareva¹, L.V. Spirina^{1,2}, O.V. Gribova¹

¹Oncology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences;
5 Kooperativnyy Pereulok, Tomsk 634009, Russia;

²Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia;
2 Moskovskiy Trakt, Tomsk 634050, Russia

The article reviews studies highlighting the role of extracellular molecules in non-invasive diagnosis of glioblastoma recurrence. Glioblastoma is the most common malignant tumor of the brain characterized by fatal outcome prognosis. Current treatment of tumor recurrence allows to increase patient survival, improve functional outcome and decrease caregivers' load. The standard method of recurrence diagnosis is neuroimaging which at early stages cannot distinguish between tumor recurrence and post-radiation changes. Currently in oncology, liquid biopsy and marker detection in circulating extracellular vesicles are considered promising approaches allowing to obtain early and differential tumor diagnosis, determine dynamic molecular and genetic status of the tumor, diagnose tumor recurrence at early stages. In this context, the most promising approach to glioblastoma diagnosis is associated with studying of expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), epidermal growth factor receptor (EGFR), its mutant variant EGFRvIII, podoplanin (PDPN) and isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) in extracellular vesicles; for primary glioblastoma diagnosis and early recurrence: studying of microRNA-210, -301a, -222, -123-3p, -21; for control of immunotherapy effectiveness in patients with recurrent forms of glioblastoma after standard treatment: evaluation of CD9+/GFAP+/survivin+ exosomes in plasma.

Key words: extracellular vesicles, liquid biopsy, glioblastoma recurrence, non-invasive diagnostics, review

For citation: Ryabova A.I., Novikov V.A., Yunusova N.V. et al. The role of extracellular vesicles in the diagnosis of glioblastoma progression. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2020;7(3):8–18. (In Russ.).

Введение

Глиобластома является наиболее часто диагностируемой и агрессивной глиальной опухолью головного мозга. Она характеризуется неуклонно рецидивирующим течением и фатальным прогнозом. По результатам самого большого популяционного регистра опухолей центральной нервной системы CBTRUS общая 1-летняя выживаемость пациентов с глиобластомой составляет около 40 %, 5-летняя — 5–7 % [1]. Даже при соблюдении современного стандарта комбинированного лечения у пациентов в крупных рандомизированных исследованиях III фазы медиана безрецидивной выживаемости не превышает 11 мес, медиана общей выживаемости — 2 лет [2–4]. Своевременное адекватное лечение рецидива глиобластомы позволяет увеличить выживаемость пациента, улучшить качество его жизни и снизить нагрузку на ухаживающих [5, 6].

В настоящее время для оценки опухоли при динамическом наблюдении за пациентами с глиобластомой используют магнитно-резонансную томографию (МРТ) головного мозга с контрастированием, которая не является 100 % чувствительной и специфичной. Накопление контрастного вещества при МРТ в зоне облучения головного мозга после проведения лучевой терапии может свидетельствовать не только о возникновении рецидива, но и о феномене псевдопрогрессии или о лучевом некрозе. Псевдопрогрессия обычно возникает в течение первых 12 нед после проведения адъювантной химиолучевой терапии у 10–30 % пациентов с глиобластомой [7, 8]. Обратный феномен — псевдоответ — проявляется уменьшением очагов накопления контраста на фоне стабилизации гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) под действием антиангиогенной терапии и не свидетельствует об истинном ответе опухоли на лечение [8, 9]. Применение перфузионных и радиоизотопных исследований позволяет дифференцировать активно растущую опухоль и постлучевые изменения [10, 11], однако эти исследования доступны не во всех клиниках и не всегда позволяют диагностировать рецидив опухоли на ранних этапах [12, 13]. Верификация рецидива глиобластомы с использованием биопсии не проводится вследствие высокоинвазивного характера процедуры и наличия осложнений, которые могут ухудшить состояние пациента. В случаях невозможности дифференцировать псевдопрогрессию и прогрессирование глиобластомы решение о лечении обычно откладывается до тех пор, пока визуализирующие исследования не прояснят поведение опухоли [14]. Задержка лечения зачастую приводит к росту опухоли, нарастанию неврологического дефицита и ухудшению прогноза пациентов.

Злокачественные опухоли секретируют в кровоток и другие физиологические жидкости, определенные опухолевые маркеры (растворимые белки, циркулирующие нуклеиновые кислоты) как самостоятельно, так и в составе циркулирующих опухолевых клеток

и внеклеточных везикул (ВВ). Было показано, что при глиальных опухолях эти биомаркеры могут пересекать как поврежденный, так и интактный ГЭБ [15] и возможно их определение в крови и ликворе больных глиобластомой. В настоящее время активно исследуется потенциал так называемой жидкостной биопсии в диагностике и лечении глиальных опухолей, в том числе глиобластомы [16, 17].

Внеклеточные везикулы представляют собой небольшие структуры (50–1000 нм), заключенные в липидный бислой, секретируемые как нормальными, так и опухолевыми клетками. ВВ включают экзосомы (30–100 нм), микровезикулы (до 1000 нм) и апоптотические тела (1000–5000 нм), различающиеся по размеру, содержанию и биогенезу. Микровезикулы формируются путем наружного почкования плазматической мембраны, тогда как экзосомы формируются из эндосом с образованием мультивезикулярных тел, которые затем сливаются с плазматической мембраной. В то время как нормальные клетки секретируют микровезикулы и экзосомы, апоптотические тела образуются только во время запрограммированной клеточной гибели, которая, как и во многих опухолях, играет важную роль в патофизиологии глиобластомы [18]. Высвобождаемые клетками глиобластомы ВВ содержат широкий спектр молекул, включая нуклеиновые кислоты и белки, отражающие специфические молекулярные признаки клеток первичной опухоли, и изменяются в процессе лечения [19–21], при этом липидная мембрана защищает внутреннее содержимое ВВ от ферментной деградации [18, 22]. Было показано, что ВВ из клеток опухоли пересекают интактный ГЭБ и обнаруживаются в крови пациентов с глиобластомой [15]. Они могут быть выделены из плазмы крови и ликвора путем ультрацентрифугирования, ультрацентрифугирования в сочетании с ультрафильтрацией или путем иммунопреципитации и дифференцированы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (рис. 1), нанотрекингового анализа, а также ряда мембраносвязанных белков, которые могут быть идентифицированы с использованием проточной цитометрии или вестерн-блоттинга [19, 23].

Было показано, что ВВ, продуцируемые глиобластомой, играют важную роль в клеточной коммуникации и модуляции микроокружения опухоли. Они обеспечивают гетерогенность опухоли, модулируют пролиферацию, перепрограммируют метаболическую активность, индуцируют ангиогенез и инвазию, способствуют подавлению иммунного ответа и приобретению лекарственной устойчивости [24, 25]. Поскольку производные глиобластомы ВВ содержат специфические «молекулярные сигнатуры» своих родительских клеток и способны переноситься через ГЭБ в биологические жидкости, такие как кровь и спинномозговая жидкость, они рассматриваются как ценный источник потенциальных диагностических биомаркеров.

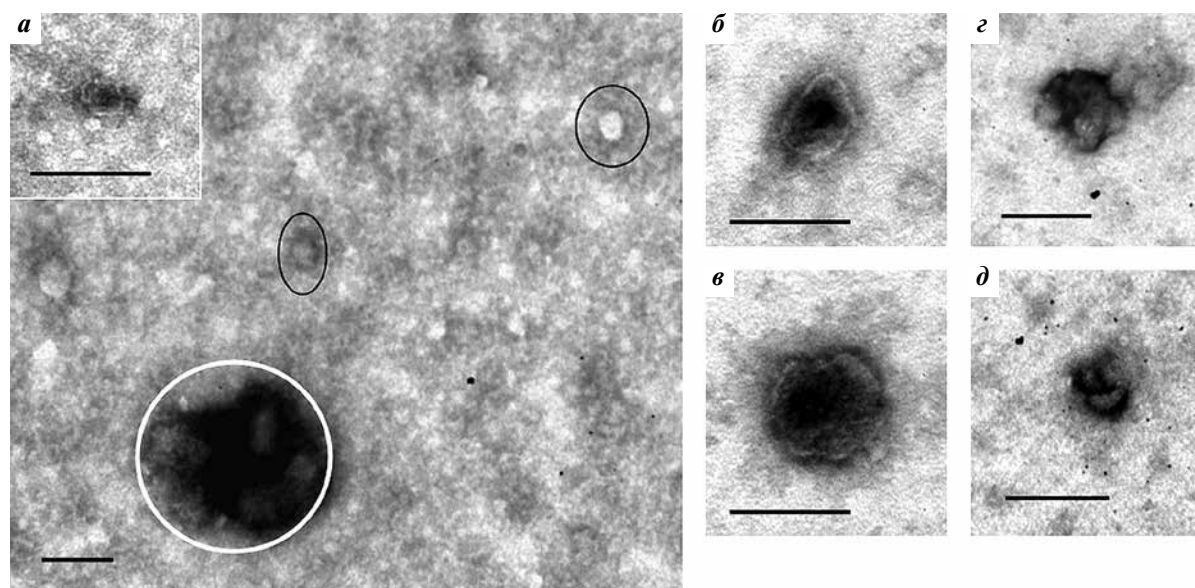


Рис. 1. Электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой (длина масштабной линии соответствует 100 нм): а — общий вид образца экзосом, выделенного из плазмы больного мультиформной глиобластомой. Черными овалами показаны микрочастицы, белым — частицы детрита. На верхней врезке — везикула; б, в — экзосомы (40–100 нм); г, д — частицы детрита

Fig. 1. Electron microscopy, negative contrast with phosphotungstic acid (scale line corresponds to 100 nm): а — general appearance of an exosome sample extracted from plasma of a patient with glioblastoma multiforme. Black ovals show microparticles, white ovals show detritus particles. The upper panel shows a vesicle; б, в — exosomes (40–100 nm); г, д — detritus particles

Наиболее изученным компонентом ВВ являются кодирующие и некодирующие РНК. В ряде исследований было показано, что отдельные мутантные варианты матричной РНК (мРНК) могут быть обнаружены во ВВ больных глиобластомой с чувствительностью до 82 % и специфичностью до 100 % и коррелируют с генетическими изменениями в опухоли [19, 20, 26–28]. Однако не все глиобластомы содержат исследованные мутации и уровень этих мРНК не оценивался в динамике, что не позволяет использовать эти маркеры для диагностики прогрессирования опухолевого процесса.

Некодирующие РНК принимают участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов и играют важную роль практически во всех аспектах опухолевого генеза, включая инициацию опухоли, прогрессирование и устойчивость к терапии. В геномных исследованиях показано, что при различных видах рака некодирующие РНК обычно дисрегулируются, действуя как онкогены или супрессоры опухоли [29]. Из некодирующих микроРНК наиболее изучены микроРНК, содержащие 21–24 нуклеотида, длинные некодирующие РНК (днкРНК), состоящие из 200 нуклеотидов или более, а также циркулярные РНК (циркРНК), представляющие собой класс одноцепочечных молекул РНК с ковалентно замкнутой петлевой структурой, которые характеризуются высокой стабильностью [30, 31].

На сегодняшний день опубликован ряд исследований, результаты которых подтверждают диагностическую [32–36], прогностическую [35–39] и предиктивную [40, 41] роль циркРНК у пациентов с глиомами

головного мозга. Несмотря на существующую возможность определения циркРНК в свободной форме или в составе ВВ в биологических жидкостях, в проведенных исследованиях экспрессия циркРНК определялась главным образом в опухолевой ткани, и потенциал циркРНК в неинвазивной диагностике рецидива глиобластомы в настоящее время не ясен. Роль днкРНК в качестве биомаркера изучена несколько шире. В исследованиях выявлена связь отдельных днкРНК со скоростью пролиферации клеток, прогнозом и ответом на лечение не только в опухолевой ткани, но и в крови пациентов в свободном состоянии и в составе экзосом [42–46]. Однако в доступной литературе отсутствуют сведения об исследовании уровней экспрессии днкРНК в крови или цереброспинальной жидкости больных глиобластомой в динамике в процессе лечения и при дальнейшем наблюдении.

Значительно шире определена роль различных микроРНК в качестве прогностических и предиктивных биомаркеров глиом, определяются панели микроРНК, в том числе выделенных из экзосом, для ранней и дифференциальной диагностики опухолей головного мозга различного генеза [47–49]. Впервые динамика уровня экзосомальной микроРНК-21 в цереброспинальной жидкости до и после хирургического лечения оценена J. C. Akers и соавт. [50]. У 1 пациента были исследованы пробы ликвора, взятые во время удаления глиобластомы и через 3 мес после тотальной резекции. Относительное содержание микроРНК-21 во ВВ, выделенных из ликвора, после удаления опухоли уменьшилось примерно в 50 раз. В исследовании R. Shi и соавт. были изучены образцы сыворотки

и ликвора у 2 пациентов с глиобластомой до и после удаления рецидивной опухоли. Результаты показали, что уровень экзосомальной микроРНК-21 в цереброспинальной жидкости резко уменьшился после хирургического вмешательства ($p < 0,01$), в то время как значимой разницы в уровнях микроРНК-21 в экзосомах сыворотки крови до и после операции не обнаружено [51].

Позднее рядом авторов было показано, что уровень экзосомальных микроРНК в сыворотке крови статистически значимо снижается после удаления глиобластомы. А. Santangelo и соавт. оценили экспрессию экзосомальных микроРНК-21, -222 и -124-3р в сыворотке крови у 25 пациентов с глиомами высокой степени злокачественности до и после хирургического лечения. При оценке уровня экспрессии исследуемых микроРНК в образцах, полученных после операции, было обнаружено резкое снижение уровня как отдельных микроРНК (микроРНК-21 ($p < 0,001$), микроРНК-222 ($p < 0,01$) и микроРНК-124-3р ($p < 0,001$)), так и кумулятивного уровня экспрессии исследуемых микроРНК ($p < 0,001$). В динамике был прослежен только 1 пациент с глиобластомой, у которого через 3 мес хирургического лечения во время терапии по протоколу Stupp при контрольной МРТ головного мозга было заподозрено прогрессирование заболевания. Уровень экспрессии микроРНК-21, -222 и 124-3р в циркулирующих экзосомах был увеличен, и через 2 мес данные контрольной МРТ подтвердили продолженный рост опухоли [49].

F. Lan и соавт. исследовали экзосомальную микроРНК-301a в сыворотке крови 7 пациентов с глиобластомой до операции, через 2 нед после хирургического вмешательства и при диагностике рецидива. Было обнаружено, что уровень экзосомальной микроРНК-301a в сыворотке крови у больных глиомой был значительно повышен по сравнению со здоровым контролем и неглиальными опухолями головного мозга ($p < 0,01$). Экспрессия экзосомальной микроРНК-301a в сыворотке крови значительно снижалась после хирургического лечения ($p < 0,01$) и вновь повышалась при рецидиве глиобластомы ($p < 0,01$) [52]. В другом исследовании этой группы авторов был изучен уровень экспрессии экзосомальной микроРНК-210 у 10 пациентов с глиобластомой в динамике. Образцы крови отбирали до хирургического лечения первичной опухоли, после операции и после диагностики рецидива. Уровень микроРНК-210 в сыворотке крови был заметно снижен после оперативного вмешательства ($p < 0,01$), а в момент рецидива глиобластомы обнаруживалось значительное его увеличение ($p < 0,01$) [53]. Сводные данные о диагностической, прогностической и предикторной ценности определения микроРНК во ВВ, выделенных из биологических жидкостей пациентов с глиобластомой, представлены в таблице.

Помимо нуклеиновых кислот ВВ содержат белки, обладающие потенциалом биомаркеров глиоблас-

томы. Н. Shao и соавт. проанализировали панель из 4 белков, характерных для глиобластомы (рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), его мутантный вариант EGFRvIII, подоплатин (PDPN) и изоцитратдегидрогеназа 1 (IDH1)), в полученных из сыворотки ВВ [54]. Было показано, что ВВ демонстрируют отчетливую молекулярную сигнатуру опухоли, и повышенная экспрессия EGFR, EGFRvIII, PDPN и IDH1 R132H позволила диагностировать глиобластому с точностью от 36 до 76 % при использовании отдельных маркеров, а при объединении результатов точность возросла до 91 %. У 12 пациентов с глиобластомой образцы крови были взяты до и после стандартной химиолучевой терапии. На основании относительного изменения количества ВВ и уровней экспрессии биомаркеров ВВ определяли индекс лекарственного ответа, который позволил достоверно ($p < 0,005$) дифференцировать пациентов с прогрессированием и ответивших на терапию. Позднее Н. Wang и соавт. [22] сравнили уровень экспрессии EGFR во ВВ сыворотки 23 пациентов с глиомами различной степени злокачественности (5 пациентов с глиобластомой). Парные сравнения экспрессии EGFR в образцах, взятых до хирургического лечения и через 1 нед после операции у 8 пациентов, показали достоверное снижение экспрессии EGFR после удаления опухоли в каждом случае ($p < 0,05$).

Исследование содержимого ВВ требует применения трудоемких и финансово затратных методов, что делает затруднительным их использование в клинической практике. Наиболее трудоемким и время-затратным является выделение ВВ из биологических жидкостей с применением различных вариантов ультрацентрифугирования. Поэтому в настоящее время разработан, находится в процессе коммерциализации или уже коммерциализирован ряд технологий: выделение экзосом из мочи путем агглютинации с помощью лектинов, выделение экзосом из плазмы крови с помощью магнитных частиц и аптамеров для последующего анализа поверхностных белков экзосом методом проточной цитометрии, многочисленные тест-системы выделения экзосомальных микроРНК [55].

В ряде исследований показано, что при глиобластоме в крови пациентов содержится значительно больше ВВ, чем у здоровых лиц [56–58]. Для определения возможности использовать уровень микровезикул в сыворотке для дифференцировки псевдопрогрессии и прогрессирования С. J. Koch и соавт. исследовали образцы крови 11 пациентов с глиобластомой в динамике начиная с послеоперационного периода в течение 2 лет. Количество микровезикул оценивали с помощью проточной цитометрии и электронной микроскопии. Были обнаружены статистически значимые различия в количестве микровезикул при прогрессировании заболевания по сравнению с пациентами, у которых был зарегистрирован ответ на лечение ($p = 0,014$) [56].

Диагностическая, прогностическая и предикторная ценность определения микроРНК во ВВ, выделенных из биологических жидкостей пациентов с ГБ

Diagnostic, prognostic and predictive value of microRNA measurements in EVs from patients with GB

Автор, год Author, year	Источник ВВ EVs source	Пациенты Patients	Результат Result	Исследуемые РНК Studied RNAs	p
J.C. Akers и соавт., 2013 [50] J.C. Akers et al., 2013 [50]	ВВ сыворотки Serum EVs	24 пациента с ГБ, 5 неонкологических пациентов 24 patients with GB, 5 non-oncological patients	Уровень экспрессии не различался No difference in expression levels	МикроРНК-21 MicroRNA-21	0,4
	ВВ ликвора Cerebrospinal fluid EVs	13 пациентов с ГБ, 13 неонкологических пациентов 13 patients with GB, 13 non-oncological patients	Уровень экспрессии в среднем в 10 раз выше у пациентов с ГБ Expression level on average is 10 times higher in patients with GB	МикроРНК-21 MicroRNA-21	<0,001
L. Manterola и соавт., 2014 [47] L. Manterola et al., 2014 [47]	Экзосомы сыворотки крови Serum exosomes	75 пациентов с вдГБ, 55 здоровых лиц 75 patients with ndGB, 55 healthy subjects	Уровень экспрессии выше у пациентов с ГБ Expression level is higher in patients with GB	RNU6-1 МикроРНК-320 МикроРНК-574-3р RNU6-1 MicroRNA-320 MicroRNA-574-3p	<0,0001 <0,007 <0,003
R. Shi и соавт., 2015 [51] R. Shi et al., 2015 [51]	Экзосомы ликвора Cerebrospinal fluid exosomes	45 пациентов с ГБ, 25 неонкологических пациентов 45 patients with GB, 25 non-oncological patients	Уровень экспрессии выше у пациентов с ГБ Expression level is higher in patients with GB	МикроРНК-21 MicroRNA-21	<0,01
	Экзосомы сыворотки крови Serum exosomes	45 пациентов с ГБ, 25 неонкологических пациентов 45 patients with GB, 25 non-oncological patients	Существенной разницы не выявлено No significant difference found	МикроРНК-21 MicroRNA-21	Не указана Not specified
S. Ebrahim- khani et al., 2018 [48] S. Ebrahim- khani et al., 2018 [48]	Экзосомы сыворотки крови Serum exosomes	12 пациентов с ГБ-IDHwt, 12 здоровых лиц 12 patients with IDHwt GB, 12 healthy subjects	Диагностическая ценность панели микроРНК Diagnostic value of microRNA panel	МикроРНК-182-5р МикроРНК-328-3р МикроРНК-339-5р МикроРНК-340-5р МикроРНК-485-3р МикроРНК-486-5р МикроРНК-543 MicroRNA-182-5p MicroRNA-328-3p MicroRNA-339-5p MicroRNA-340-5p MicroRNA-485-3p MicroRNA-486-5p MicroRNA-543	Точность диагностики 91,7 % Diagnostic accuracy 91.7 %
A. Santangelo и соавт., 2018 [49] A. Santangelo et al., 2018 [49]	Экзосомы сыворотки крови Serum exosomes	44 пациента с ГБ, 30 здоровых лиц 44 patients with GB, 30 healthy subjects	Уровень экспрессии выше у пациентов с ГБ Expression level is higher in patients with GB	МикроРНК-21, МикроРНК-222 МикроРНК-124-3р MicroRNA-21, MicroRNA-222, MicroRNA-124-3p	<0,0001 <0,0001 <0,001
		25 пациентов с ГБ 25 patients with GB	Снижение экспрессии после удаления опухоли Decrease in expression after tumor resection	МикроРНК-21, МикроРНК-222 МикроРНК-124-3р MicroRNA-21, MicroRNA-222, MicroRNA-124-3p	<0,001 <0,01 <0,001

Окончание таблицы

End of table

Автор, год Author, year	Источник ВВ EVs source	Пациенты Patients	Результат Result	Исследуемые РНК Studied RNAs	<i>p</i>
F. Lan и соавт., 2018 [52] F. Lan et al., 2018 [52]	Экзосомы сыворотки крови Serum exosomes	60 пациентов с глиомой grade I–IV (27 ГБ), 43 здоровых лица 60 patients with grade I–IV gliomas (27 GB), 43 healthy subjects	Уровень экспрессии выше у пациентов с глиомой Expression level is higher in patients with glioma	МикроРНК-301a MicroRNA-301a	<0,01
		15 пациентов с вдГБ, 7 пациентов с рецидивной ГБ 15 patients with ndGB, 7 patients with recurrent GB	Снижение экспрес- сии после удаления опухоли; повыше- ние при рецидиве Decrease in expression after tumor resection, increase after recurrence	МикроРНК-301a MicroRNA-301a	<0,01 <0,01
F. Lan и соавт., 2020 [53] F. Lan et al., 2020 [53]	Экзосомы сыворотки крови Serum exosomes	91 пациент с глиомой grade I–IV (37 ГБ), 50 здоровых лиц 91 patients with grade I–IV gliomas (37 GB), 50 healthy subjects	Уровень экспрессии выше у пациентов с глиомой Expression level is higher in patients with glioma	МикроРНК-210 MicroRNA-210	<0,01
		20 пациентов с вдГБ, 10 пациентов с рецидивной ГБ 20 patients with ndGB, 10 patients with recurrent GB	Снижение экспрес- сии после удаления опухоли; повыше- ние при рецидиве Decrease in expression after tumor resection, increase after recurrence	МикроРНК-210 MicroRNA-210	<0,01 <0,01

Примечание. ВВ — внеклеточные везикулы; ГБ — глиобластома; вдГБ — впервые диагностированная глиобластома; ГБ-IDHwt — глиобластома без мутации гена изоцитратдегидрогеназы.

Note. EVs — extracellular vesicles; GB — glioblastoma; ndGB — newly diagnosed glioblastoma; IDHwt GB — glioblastoma with wild-type isocitrate dehydrogenase gene.

Позднее G. André-Grégoire и соавт. сравнили размеры и количество ВВ, выделенных из плазмы крови 6 пациентов с впервые диагностированной глиобластомой и 6 здоровых доноров. ВВ у пациентов с глиобластомой и здоровых доноров имели сопоставимый средний диаметр 80 (50–100) нм. В то же время концентрация экзосом в плазме крови пациентов с глиобластомой была выше по сравнению с таковой в группе контроля ($p < 0,05$) [57].

В исследование D. Osti и соавт. были включены пациенты с глиобластомой ($n = 43$), здоровые лица ($n = 33$) и пациенты с другими злокачественными новообразованиями центральной нервной системы ($n = 25$). Образцы крови отбирали до хирургического вмешательства и через 3 дня после операции. Собранные образцы плазмы затем очищали методом дифференциального центрифугирования с ультрафильтрацией через 0,22 мкм фильтр. Средний размер ВВ у пациентов с глиобластомой и в группе валидации составил около 150 нм ($p = 0,075$). Достоверно более высокое количество циркулирующих ВВ было обнаружено в исходном состоянии у пациентов с глиобластомой по сравнению со здоровыми лицами и пациентами с метастатическими и внеозговыми

опухолями. При сравнении концентрации ВВ в плазме крови у 9 пациентов с рецидивом глиобластомы с парными образцами до и после операции было показано, что содержание ВВ увеличено в дооперационных образцах плазмы, достоверно снижается после резекции первичной опухоли и вновь повышается при рецидиве заболевания ($p = 0,028$) [58].

Остается открытым вопрос о влиянии терапевтических воздействий при глиобластоме на размеры, количество и состав ВВ, а также на возможную погрешность, связанную с ответом на лечение, при диагностике прогрессирования на основании оценки ВВ в сыворотке и ликворе пациентов. В ряде исследований было показано влияние основных режимов химиотерапии и ультразвуковой гипертермии на высвобождение ВВ при глиобластоме. В исследовании H. Shao и соавт. было оценено влияние алкилирующего препарата темозоломида (TMZ), используемого в 1-й линии адъювантной терапии глиобластомы на клетки GBM мыши. Воздействие TMZ не вызывало значительных изменений в клеточной экспрессии CD63, EGFR или EGFRvIII, однако приводило к дозозависимому снижению количества как клеток, так и ВВ. Затем образцы крови 12 пациентов с глиобластомой

были собраны до и после стандартной химиолучевой терапии с TMZ. Как уже было описано выше, индекс лекарственного ответа, определяемый с использованием относительного изменения количества ВВ и уровней экспрессии белков ВВ, позволил достоверно дифференцировать пациентов с прогрессирующим и ответивших на терапию [54].

В другом исследовании эта группа авторов оценила влияние TMZ на уровни экзосомальной мРНК Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT) и алкилпурин-ДНК-N-гликозилазы (APNG) — ключевых ферментов, восстанавливающих TMZ-индуцированные повреждения ДНК. В клеточных линиях было показано, что уровни MGMT и APNG были повышены в лекарственно-устойчивых клеточных линиях, тогда как в чувствительных линиях они были незначительны. При этом экзосомальные уровни мРНК MGMT коррелировали со статусом метилирования промотора MGMT в опухоли как в клеточных линиях, так и у пациентов с глиобластомой. Оценка кинетики изменений мРНК MGMT и APNG после инкубации с TMZ показала, что в TMZ-резистентных клеточных линиях наблюдалось довольно быстрое временное увеличение уровня экзосомальной мРНК MGMT и APNG, а в чувствительных клеточных линиях уровень этих мРНК снижался. Анализ экзосомальной мРНК MGMT и APNG у 7 пациентов с глиобластомой показал, что уровень этих мРНК коррелировал с уровнем мРНК в первичной опухоли, уменьшался при ответе на терапию TMZ и увеличивался при прогрессировании процесса [27].

Влияние TMZ на стволовые клетки глиомы, отвечающие за резистентность к лечению, в том числе к алкилирующим химиопрепаратам, было оценено G. André-Grégoire и соавт. В исследовании показано, что воздействие TMZ (50–100 мкм, 48 ч) не оказывало токсичного эффекта на стволовые клетки глиомы, культивируемые в виде сфероидов, и приводило к увеличению количества ВВ, не влияя на их средний размер, а также обогащало ВВ маркерами клеточной адгезии [57]. Таким образом, будучи относительно неэффективным в элиминации стволовых клеток глиомы *in vitro*, TMZ может увеличить высвобождение и распространение факторов опухолевой прогрессии.

T. Simon и соавт. описали изменения в ВВ, продуцируемых клетками глиобластомы после инкубации с бевацизумабом (BVZ) — антиангиогенным препаратом, включенным во 2-ю линию терапии глиобластомы. BVZ оказывает положительное влияние на качество жизни и выживаемость пациентов с глиобластомой главным образом благодаря уменьшению проницаемости сосудов опухоли и перитуморального отека. Было отмечено, что BVZ захватывается клетками глиобластомы, обнаруживается на поверхности ВВ и индуцирует изменения в протеомном грузе ВВ, связанные с прогрессией опухоли и терапевтической резистентностью. Таким образом, обнаружен потенциальный

новый механизм выхода глиобластомы из-под действия BVZ [59].

В исследовании N.D. Sheybani и соавт. было оценено влияние ультразвуковой гипертермии на количество и протеомный профиль ВВ в монослойной культуре глиомы мышей. Показано, что после воздействия фокусированного ультразвука в течение 15 мин значительно увеличивается высвобождение ВВ (~46 %) без качественного изменения их морфологии. При этом отмечены обогащение общих маркеров, ассоциированных с ВВ (фибронектин и белки цитоскелета), и снижение уровня маркеров, ассоциированных с прогрессирующим и резистентностью к лечению (главный белок Vault, калуменин, аннексин А6 и белок теплового шока 5) [60].

В ряде исследований в клеточных культурах было показано увеличение высвобождения ВВ в ответ на терапевтическое воздействие [27, 57, 60], однако оценка влияния терапии на размер, количество и состав ВВ выполнялась непосредственно после завершения воздействия и остается не ясным, как долго сохраняются повышение выделения ВВ и изменения из состава. Напротив, в клинических исследованиях отмечено уменьшение уровня ВВ при ответе на терапию, однако число пациентов, включенных в эти исследования, незначительно и не позволяет сделать окончательные выводы [27, 54]. Таким образом, необходимо дальнейшее изучение влияния различных методов лечения на уровень и состав ВВ при глиобластоме в динамике у пациентов с различной чувствительностью к терапии.

Несмотря на потенциал ВВ в определении прогрессирования глиобластомы, существует ряд препятствий для клинического применения. Методы изоляции ВВ включают различные виды ультрацентрифугирования, ультрацентрифугирования в сочетании с ультрафильтрацией, изоляцию на основе полимеров, каждый из которых захватывает тонко различающиеся субпопуляции ВВ. Процедуры выделения ВВ часто занимают много времени, требуют большого количества исходного материала. Существует проблема выделения тотального пула и пула опухолевых ВВ, поскольку концентрация специфического маркера глиом GFAP (глиального фибриллярного кислого белка) на ВВ будет в несколько сотен раз ниже, чем на клетках исходной опухоли, вследствие особенностей биогенеза экзосом [18, 61]. В этом плане наиболее перспективным, на наш взгляд, является исследование цереброспинальной жидкости как биологической жидкости, обогащенной ВВ опухолевого происхождения. Использование ВВ из плазмы крови для диагностики и оценки эффективности терапии глиобластом не менее привлекательно, так как, по сути, представляет неинвазивную методику, однако диагностическая, предикторная и прогностическая значимость маркеров ВВ остается предметом дальнейших научных исследований (рис. 2) [62].

В литературе представлены возможности использования ВВ для терапии глиобластом в эксперименте.

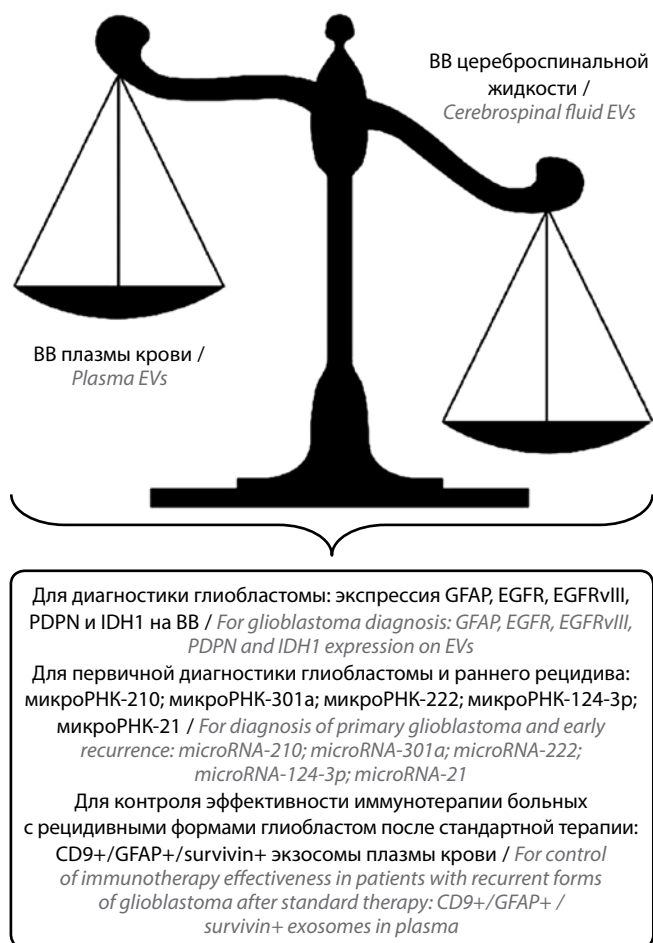


Рис. 2. Возможности использования внеклеточных везикул (ВВ) для диагностики и оценки эффективности терапии глиобластомы. GFAP — глиальный фибриллярный кислый белок; EGFR — рецептор эпидермального фактора роста; EGFRvIII — мутантный вариант рецептора эпидермального фактора роста; PDPN — подопланин; IDH1 — изоцитратдегидрогеназа 1

Fig. 2. Possibilities of using extracellular vesicles (EVs) for diagnosis and evaluation of glioblastoma therapy effectiveness. GFAP — glial fibrillary acidic protein; EGFR — epidermal growth factor receptor; EGFRvIII — mutant variant of epidermal growth factor receptor; PDPN — podoplanin; IDH1 — isocitrate dehydrogenase 1

Показана высокая эффективность экзосом от НК-клеток в лечении глиобластом [63]. Полученные из мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (MSC) экзосомы являются наиболее привлекательным носителем для доставки белков, микроРНК, лекарств, металлов до опухолевых клеток реципиентов вследствие эффективной биосовместимости, сниженной иммуногенности (сниженная экспрессия МН1 I и II), малого размера и способности преодолевать ГЭБ, значительной нацеленности на опухоль. Кроме этого, в настоящее время хорошо отработаны методики культивирования MSC человека из различных источников

(костный мозг, жировая ткань). Показан хороший противоопухолевый эффект экзосом MSC после их инкубации с таксомом. Нагруженные таксомом экзосомы выделяли и инкубировали с различными высокометастатическими клеточными линиями человека. Несмотря на то что контрольные экзосомы MSC почти не ингибировали опухолевый рост, воздействие экзосом, нагруженных таксомом, было связано с цитотоксичностью, достигающей 80–90 %, что указывает на специфическое и более эффективное нацеливание на опухоль. Системное внутривенное применение полученных из MSC экзосом, нагруженных таксомом, выявило уменьшение подкожных первичных опухолей более чем на 60 %, а также значительную редукцию метастазов MDA-hyb1 в легких, печени, селезенке и почках. Эффект от MSC-экзосом был аналогичен эффектам, наблюдаемым для таксола, хотя концентрация таксола в экзосомах была примерно в 1000 раз ниже [64]. Также перспективно использование связанных с оксидом железа экзосом от MSC различного происхождения (жировая ткань, костный мозг, дентальная пульпа, клетки пуповины человека) для абляции опухолевых клеток посредством магнитной гипертермии [65].

Заключение

Жидкостная биопсия, являясь перспективным направлением в современной онкологии, значима в диагностике и прогнозе исхода заболевания у пациентов с глиобластомами. Существует множество перспективных мишеней, способных не только выявить заболевание, но и предсказать эффект лечения (экспрессия GFAP, EGFR, EGFRvIII, PDPN и IDH1 на ВВ для диагностики глиобластом; для первичной диагностики глиобластомы и раннего рецидива: микроРНК-210; -301а; -222; -124-3р; -21; для контроля эффективности иммунотерапии больных с рецидивными формами глиобластом после стандартной терапии перспективна оценка CD9+/GFAP+/survivin+ экзосом плазмы крови). Однако существующие проблемы, связанные с чувствительностью методов детекции, не позволяют применять их в клинической практике. Циркулирующие опухолевые клетки, ВВ, внеклеточные нуклеиновые кислоты, а также опухолевые белки до сих пор остаются потенциальными маркерами диагностики и прогрессирования заболевания. Интерес исследователей не угасает к ним на протяжении последнего десятилетия. Продолжается накопление фундаментальных знаний об опухолевой прогрессии глиом, что, несомненно, будет способствовать развитию новых методов в диагностике и прогнозе течения заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ostrom Q.T., Cioffi G., Gittleman H. et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neurooncology* 2019;21(Suppl 5):v1–100. DOI: 10.1093/neuonc/noz150.
- Chinot O.L., Wick W., Mason W. et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014;370(8):709–22. DOI: 10.1056/NEJMoa1308345.
- Gilbert M.R., Dignam J.J., Armstrong T.S. et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014;370(8):699–708. DOI: 10.1056/NEJMoa1308573.
- Stupp R., Taillibert S., Kanner A. et al. Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma: a randomized clinical trial. *JAMA* 2017;318(23):2306–16. DOI: 10.1001/jama.2017.18718.
- Абсаямова А.В., Кобяков Г.Л., Агабекян Г.О. и др. Эффективность бевацизумаба при прогрессирующей глиобластоме. Собственные данные. *Медицинский алфавит* 2018;2(29):60–5. [Absalyamova O.V., Kobayakov G.L., Agabekyan G.O. et al. Bevacizumab efficacy in progressive glioblastoma. Own data. *Medicinskiy alfavit* = Medical Alphabet 2018;2(29):60–5. (In Russ.)].
- Weller M., Le Rhun E., Preusser M. et al. How we treat glioblastoma. *ESMO Open* 2019;4(Suppl 2):e000520. DOI: 10.1136/esmoopen-2019-000520.
- Трофимова Т.Н. Нейрорадиология: оценка эффективности хирургии и комбинированной терапии глиом. *Практическая онкология* 2016;17(1):32–40. [Trofimova T.N. *Neuroradiology: evaluation of effectiveness of surgery and the combined therapy of gliomas. Prakticheskaya onkologiya* = Practical Oncology 2016;17(1):32–40. (In Russ.)].
- Strauss S.B., Meng A., Ebani E.J., Chiang G.C. Imaging glioblastoma post-treatment: progression, pseudoprogression, pseudoresponse, radiation necrosis. *Radiol Clin North Am* 2019;57(6):1199–216. DOI: 10.1016/j.rcl.2019.07.003.
- Arevalo O.D., Soto C., Rabiei P. et al. Assessment of glioblastoma response in the era of bevacizumab: longstanding and emergent challenges in the imaging evaluation of pseudoresponse. *Front Neurol* 2019;10:460. DOI: 10.3389/fneur.2019.00460.
- Zikou A., Sioka C., Alexiou G.A. et al. Radiation necrosis, pseudoprogression, pseudoresponse, and tumor recurrence: imaging challenges for the evaluation of treated gliomas. *Contrast Media Mol Imaging* 2018;2018: 6828396. DOI: 10.1155/2018/6828396.
- Чернов В.И., Зельчан Р.В., Медведева А.А. и др. Способ радионуклидной диагностики опухолей головного мозга. Патент на изобретение RU2692451C2, 24.06.2019. Заявка № 2017134177 от 02.10.2017. [Chernov V.I., Zelchan R.V., Medvedeva A.A. Method for radionuclide diagnosing of cerebral tumors. Patent RU2692451C2, 24.06.2019. Application No. 2017134177 dated 02.10.2017. (In Russ.)].
- MacArthur K.M., Kao G.D., Chandrasekaran S. et al. Detection of brain tumor cells in the peripheral blood by a telomerase promoter-based assay. *Cancer Res* 2014;74(8):2152–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0813.
- Gao F., Cui Y., Jiang H. et al. Circulating tumor cell is a common property of brain glioma and promotes the monitoring system. *Oncotarget* 2016;7(44):71330–40. DOI: 10.18632/oncotarget.11114.
- Mohammadi H., Shiue K., Grass G.D. et al. Isocitrate dehydrogenase 1 mutant glioblastomas demonstrate a decreased rate of pseudoprogression: a multi-institutional experience. *Neurooncol Pract* 2020;1(7):185–95. DOI: 10.1093/nop/npz050.
- García-Romero N., Carrión-Navarro J., Esteban-Rubio S. et al. DNA sequences within glioma-derived extracellular vesicles can cross the intact blood-brain barrier and be detected in peripheral blood of patients. *Oncotarget* 2017;8(1):1416–28. DOI: 10.18632/oncotarget.13635.
- Silantsev A.S., Falzone L., Libra M. et al. Current and future trends on diagnosis and prognosis of glioblastoma: from molecular biology to proteomics. *Cells* 2019;8(8):863. DOI: 10.3390/cells8080863.
- Yekula A., Muralidharan K., Rosh Z.S. et al. Liquid biopsy strategies to distinguish progression from pseudoprogression and radiation necrosis in glioblastomas. *Adv Biosyst* 2020;e2000029. DOI: 10.1002/adbi.202000029.
- Hallal S., Ebrahimkhani S., Shivalingam B. et al. The emerging clinical potential of circulating extracellular vesicles for non-invasive glioma diagnosis and disease monitoring. *Brain Tumor Pathol* 2019;36(2):29–39. DOI: 10.1007/s10014-019-00335-0.
- Chen W.W., Balaj L., Liao L.M. et al. Beaming and droplet digital PCR analysis of mutant IDH1 mRNA in glioma patient serum and cerebrospinal fluid extracellular vesicles. *Mol Ther Nucleic Acids* 2013;2(7):e109. DOI: 10.1038/mtna.2013.28.
- Figueroa J.M., Skog J., Akers J. et al. Detection of wild-type EGFR amplification and EGFRvIII mutation in CSF-derived extracellular vesicles of glioblastoma patients. *Neuro Oncol* 2017;19(11):1494–502. DOI: 10.1093/neuonc/nox085.
- Lane R., Simon T., Vintu M. et al. Cell-derived extracellular vesicles can be used as a biomarker reservoir for glioblastoma tumor subtyping. *Commun Biol* 2019;2:315. DOI: 10.1038/s42003-019-0560-x.
- Wang H., Jiang D., Li W. et al. Evaluation of serum extracellular vesicles as noninvasive diagnostic markers of glioma. *Theranostics* 2019;9(18):5347–58. DOI: 10.7150/thno.33114.
- Xu R., Rai A., Chen M. et al. Extracellular vesicles in cancer – implications for future improvements in cancer care. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15(10):617–38. DOI: 10.1038/s41571-018-0036-9.
- Ciccocioppo F., Lanuti P., Marchisio M., Miscia S. Extracellular vesicles involvement in the modulation of the glioblastoma environment. *J Oncol* 2020;2020:3961735. DOI: 10.1155/2020/3961735.
- Yekula A., Yekula A., Muralidharan K. et al. Extracellular vesicles in glioblastoma tumor microenvironment. *Front Immunol* 2020;10:3137. DOI: 10.3389/fimmu.2019.03137.
- Skog J., Würdinger T., van Rijn S. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10(12):1470–6. DOI: 10.1038/ncb1800.
- Shao H., Chung J., Lee K. et al. Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma. *Nat Commun* 2015;6:6999. DOI: 10.1038/ncomms7999.
- Manda S.V., Kataria Y., Tatireddy B.R. et al. Exosomes as a biomarker platform for detecting epidermal growth factor receptor-positive high-grade gliomas. *J Neurosurg* 2018;128(4):1091–101. DOI: 10.3171/2016.11.JNS161187.
- Zhang Y., Cruickshanks N., Pahuski M. et al. Noncoding RNAs in glioblastoma. In: *Glioblastoma*. Ed.: S. Vleeschouwer. Brisbane, QLD, Australia: Codon Publications, 2017. Pp. 95–130.
- Liu J., Zhao K., Huang N., Zhang N. Circular RNAs and human glioma. *Cancer Biol Med* 2019;16(1):11–23. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0425.
- Sun J., Li B., Shu C. et al. Functions and clinical significance of circular RNAs in glioma. *Mol Cancer* 2020;19(1):34. DOI: 10.1186/s12943-019-1121-0.
- Barbagallo D., Caponnetto A., Cirmi-gliaro M. et al. CircSMARCA5 inhibitors

- migration of glioblastoma multiforme cells by regulating a molecular axis involving splicing factors SRSF1/SRSF3/PTB. *Int J Mol Sci* 2018;19(2): 480. DOI: 10.3390/ijms19020480.
33. Duan X.B., Liu D.L., Wang Y., Chen Z.Q. Circular RNA hsa_circ_0074362 promotes glioma cell proliferation, migration, and invasion by attenuating the inhibition of mir-1236-3p on HOXB7 expression. *DNA Cell Biol* 2018;37:917–24. DOI: 10.1089/dna.2018.4311.
 34. Wang R.J., Zhang S., Chen X.Y. et al. EIF4A3-induced circular RNA MMP9 (circMMP9) acts as a sponge of miR-124 and promotes glioblastoma multiforme cell tumorigenesis. *Mol Cancer* 2018;17:166. DOI: 10.1186/s12943-018-0911-0.
 35. Wang Y., Sui X., Zhao H. et al. Decreased circular RNA hsa_circ_0001649 predicts unfavorable prognosis in glioma and exerts oncogenic properties *in vitro* and *in vivo*. *Gene* 2018;676:117–22. DOI: 10.1016/j.gene.2018.07.037.
 36. Barbagallo D., Caponnetto A., Brex D. et al. CircSMARCA5 regulates VEGFA mRNA splicing and angiogenesis in glioblastoma multiforme through the binding of SRSF1. *Cancers (Basel)* 2019;11(2):194. DOI: 10.3390/cancers11020194.
 37. Jin P., Huang Y., Zhu P. et al. CircRNA circHIPK3 serves as a prognostic marker to promote glioma progression by regulating miR-654/IGF2BP3 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;503(3):1570–4. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.07.081.
 38. Zhang M., Huang N., Yang X. et al. A novel protein encoded by the circular form of the *SHPRH* gene suppresses glioma tumorigenesis. *Oncogene* 2018;37(13):1805–14. DOI: 10.1038/s41388-017-0019-9.
 39. Yang M., Li G., Fan L. et al. Circular RNA circ_0034642 elevates BATF3 expression and promotes cell proliferation and invasion through miR-1205 in glioma. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;508(3):980–5. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.12.052.
 40. Lei B., Huang Y., Zhou Z. et al. Circular RNA hsa_circ_0076248 promotes oncogenesis of glioma by sponging miR-181a to modulate SIRT1 expression. *J Cell Biochem* 2019;120(4):6698–708. DOI: 10.1002/jcb.27966.
 41. Ding C., Yi X., Wu X. et al. Exosome-mediated transfer of circRNA CircNFIX enhances temozolomide resistance in glioma. *Cancer Lett* 2020;479:1–12. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.03.002.
 42. Chen W., Xu X.K., Li J.L. et al. MALAT1 is a prognostic factor in glioblastoma multiforme and induces chemoresistance to temozolomide through suppressing miR-203 and promoting thymidylate synthase expression. *Oncotarget* 2017;8(14):22783–99. DOI: 10.18632/oncotarget.15199.
 43. Shen J., Hodges T.R., Song R. et al. Serum HOTAIR and GAS5 levels as predictors of survival in patients with glioblastoma. *Mol Carcinog* 2018;57(1): 137–41. DOI: 10.1002/mc.22739.
 44. Tan S.K., Pastor C., Penas C. et al. Serum long noncoding RNA HOTAIR as a novel diagnostic and prognostic biomarker in glioblastoma multiforme. *Mol Cancer* 2018;17(1):74. DOI: 10.1186/s12943-018-0822-0.
 45. Xie J., Wang X., Liu S. et al. LncRNA SAMMSON overexpression distinguished glioblastoma patients from patients with diffuse neurosarcoidosis. *Neuroreport* 2019;30(12):817–21. DOI: 10.1097/WNR.0000000000001278.
 46. Zhang Z., Yin J., Lu C. et al. Exosomal transfer of long non-coding RNA SBF2-AS1 enhances chemoresistance to temozolomide in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2019;38(1):166. DOI: 10.1186/s13046-019-1139-6.
 47. Manterola L., Guruceaga E., Gállego Pérez-Larraya J. et al. A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. *Neuro Oncol* 2014;16(4):520–7. DOI: 10.1093/neuonc/not218.
 48. Ebrahimkhani S., Vafae F., Hallal S. et al. Deep sequencing of circulating exosomal microRNA allows non-invasive glioblastoma diagnosis. *NPJ Precis Oncol* 2018;2:28. DOI: 10.1038/s41698-018-0071-0.
 49. Santangelo A., Imbruce P., Gardenghi B. et al. A microRNA signature from serum exosomes of patients with glioma as complementary diagnostic biomarker. *J Neurooncol* 2018;136(1):51–62. DOI: 10.1007/s11060-017-2639-x.
 50. Akers J.C., Ramakrishnan V., Kim R. et al. MiR-21 in the extracellular vesicles (EVs) of cerebrospinal fluid (CSF): a platform for glioblastoma biomarker development. *PLoS One* 2013;8(10): e78115. DOI: 10.1371/journal.pone.0078115.
 51. Shi R., Wang P.Y., Li X.Y. et al. Exosomal levels of miRNA-21 from cerebrospinal fluids associated with poor prognosis and tumor recurrence of glioma patients. *Oncotarget* 2015;6(29):26971–81. DOI: 10.18632/oncotarget.4699.
 52. Lan F., Qing Q., Pan Q. et al. Serum exosomal miR-301a as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma. *Cell Oncol (Dordr)* 2018;41:25–33. DOI: 10.1007/s13402-017-0355-3.
 53. Lan F., Yue X., Xia T. Exosomal microRNA-210 is a potentially non-invasive biomarker for the diagnosis and prognosis of glioma. *Oncol Lett* 2020;19(3):1967–74. DOI: 10.3892/ol.2020.11249.
 54. Shao H., Chung J., Balaj L. et al. Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat Med* 2012;18(12): 1835–40. DOI: 10.1038/nm.2994.
 55. Малек А.В., Самсонов Р.В., Къзиев А. Перспективы разработки методов диагностики и мониторинга онкологических заболеваний на основе анализа экзосом, секретируемых опухолевыми клетками. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(4):9–18. [Malek A., Samsonov R.V., Chiesi A. Development of cancer diagnostics and monitoring methods based on analysis of tumor-derived exosomes. *Rossiiskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2015;14(4):9–18. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2015-14-4-9-18.
 56. Koch C.J., Lustig R.A., Yang X.Y. et al. Microvesicles as a biomarker for tumor progression versus treatment effect in radiation/temozolomide-treated glioblastoma patients. *Transl Oncol* 2014;7(6):752–8. DOI: 10.1016/j.tranon.2014.10.004.
 57. André-Grégoire G., Bidere N., Gavard J. Temozolomide affects extracellular vesicles released by glioblastoma cells. *Biochimie* 2018;155:11–5. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.02.007.
 58. Osti D., Del Bene M., Rappa G. et al. Clinical significance of extracellular vesicles in plasma from glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* 2019;25(1):266–76. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1941.
 59. Simon T., Pinioti S., Schellenberger P. et al. Shedding of bevacizumab in tumour cells-derived extracellular vesicles as a new therapeutic escape mechanism in glioblastoma. *Mol Cancer* 2018;17(1):132. DOI: 10.1186/s12943-018-0878-x.
 60. Sheybani N.D., Batts A.J., Mathew A.S. et al. Focused ultrasound hyperthermia augments release of glioma-derived extracellular vesicles with differential immunomodulatory capacity. *Theranostics* 2020;10(16):7436–47. DOI: 10.7150/thno.46534.
 61. Brennan K., Martin K., FitzGerald S.P. et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Sci Rep* 2020;10(1):1039. DOI: 10.1038/s41598-020-57497-7.
 62. Galbo P.M. Jr, Ciesielski M.J., Figel S. et al. Circulating CD9+/GFAP+/survivin+ exosomes in malignant glioma patients following survivin vaccination. *Oncotarget* 2017;8(70):114722–35. DOI: 10.18632/oncotarget.21773.
 63. Zhu L., Oh J.M., Gangadaran P. et al. Targeting and therapy of glioblastoma

- in a mouse model using exosomes derived from natural killer cells. *Front Immunol* 2018;9:824. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00824.
64. Melzer C., Rehn V., Yang Y. et al. Taxol-loaded MSC-derived exosomes provide a therapeutic vehicle to target metastatic breast cancer and other carcinoma cells. *Cancers (Basel)* 2019;11(6):E798. DOI: 10.3390/cancers11060798.
65. Altanerova U., Babincova M., Babinec P. et al. Human mesenchymal stem cell-derived iron oxide exosomes allow targeted ablation of tumor cells via magnetic hyperthermia. *Int J Nanomedicine* 2017;12:7923–36. DOI: 10.2147/IJN.S145096.

Вклад авторов

А.И. Рябова: обзор публикаций по теме статьи, написание отдельных глав рукописи, формирование общего списка литературы;
В.А. Новиков: обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна обзора;
Н.В. Юнусова: написание отдельных глав рукописи, научное редактирование текста, подготовка рукописи к публикации;
А.А. Пономарева, Л.В. Спирина, О.В. Грибова: написание отдельных глав рукописи.

Authors' contributions

A.I. Ryabova: reviewing of publications of the article's theme, writing individual chapters of the manuscript, formation of list of references;
V.A. Novikov: reviewing of publications of the article's theme, review design development;
N.V. Yunusova: writing individual chapters of the manuscript, scientific text editing, preparation of the manuscript for publication;
A.A. Ponomareva, L.V. Spirina, O.V. Gribova: writing individual chapters of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.И. Рябова / A.I. Ryabova: <https://orcid.org/0000-0002-7171-8728>
В.А. Новиков / V.A. Novikov: <https://orcid.org/0000-0003-0364-0831>
Н.В. Юнусова / N.V. Yunusova: <https://orcid.org/0000-0003-4595-4177>
А.А. Пономарева / A.A. Ponomareva: <https://orcid.org/0000-0003-2060-4840>
Л.В. Спирина / L.V. Spirina: <https://orcid.org/0000-0002-5269-736X>
О.В. Грибова / O.V. Gribova: <https://orcid.org/0000-0003-1696-427X>

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

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

Роль микроРНК при нейроэндокринных новообразованиях желудка

И.Н. Перегородиев, С.В. Винокурова, В.Ю. Бохан, В.В. Делекторская, О.А. Малихова, В.А. Горбунова,
Б.И. Сакибов, Д.С. Елкин, И.С. Стилиди

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Иван Николаевич Перегородиев ivan.peregorodiev@gmail.com

Нейроэндокринные новообразования (НЭН) — гетерогенная группа редких эпителиальных опухолей, возникающих из клеток с нейроэндокринным фенотипом. Чаще всего НЭН встречаются в органах желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы — 60 % от НЭН всех локализаций. Частота встречаемости НЭН желудка составляет около 9 % от всех нейроэндокринных опухолей (НЭО) желудочно-кишечного тракта и 0,3 % от всех опухолей желудка. С учетом этиологии, патогенеза и морфологической картины НЭН желудка классифицируют на 3 клинично-морфологических типа. Также отдельно выделяют нейроэндокринный рак: мелко- и крупноклеточный. Прогноз и подход к лечению различных типов НЭН желудка существенно отличаются. Современные методы инструментальной диагностики, иммуногистохимические методы морфологического исследования наряду со световой микроскопией не всегда позволяют точно оценить злокачественный потенциал опухоли и индивидуализировать процесс лечения. Одним из перспективных направлений в изучении НЭО является определение молекулярного механизма, лежащего в основе их развития, в частности роли микроРНК. Данное направление может открыть новый вектор понимания патогенеза, определения прогноза заболевания, а также нахождения новых точек приложения для лекарственного лечения НЭО.

МикроРНК — класс коротких (18–25 нуклеотидов) некодирующих молекул РНК. МикроРНК могут быть вовлечены в регуляцию всех основных клеточных процессов, включая пролиферацию и дифференцировку, метаболизм, сигнальные пути и апоптоз. Исследование экспрессии микроРНК в тканях выявило опухолеспецифичные микроРНК. В отличие от ряда других злокачественных опухолей, экспрессия микроРНК у больных с диагнозом НЭН недостаточно изучена. Одними из немногих микроРНК, значение которых в НЭО желудка было продемонстрировано, являются микроРНК-222 и микроРНК-202.

Ключевые слова: микроРНК, нейроэндокринная опухоль желудка

Для цитирования: Перегородиев И.Н., Винокурова С.В., Бохан В.Ю. и др. Роль микроРНК при нейроэндокринных новообразованиях желудка. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(3):19–26.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-3-19-26



Role of microRNAs in neuroendocrine neoplasms of the stomach

I.N. Peregorodiev, S.V. Vinokurova, V.Yu. Bohyan, V.V. Delektorskaya, O.A. Malikhova, V.A. Gorbunova,
B.I. Sakibov, D.S. Elkin, I.S. Stilidi

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Neuroendocrine neoplasms (NENs) are a heterogeneous group of rare epithelial tumors that arise from cells with a neuroendocrine phenotype. NENs are found in the gastrointestinal tract and pancreas — 60 % of all localities. The incidence of gastric NENs is about 9 % of all neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and 0.3 % of all stomach tumors. Stomach neuroendocrine tumors (NETs) are classified into three clinico-pathological types, based on etiology, pathogenesis and morphology. There are also separate neuroendocrine cancers: small- and large-cell. The prognosis and approach to treatment of various types of gastric NENs differs significantly. Modern methods of instrumental diagnostics, immunohistochemical methods of morphological research, along with light microscopy, do not always allow us to accurately assess the malignant potential of a tumor and individualize the treatment process. One of the promising directions in the study of NETs is to determine the molecular mechanism underlying their development, in particular the role of microRNAs. This direction can open a new vector of understanding the pathogenesis, determining the prognosis of the disease, as well as finding new application points for the drug treatment of NETs.

MicroRNAs are a class of short non-coding RNA molecules (18–25 nucleotides). MicroRNAs can be involved in the regulation of all major cellular processes, including proliferation and differentiation, metabolism, signaling pathways, and apoptosis. A study of microRNA expression in tissues revealed tumor-specific microRNAs. In contrast to a number of other malignant tumors, microRNA expression in patients diagnosed with NENs is poorly understood. MicroRNA-222 and microRNA-202 are among the few microRNAs that have been demonstrated in the NETs of the stomach.

Key words: microRNA, neuroendocrine tumor of stomach

For citation: Peregorodiev I.N., Vinokurova S.V., Bohyan V.Yu. et al. Role of microRNAs in neuroendocrine neoplasms of the stomach. Uspexhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2020;7(3):19–26. (In Russ.).

Введение

Нейроэндокринные новообразования (НЭН) — гетерогенная группа редких эпителиальных опухолей, возникающих из клеток с нейроэндокринным фенотипом. Чаще всего НЭН встречаются в органах желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы — 60 % от НЭН всех локализаций. Частота встречаемости НЭН желудка составляет около 9 % от всех нейроэндокринных опухолей (НЭО) желудочно-кишечного тракта [1] и 0,3 % от всех опухолей желудка [2]. С учетом этиологии, патогенеза и морфологической картины НЭН желудка классифицируют на 3 клинико-морфологических типа. Также отдельно выделяют нейроэндокринный рак: мелко- и крупноклеточный. Еще одной важной классификацией является классификация Всемирной организации здравоохранения 2010 г., в основе которой лежат такие показатели, как индекс пролиферативной активности Ki-67 и митотический индекс. Прогноз и подход к лечению разных типов НЭН желудка при этом существенно отличаются.

Современные методы инструментальной диагностики, иммуногистохимические методики морфологического исследования, наряду со световой микроскопией, не всегда позволяют достаточно тонко оценивать злокачественный потенциал опухоли и индивидуализировать процесс лечения. Одним из перспективных направлений в изучении НЭО является определение молекулярного механизма, лежащего в основе их развития, в частности определение роли микроРНК. Данное направление может способствовать более точному определению прогноза заболевания, а также нахождению новых точек приложения для лекарственного лечения НЭО.

Биогенез микроРНК

МикроРНК — класс коротких (18–25 нуклеотидов) не кодирующих молекул РНК. Впервые они были открыты R.C. Lee и соавт. в 1993 г. при изучении гена *lin-4* у нематоды *Caenorhabditis elegans* [3]. С тех пор микроРНК были обнаружены в растениях, животных и некоторых вирусах. Кроме этого, некоторые микроРНК эукариот эволюционно консервативны, что свидетельствует о том, что они являются компонентом древнего механизма регуляции экспрессии генов. Информация об известных микроРНК аккумулируется в общедоступной базе данных miRBase v. 22.1 [4].

Гены микроРНК транскрибируются ядерной РНК-полимеразой II. В итоге образуются первичные микроРНК-транскрипты/при-микроРНК (primary/prt-miRNA) в виде длинных молекул, формирующих вторичные структуры типа «шпильки». Регуляция транскрипции микроРНК контролируется многочисленными транскрипционными факторами. Далее при-микроРНК процессируются посредством ядерной эндорибонуклеазы Drosha с образованием нескольких микроРНК-предшественников пре-микроРНК (precursor miRNA/pre-miRNA) длиной 60–100 нуклеотидов, которые

также формируют стабильные «шпильки». Пре-микроРНК выходят в цитоплазму с помощью Ran-GTP-зависимого транспортного белка экспорта 5. В цитоплазме пре-микроРНК подвергаются действию рибонуклеазы III Dicer [5], что приводит к формированию коротких двухцепочечных РНК-фрагментов. Двухцепочечная РНК диссоциирует на 2 комплементарные молекулы микроРНК. Одна из них, зрелая микроРНК (guide strand), связывается с протеином из семейства Argonaute (Ago) и включается в состав цитоплазматического РНК-индуцируемого рибонуклеопротеинового комплекса выключения гена (RNA-induced silencing complex, RISC). В составе RISC зрелые молекулы микроРНК специфически взаимодействуют с комплементарными участками матричной РНК (мРНК), что ведет к ингибированию трансляции или к деградации мРНК-мишени [6] (см. рисунок). Комплексы микроРНК и мРНК быстро расщепляются, что является примером направленной деградации ввиду того, что в основе формирования этих комплексов лежит полная комплементарность 2 молекул РНК. Если же полной комплементарности нет, а есть лишь частичная, то выключение функции гена идет по принципу предотвращения трансляции мРНК.

Функции микроРНК

Роль микроРНК в регуляции белоккодирующих генов существенна: по различным оценкам, они регулируют примерно 60 % всех кодирующих генов [7]. Таким образом, одна микроРНК может взаимодействовать с сотнями и даже тысячами мРНК. И напротив, одна мРНК может регулироваться несколькими микроРНК [8]. Таким образом, в целом микроРНК могут быть вовлечены в регуляцию всех основных клеточных процессов, включая пролиферацию и дифференцировку, метаболизм, сигнальные пути и апоптоз [9]. Поскольку микроРНК контролируют большую часть кодирующего белка генома, их экспрессионные паттерны тканеспецифичны. Нарушение экспрессии микроРНК обнаруживается при различных патологических состояниях, в том числе во многих случаях со злокачественными опухолями [10]. МикроРНК могут регулировать гены-супрессоры опухоли и онкогены. Все это формирует дополнительный уровень функциональной сложности, так как в зависимости от тканевой экспрессии микроРНК могут вести себя и как онко-микроРНК, способствуя развитию опухоли, и как анти-онко-микроРНК, подавляя развитие новообразования [11]. Помимо этого, более 50 % генов микроРНК в опухолях локализуются в областях, связанных с делецией, транслокацией и амплификацией нуклеотидных последовательностей, что также указывает на их важное значение в процессе канцерогенеза [12].

Первые доказательства вовлечения микроРНК в канцерогенез были получены в 2002 г. Почти у половины больных хроническим лимфоцитарным лейкозом была описана делеция участка длинного плеча

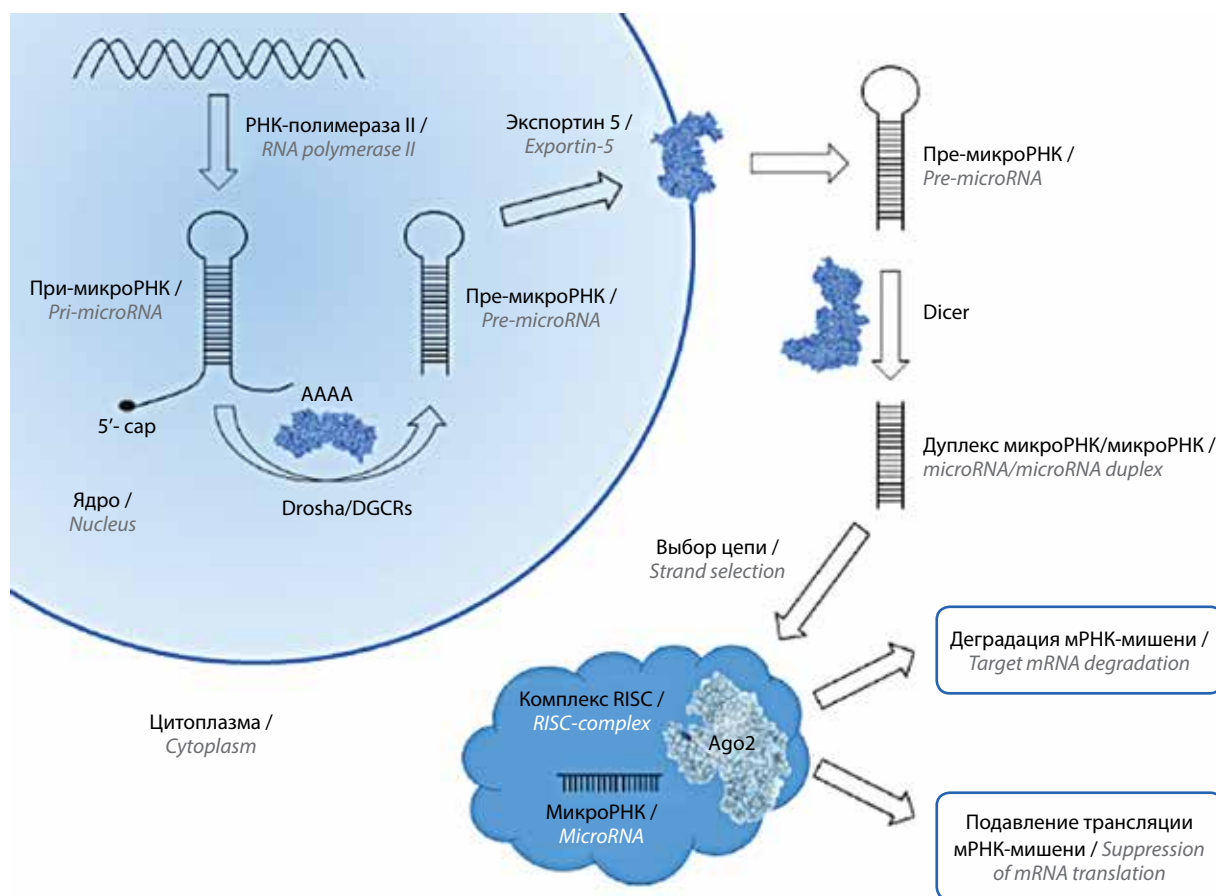


Схема биогенеза микроРНК. Образование микроРНК начинается с транскрипции РНК-полимеразой II гена микроРНК в ядре. В результате образуется «шпилька» при-микроРНК, которая затем процессируется эндорибонуклеазой Drosha в комплексе с белком DGCR8 (продукт гена синдрома Ди Джорджи) с образованием предшественника микроРНК — пре-микроРНК. Транспорт пре-микроРНК в цитоплазму осуществляется с помощью белка экспортина 5. В цитоплазме пре-микроРНК взаимодействует с рибонуклеазой Dicer, в результате чего образуется дуплекс зрелых микроРНК, одна из которых связывается с белком Ago2 и включается в белковый комплекс RISC. Комплекс микро-РНК—RISC может осуществлять подавление экспрессии генов как за счет дегградации матричной РНК (мРНК), так и за счет подавления ее трансляции

MicroRNA biogenesis scheme. MicroRNA formation begins with transcription by RNA polymerase II of the microRNA gene in the nucleus. The result is the formation of the pri-microRNA hairpin, which is then processed by Drosha endoribonuclease in combination with DGCR8 protein (a product of the DiGeorge syndrome chromosomal region 8) to form the precursor of microRNA — pre-microRNA. Pre-microRNA is transported to cytoplasm by the protein exportin-5. In the cytoplasm, pre-microRNA interacts with Dicer ribonuclease to form a duplex of mature microRNA, one of which binds with protein Ago2 and is included in the protein complex RISC. The RISC—microRNA complex can suppress gene expression by degradation of messenger RNA (mRNA) or by inhibiting its translation

хромосомы 13(13q14), которая кодирует микроРНК-15а, -16-1. Последние же, в свою очередь, экспрессируются с одной и той же полицистронной при-микроРНК [13]. Позже было установлено, что микроРНК-15а, -16-1 регулируют экспрессию гена *BCL-2*, и потеря их функции вследствие делеции обеспечивает генетическую основу для сверхэкспрессии *BCL-2* и последующую потерю способности опухолевых клеток к апоптозу у больных хроническим лимфолейкозом [14].

В настоящее время известно, что основные причины aberrантной экспрессии генов микроРНК, по-видимому, связаны с их локализацией в ассоциированных с раком геномных областях, часто подвергаемых генетическим повреждениям, либо же обусловлены нарушением эпигенетических механизмов регуляции транскрипции микроРНК или aberrантным механизмом биогенеза микроРНК [10].

МикроРНК и диагностика новообразований: перспективы использования метода жидкостной биопсии

Исследование экспрессии микроРНК в тканях выявило опухолеспецифичные микроРНК: были обнаружены органоспецифичные опухолеассоциированные сигнатуры микроРНК [15]. Как для первичных опухолей, так и для метастазов получены демонстративные панели микроРНК. Эти панели могут использоваться как в экспериментальных исследованиях, так и в клинической практике. Некоторые авторы предлагают также использовать экспрессию циркулирующих микроРНК как своего рода «отпечатки пальцев» при диагностике и определении прогноза по ряду опухолевых заболеваний [16]. Также сообщается о корреляции уровня экспрессии микроРНК с ответом на лечение, в том числе со степенью лекарственной

резистентности [17]. Кроме этого, экспрессия микроРНК при опухолях из невыявленного первичного очага может рассматриваться как потенциальный фактор определения локализации первичной опухоли.

Одним из важных инструментов, использующихся сегодня в «дактилоскопии» опухоли, является жидкостная биопсия. Это инновационный инструмент, позволяющий определить циркулирующий опухолевый материал, к которому относятся циркулирующие опухолевые ДНК, циркулирующие опухолевые клетки, в том числе микроРНК.

За последнее десятилетие продемонстрирована принципиальная возможность обнаружения микроРНК в различных биологических жидкостях организма [18], что положило начало многочисленным исследованиям паттернов экспрессии циркулирующих микроРНК при различных патологических состояниях. Полученные данные свидетельствуют о широком спектре нарушений профилей экспрессии циркулирующих микроРНК при многочисленных заболеваниях, включая сердечно-сосудистые, респираторные, почечные, инфекционные, метаболические, нейродегенеративные и психические [19]. Наибольшее количество нарушений паттерна циркулирующих микроРНК было выявлено при онкологических заболеваниях [20]. Эта взаимосвязь определила значительный интерес к исследованию циркулирующих микроРНК как новых биомаркеров при злокачественных новообразованиях.

Безусловно, биопсия и тканеспецифичные онкомаркеры являются сегодня основой диагностики, однако ввиду инвазивности их сложно рассматривать как инструмент определения эффективности лечения в режиме реального времени. В связи с этим остро встает вопрос поиска альтернативного пути исследования опухолевого материала с точки зрения как выявления новых онкомаркеров, так и возможности использования неинвазивных подходов для анализа. Таким образом, жидкостная биопсия ввиду своей простоты и тиражируемости является областью значительного клинического и научного интереса.

Существующие представления о микроРНК предполагают, что она высвобождается в кровоток либо посредством секреции в составе экстраклеточных везикул, либо в результате гибели клеток, а уровень циркулирующих микроРНК соответствует уровню микроРНК в ткани. Предполагается роль селективной экспрессии микроРНК как способа межклеточной коммуникации. Наиболее обоснованной представляется корреляция сигнатур циркулирующих микроРНК и секреторного фенотипа НЭН [21]. Высвобождение микроРНК в результате гибели клеток редко встречается при НЭО. По-видимому, этот механизм является маловероятным источником внеклеточных микроРНК [22]. С другой стороны, опухоль может индуцировать секрецию микроРНК из неопухолевых клеток. Аномальные профили микроРНК могут также отражать

неспецифические физиологические реакции на растущее новообразование [23], что объясняет снижение уровня циркулирующих микроРНК.

Показано отсутствие конкордантности в уровнях экспрессии микроРНК в опухоли и циркулирующих микроРНК у пациентов со злокачественными новообразованиями [24]. Однако необходимо продолжать проведение исследований в этой области. В частности, необходимо всесторонне оценить влияние преаналитических, аналитических и постаналитических этапов. Качество проведения данных этапов может оказывать существенное влияние на интерпретацию результатов анализа экспрессии циркулирующих микроРНК и на ее взаимосвязь с развитием онкологического процесса.

Обнаружение и количественная оценка микроРНК остаются сложной задачей, поскольку не существует общепринятых методических стандартов и эталонных референсных значений. На сегодняшний день инициированы исследования, которые направлены на их определение. В частности, ряд авторов провели анализ образцов НЭО поджелудочной железы и тонкой кишки. Целью исследования было определение посредством полимеразной цепной реакции содержания наиболее стабильных микроРНК. В качестве референсных малых не кодирующих РНК были использованы SNORD61 и SNORD95 для опухолей тонкой кишки и микроРНК-93 для опухолей поджелудочной железы [25]. Однако полученные данные касаются только референсных внутриклеточных микроРНК, и проблема нормализации уровней секретируемых микроРНК остается актуальной.

Для оценки клинической ценности микроРНК как биомаркера необходимы дополнительные и более глубокие исследования, касающиеся выделения и методик определения микроРНК, анализа опухолеспецифичных сигнатур, которые отражают определенные биологические процессы в опухолевой ткани.

МикроРНК в нейроэндокринных опухолях желудка

В отличие от ряда других злокачественных опухолей, экспрессия микроРНК у больных с диагнозом НЭН недостаточно изучена. Основной причиной этого является низкая распространенность данной патологии. Были проведены исследования, посвященные изучению экспрессии микроРНК у пациентов с НЭО поджелудочной железы и тонкой кишки, а также с мелкоклеточным раком легкого. Результаты их неоднозначны. С. Roldo и соавт. продемонстрировали разный уровень экспрессии микроРНК у пациентов с НЭО и ацинарными (обычными) опухолями поджелудочной железы [26]. S.C. Li и соавт. сообщили, что прогрессия НЭО тонкой кишки связана со значительным возрастанием количества микроРНК-96/-182/-183/-196/-200 [27]. Исследования, посвященные изучению роли микроРНК у пациентов с НЭН желудка, в мировой литературе практически отсутствуют.

Одними из немногих микроРНК, значение которых в НЭО желудка было продемонстрировано, являются микроРНК-222 и микроРНК-202. Ранее роль данных микроРНК исследовалась в таких опухолях, как рак щитовидной железы [28], немелкоклеточный рак легкого [29], гепатоцеллюлярная карцинома [30], колоректальный рак [31]. Функция микроРНК-222 осуществляется посредством подавления уровня мРНК ингибитора клеточного цикла $p27^{KIP1}$ [32]. Один из этиологических факторов развития НЭО желудка — гипергастринемия. Гастрин реализует свой патогенетический эффект посредством связывания с ССК2-рецепторами на поверхности энтерохромафинноподобных клеток (ECL-клеток) слизистой оболочки желудка, что приводит к активации различных внутриклеточных сигнальных путей, в том числе протеинкиназы-С (PKC), MAP-киназы (MAPK), фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) [33]. К.А. Lloyd и соавт. предположили, что гастрин может оказывать туморогенный эффект посредством изменения экспрессии специфических микроРНК, которые, в свою очередь, изменяют экспрессию нижестоящих белков, регулирующих ключевые клеточные процессы, определяющие опухолевую прогрессию [32].

В дальнейшем было показано, что микроРНК-222 удовлетворяет этим условиям. В исследованиях на мышах и у пациентов было продемонстрировано, что уровень микроРНК-222 возрастает в слизистой оболочке желудка и плазме крови на фоне гипергастринемии. Увеличение количества гастрининдуцированной экспрессии микроРНК-222 приводит к усилению поляризации и миграции клеточной линии AGS_{GR}, а также к клеточным событиям, которые связаны с развитием опухолевого процесса. По крайней мере отчасти эти эффекты достигаются микроРНК-222 путем снижения экспрессии и дислокации в цитоплазме белка $p27$. МикроРНК связывается с 3'-концом мРНК $p27$ [34], что приводит к деградации последней. В ряде исследований показано, что индуцированное микроРНК-222 ингибирование $p27$ оказывает влияние на развитие опухоли.

До последнего времени было мало данных, связывающих экспрессию $p27$ в желудке конкретно с гастринном, однако ранее исследователи изучали роль $p27$ в индуцированном *Helicobacter pylori* канцерогенезе. *H. pylori* снижает экспрессию белка-ингибитора клеточного цикла $p27$ как на транскрипционном, так и на посттрансляционном уровне. *H. pylori* модулирует связанный с G-белком дельта-опиоидный рецептор (DOR), который регулирует ацетилирование гистонов гена $p27$ [35]. Кроме этого, хеликобактерная инфекция совместно с хроническим атрофическим гастритом типа А снижает транскрипцию $p27$ за счет активации сигнального пути PI3K/Akt [36]. *H. pylori* также способствует фосфорилированию треонина/серина белка $p27$, что позволяет ему накапливаться в цитоплазме [37]. Это снижает убиквитинацию $p27$, которая в результате ускоряет его деградацию по протеасомно-зависимому

пути в процессе клеточного цикла [38]. Мыши, у которых был подавлен ген $p27$, демонстрировали повышенную восприимчивость к индуцированной *H. pylori* пренеопластической патологии желудка [39]. У пациентов с хроническим гастритом, вызванным хеликобактерной инфекцией, также наблюдается снижение экспрессии $p27$ в тканях желудка, которая восстанавливается после эрадикации *H. pylori* [40].

На животных моделях [41] и клеточных культурах [42] было продемонстрировано, что длительное воздействие *H. pylori* способствует развитию резистентного к апоптозу фенотипа, ассоциированного со снижением экспрессии $p27$ [43]. Ряд авторов в своих работах показывают снижение экспрессии $p27$ в НЭО желудка, возникающее у трансгенных мышей, которые были гипергастринемичны в результате делеции *Men1* и применения соматостатина, а также омепразола. Кроме этого, в данных работах также сообщалось о потере экспрессии $p27$ в НЭО желудка 1-го типа человека, ассоциированных с атрофическим гастритом, а также были показаны аналогичные изменения в распределении $p27$ (путем иммуноцитофлуоресценции, а также субклеточного фракционирования) в клеточной линии ССК2R, экспрессирующей AGS-E [44]. Белок $p27$ обладает рядом хорошо описанных функций, влияющих на канцерогенез [45]. При локализации в ядре он является преимущественно ингибитором клеточного цикла. Если же $p27$ находится в цитоплазме, он регулирует миграцию и инвазию клеток независимым от клеточного цикла образом. В данной работе было показано, что гастрин индуцировал экспрессию микроРНК-222 в клетках, имеющих ССК2-рецепторы. Повышенное количество микроРНК-222 было выявлено в образцах слизистой оболочки желудка, а также сыворотки крови у пациентов с гипергастринемией и НЭО желудка 1-го клинко-морфологического типа. Таким образом, микроРНК-222 потенциально может быть применима в качестве биомаркера у пациентов с НЭО желудка 1-го типа. Измерение содержания микроРНК-222 в сыворотке крови также может быть использована, для мониторинга ответа на лечение антагонистами ССК2-рецепторов, такими как нетазепид. Однако необходима дальнейшая работа по изучению того, является ли повышение уровня микроРНК-222 в сыворотке крови специфичным для пациентов с НЭО желудка 1-го типа или же он также повышается у пациентов, имеющих другие причины гипергастринемии, такие как длительное применение ингибиторов протонной помпы. Так или иначе, гастрининдуцированная гиперэкспрессия микроРНК-222 является функционально важным аспектом.

Коллектив авторов из China-Japan Friendship Hospital во главе с D. Dou исследовали микроРНК у пациентов с диагнозом НЭО желудка 1-го клинко-морфологического типа (тип опухолей, ассоциированных с хроническим атрофическим гастритом) [46].

Исследованию подверглись опухолевая ткань и слизистая оболочка желудка, взятые у одних и тех же пациентов. В результате полимеразной цепной реакции была подтверждена повышенная экспрессия микроРНК-202-3р в опухолевой ткани. Было продемонстрировано, что микроРНК-202-3р гиперэкспрессируется в НЭО желудка 1-го клиничко-морфологического типа. После длительного анализа было показано, что одной из мишеней этой микроРНК является ген *DUSP1* — опухоль-супрессивный ген, ассоциированный с опухолями желудка. МикроРНК-202-3р негативно регулирует экспрессию данного гена. *DUSP1* кодирует фосфатазу 1 митоген-активируемых протеинкиназ (МКР-1). Эти фосфатазы известны как фосфатазы двойной специфичности. Они играют важную роль в инактивации различных изоформ митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) [47]. За последнее время *DUSP1* был изучен достаточно хорошо. Основной точкой приложения продукта данного гена (или просто *DUSP1*) является клеточная пролиферация, апоптоз, клеточная дифференцировка и трансформация, а также ответ на стресс и воспаление. Данные функции осуществляются в основном за счет МАРК-сигнального пути [48].

Результаты все большего количества исследований показывают, что влияние *DUSP1* на развитие опухоли может быть разнообразным и сложным. При этом для ряда опухолей оказывается онкогенный, а для других — антионкогенный эффект [49]. Таким образом, авторы заключают, что микроРНК-202-3р способствует развитию НЭО желудка 1-го клиничко-морфологического типа. Кроме этого, в ряде исследований

показано, что *DUSP1* оказывает значительное противоопухолевое действие при различных новообразованиях, в том числе и при НЭО желудка 1-го клиничко-морфологического типа. В норме, хотя гипергастринемия и приводит к пролиферации ECL-клеток, дисплазия не наблюдается ввиду сохранения нормальной экспрессии *DUSP1*. Когда же экспрессия *DUSP1* понижается за счет высокой экспрессии микроРНК-202, у ECL-клеток появляется способность к дисплазии и в конечном итоге к развитию НЭН 1-го клиничко-морфологического типа.

Заключение

В заключение следует отметить, что роль микроРНК у пациентов с НЭО желудка изучена недостаточно. Небольшое количество работ, которые сегодня встречаются в мировой литературе, посвящено изучению микроРНК в группе благоприятного прогноза НЭО желудка 1-го клиничко-морфологического типа. У данной категории пациентов продемонстрирована потенциальная роль микроРНК как биомаркера и предиктора ответа на лекарственное лечение, а также определена роль микроРНК в патогенезе развития НЭО на фоне гипергастринемии. Совершенно неясной при этом остается роль микроРНК у более сложной категории пациентов, в частности с диагнозом НЭО желудка 3-го клиничко-морфологического типа и НЭР. Именно для этих пациентов поиск новых маркеров, определяющих прогноз течения заболевания, ответ на лечение, прогрессирование заболевания, является наиболее актуальными, и микроРНК потенциально может быть одним из таких маркеров.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Frilling A., Modlin I.M., Kidd M. et al. Recommendations for management of patients with neuroendocrine liver metastases. *Lancet Oncol* 2014;15(1):e8–21. DOI:10.1016/S1473-2045(13)70362-0.
- Okita N.T., Kato K., Takahari D. et al. Neuroendocrine tumors of the stomach: chemotherapy with cisplatin plus irinotecan is effective for gastric poorly-differentiated neuroendocrine carcinoma. *Gastric Cancer* 2011;14(2):161–5. DOI: 10.1007/s10120-011-0025-5.
- Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843–54. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
- <http://www.mirbase.org/>.
- Valencia-Sanchez M.A., Liu J., Hannon G.J., Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 2006;20(5):515–24. DOI: 10.1101/gad.1399806.
- Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281–97. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- Friedman R.C., Kai-How Farh K., Burge C.B., Bartel D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19(1):92–105. DOI: 10.1101/gr.082701.108.
- Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15–20. DOI: 10.1016/j.cell.2004.12.035.
- Harfe B.D. MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15:410–5. DOI: 10.1016/j.gde.2005.06.012.
- Croce C.M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009;10:704–14. DOI: 10.1038/nrg2634.
- Zhang B., Pan X., Cobb G.P. et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007;302:1–12. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.08.028.
- Calin G.A., Sevignani C., Dumitru C.D. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2999–3004. DOI: 10.1073/pnas.0307323101.
- Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(24):15524–9. DOI: 10.1073/pnas.242606799.
- Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*

- 2005;102(39):13944–9.
DOI: 10.1073/pnas.0506654102.
15. Lu J., Getz G., Miska E.A. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435(7043):834–8.
DOI: 10.1038/nature03702.
16. Hiyoshi Y., Watanabe M. MicroRNAs in gastrointestinal cancer: a novel bio-marker and its clinical application. *J Cancer Metastasis Treat* 2015;1:144–55.
17. Di Leva G., Croce C.M. miRNA profiling of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2013; 23:3–11. DOI: 10.1016/j.gde.2013.01.004.
18. Chen X., Ba Y., Ma L. et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008;18(10):997–1006.
DOI: 10.1038/cr.2008.282.
19. Basak I., Patil K.S., Alves G. et al. MicroRNAs as neuroregulators, biomarkers and therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(4):811–27.
DOI: 10.1007/s00018-015-2093-x.
20. Kosaka N., Iguchi H., Ochiya T. Circulating 23 microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 2010;101:2087–92.
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x.
21. Vazquez-Martinez R., Gasman S. The regulated secretory pathway in neuroendocrine cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:48.
DOI: 10.3389/fendo.2014.00048.
22. Thorns C., Schurmann C., Gebauer N. et al. Global microRNA profiling of pancreatic neuroendocrine neoplasias. *Anticancer Res* 2014;34(5):2249–54.
23. Singh R., Ramasubramanian B., Kanji S. et al. Circulating microRNAs in cancer: hope or hype? *Cancer Lett* 2016;381(1): 113–21. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.07.002.
24. Mittelbrunn M., Gutiérrez-Vázquez C., Villarroya-Beltrí C. et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2011;2:282.
DOI: 10.1038/ncomms1285.
25. Sperveslage J., Hoffmeister M., Henopp T. et al. Establishment of robust controls for the normalization of miRNA expression in neuroendocrine tumors of the ileum and pancreas. *Endocrine* 2014;46(2):226–30.
DOI: 10.1007/s12020-014-0202-5.
26. Roldo C., Missiaglia E., Hagan J.P. et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol* 2006;24:4677–84.
DOI: 10.1200/JCO.2005.05.5194.
27. Li S.C., Essaghir A., Martijn C. et al. Global microRNA profiling of well-differentiated small intestinal neuroendocrine tumors. *Mod Pathol* 2013;26:685–96.
DOI: 10.1038/modpathol.2012.216.
28. Liang L., Zheng X., Hu M. et al. MiRNA-221/222 in thyroid cancer: a meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2018;484:284–92.
DOI: 10.1016/j.cca.2018.06.012.
29. Hetta H.F., Zahran A.M., El-Mahdy R.I. et al. Assessment of circulating miRNA-17 and miRNA-222 expression profiles as non-invasive biomarkers in Egyptian patients with non-small-cell lung. *Cancer Asian Pac J Cancer Prev* 2019;20(6):1927–33.
DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.6.1927.
30. Li Y., Di C., Li W. et al. Oncomirs miRNA-221/222 and tumor suppressors miRNA-199a/195 are crucial miRNAs in liver cancer: a systematic analysis. *Dig Dis Sci* 2016;61(8):2315–27.
DOI: 10.1007/s10620-016-4156-8.
31. Ke S.B., Qiu H., Chen J.M. et al. MicroRNA-202-5p functions as a tumor suppressor in colorectal carcinoma by directly targeting SMARCC1. *Gene* 2018;676:329–35.
DOI: 10.1016/j.gene.2018.08.064.
32. Lloyd K.A., Moore A.R., Parsons B.N. et al. Gastrin-induced miR-222 promotes gastric tumor development by suppressing p27^{KIP1}. *Oncotarget* 2016;7(29):45462–78.
DOI: 10.18632/oncotarget.9990.
33. Dockray G., Dimaline R., Varro A. Gastrin: old hormone, new functions. *Pflugers Arch* 2005;449:344–55.
DOI: 10.1007/s00424-004-1347-5.
34. Le Sage C., Nagel R., Egan D.A. et al. Regulation of the p27 (KIP1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J* 2007;26:3699–708.
DOI: 10.1038/sj.emboj.7601790.
35. Byun S.W., Chang Y.J., Chung I.S. et al. *Helicobacter pylori* decreases p27 expression through the delta opioid receptor-mediated inhibition of histone acetylation within the p27 promoter. *Cancer Lett* 2012;326:96–104.
DOI: 10.1016/j.canlet.2012.07.032.
36. Shu-Ping L., Xue-Jun C., Ai-Hua S. et al. CagA + *H. pylori* induces Akt1 phosphorylation and inhibits transcription of p21 WAF1/CIP1 and p27^{KIP1} via PI3K/Akt1 pathway. *Biomed Environ Sci* 2010;23:273–8.
DOI: 10.1016/S0895-3988(10)60063-3.
37. Wen S., So Y., Singh K. et al. Promotion of cytoplasmic mislocalization of p27 by *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Oncogene* 2012;31:1771–80.
DOI: 10.1038/onc.2011.362.
38. Eguchi H., Herschenhou N., Kuzushita N., Moss S.F. *Helicobacter pylori* increases proteasome-mediated degradation of p27 (KIP1) in gastric epithelial cells. *Cancer Res* 2003;63(15):4739–46.
39. Kuzushita N., Rogers A.B., Monti N.A. et al. p27^{KIP1} deficiency confers susceptibility to gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Gastroenterology* 2005;129:1544–56.
DOI: 10.1053/j.gastro.2005.07.056.
40. Yu J., Leung W., Ng E. et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on expression of cyclin D2 and p27 in gastric intestinal metaplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1505–11.
DOI: 10.1046/j.1365-2036.2001.01038.x.
41. Peek R.M. Jr, Wirth H.P., Moss S.F. et al. *Helicobacter pylori* alters gastric epithelial cell cycle events and gastrin secretion in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 2000;118:48–59.
DOI: 10.1016/S0016-5085(00)70413-6.
42. Eguchi H., Carpentier S., Kim S. et al. p27^{KIP1} regulates the apoptotic response of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori*. *Gut* 2004;53:797–804.
DOI: 10.1136/gut.2003.032144.
43. Shirin H., Sordillo E.M., Kolevska T.K. et al. Chronic *Helicobacter pylori* infection induces an apoptosis-resistant phenotype associated with decreased expression of p27^{KIP1}. *Infect Immun* 2000;68:5321–8.
DOI: 10.1128/iai.68.9.5321-5328.2000.
44. Sundaresan S., Kang A.J., Hayes M.M. et al. Deletion of *Men1* and *somatostatin* induces hypergastrinemia and gastric carcinoids. *Gut* 2017;66(6):1012–21.
DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310928.
45. Wander S.A., Zhao D., Slingerland J.M. p27: a barometer of signaling deregulation and potential predictor of response to targeted therapies. *Clin Cancer Res* 2011;17:12–8.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0752.
46. Dou D., Shi Y.F., Liu Q. et al. Hsa-miR-202-3p, up-regulated in type 1 gastric neuroendocrine neoplasms, may target DUSP1. *World J Gastroenterol* 2018;24(5):573–82.
DOI: 10.3748/wjg.v24.i5.573.
47. Theodosiou A., Ashworth A. MAP kinase phosphatases. *Genome Biol* 2002;3(7):REVIEWS3009.
DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-reviews3009.
48. Owens D.M., Keyse S.M. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 2007;26:3203–13.
DOI: 10.1038/sj.onc.1210412.
49. Shen J., Zhang Y., Yuc H. et al. Role of DUSP1/MKP1 in tumorigenesis, tumor progression and therapy. *Cancer Med* 2016;5:2061–8. DOI: 10.1002/cam4.772.

Вклад авторов

И.Н. Перегородиев: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

С.В. Винокурова, В.Ю. Бохан, В.В. Делекторская, О.А. Малихова, В.А. Горбунова, И.С. Стилиди: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;

Б.И. Сакибов, Д.С. Елкин: написание текста рукописи.

Authors' contributions

I.N. Peregorodiev: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data, article writing;

S.V. Vinokurova, V.Yu. Bohyan, V.V. Delektorskaya, O.A. Malikhova, V.A. Gorbunova, I.S. Stilidi: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data;

B.I. Sakibov, D.S. Elkin: article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.Н. Перегородиев / I.N. Peregorodiev: <https://orcid.org/0000-0003-1852-4972>

С.В. Винокурова / S.V. Vinokurova: <https://orcid.org/0000-0003-1615-3928>

В.В. Делекторская / V.V. Delektorskaya: <https://orcid.org/0000-0002-4550-2069>

Д.С. Елкин / D.S. Elkin: <https://orcid.org/0000-0002-4793-6063>

И.С. Стилиди / I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-5229-8203>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Молекулярный портрет рака желудка, ассоциированного с вирусом Эпштейна–Барр

Е.О. Игнатова¹, Д.А. Серяк², М.Ю. Федянин¹, А.А. Трякин¹, И.А. Покатаев¹, С.Ф. Меньшикова³,
Ю.В. Вахабова⁴, М.С. Карбышев⁵, К.В. Смирнова^{1,5}, С.А. Тюлядин¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Минздрава России; Россия, 119146 Москва, Большая Пироговская ул., 19, стр. 1;

³отделение противоопухолевой лекарственной терапии АО «К 31 Сити»; Россия, 123112 Москва, Тестовская ул., 10;

⁴Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 3;

⁵ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Ксения Валерьевна Смирнова skv.lab@yandex.ru

Рак желудка, ассоциированный с вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), — особая форма онкологического заболевания, возникающая в результате клональной пролиферации ВЭБ-инфицированных эпителиоцитов слизистой оболочки желудка. Данный подтип опухолей имеет уникальные генетические и эпигенетические особенности, определяющие его характерный фенотип. Выявление широкого спектра молекулярных особенностей ВЭБ-ассоциированного рака желудка позволяет описать потенциальные мишени, перспективные для лекарственной терапии данного подтипа опухолей. В обзоре представлены современные данные об эпидемиологии и патогенезе ВЭБ-ассоциированного рака желудка, описаны его уникальные патоморфологические и молекулярные особенности. Особое внимание уделено прогностической роли ВЭБ-инфекции и лекарственной терапии, потенциально применимой для лечения ВЭБ-положительного рака желудка.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, онкоген, мутация, молекулярная диагностика, циркулирующая ДНК, иммунотерапия

Для цитирования: Игнатова Е.О., Серяк Д.А., Федянин М.Ю. и др. Молекулярный портрет рака желудка, ассоциированного с вирусом Эпштейна–Барр. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(3):27–36.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-3-27-36



Molecular portrait of stomach cancer associated with the Epstein–Barr virus

E.O. Ignatova¹, D.A. Seryak², M. Yu. Fedyanin¹, A.A. Tryakin¹, I.A. Pokataev¹, S.F. Menshikova³,
Yu. V. Vakhabova⁴, M.S. Karbyshev⁵, K. V. Smirnova^{1,5}, S.A. Tulyandin¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia; Build. 1, 19 Bol'shaya Pirogovskaya St., Moscow 119146, Russia;

³Anticancer Therapies Department, K 31 City; 10 Testovskaya St., Moscow 123112, Russia;

⁴P.A. Herten Moscow Oncology Research Institute — branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

⁵N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

Epstein–Barr virus (EBV) associated gastric carcinoma is a special form of gastric adenocarcinoma that arises against the background of clonal growth of EBV-infected epithelial cells of the gastric mucosa. This subtype of tumors has unique genetic and epigenetic features that determine its characteristic phenotype. Determination of the molecular features of EBV-associated gastric cancer made it possible to identify potential targets for drug therapy of this subtype of tumors. The review presents modern data on the epidemiology and pathogenesis of EBV-associated gastric cancer, describes its unique pathomorphological and molecular features. Particular attention is paid to the prognostic role of EBV infection and drug therapy potentially applicable to the treatment of EBV-positive gastric cancer.

Key words: Epstein–Bar virus, oncogene, mutation, molecular diagnosis, circulating DNA, immunotherapy

For citation: Ignatova E.O., Seryak D.A., Fedyanin M.Yu. et al. Molecular portrait of stomach cancer associated with the Epstein–Barr virus. *Uspexhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2020;7(3):27–36. (In Russ.).

Введение

Показано, что рак желудка (РЖ) занимает 5-е место по распространенности и 3-е место в структуре смертности от злокачественных новообразований в мире [1]. При этом хорошо известно, что определенные формы этих злокачественных новообразований имеют инфекционную этиологию. В качестве основного фактора риска рассматривается инфекция *Helicobacter pylori*, а выявление вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) в клетках опухоли наряду с дополнительными специфическими показателями указывает на редкий подтип РЖ — так называемую лимфоэпителиому (LEL-GC) [2]. Основным доказательством этиологической роли ВЭБ в развитии РЖ служит выявление ДНК этого онкогенного вируса исключительно в клетках опухоли, но не в окружающих здоровых клетках, а также моноклональность опухолевых клеток, которые содержат один и тот же вирусный геном [3–7]. Последнее наблюдение убедительно доказывает, что инфицирование ВЭБ предшествует опухолевой трансформации нормальных клеток желудка. Ранее проведенные исследования позволили выявить целый спектр специфических молекулярных признаков ВЭБ-ассоциированного (ВЭБ⁺) РЖ [8]. Помимо микросателлитной нестабильности (microsatellite instability, MSI) для таких подтипов опухолей характерна хромосомная нестабильность (chromosomal instability, CIN), а также целый спектр других черт, которые детально рассмотрим далее.

Молекулярные подтипы рака желудка

Полномасштабный молекулярно-генетический анализ, опубликованный в The Cancer Genome Atlas (TCGA) в 2014 г., позволил выделить 4 молекулярных подтипа РЖ [9]: 1) ВЭБ⁺-РЖ; 2) РЖ с MSI; 3) РЖ с CIN; 4) генетически стабильный РЖ (genomically stable, GS).

В 2018 г. по результатам молекулярного-генетического анализа 921 образца первичной аденокарциномы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), включая РЖ, удалось выделить 5-й подтип опухолей ЖКТ — гипермутированный с одонуклеотидными вариантами (hypermutated-SNV, HM-SNV) [10].

Следующим этапом был выполнен объединенный анализ TCGA для аденокарцином ЖКТ (пищевода, желудка, толстой кишки). В ходе проведения объединенного анализа TCGA первоначально в опухолевых образцах аденокарциномы ЖКТ определялся ВЭБ-статус. Далее ВЭБ-негативные (ВЭБ⁻) опухоли ЖКТ были распределены на 2 группы в соответствии с мутационной нагрузкой: аденокарциномы с высокой и низкой мутационной нагрузкой.

Аденокарциномы с высокой мутационной нагрузкой (hypermutated, содержащие более 10 мутаций на миллион нуклеотидов) были далее классифицированы на MSI-подтип и SNV-подтип. Гипермутированные опухоли с плотностью инсерций и делеций более 1 мутации на миллион нуклеотидов и соотношением

между SNV и инсерциями/делециями, не превышающим 1/150, были отнесены к MSI-подтипу, а остальные аденокарциномы ЖКТ — к SNV-подтипу.

Аденокарциномы с низкой мутационной нагрузкой, в свою очередь, были дифференцированы на 2 группы в зависимости от наличия или отсутствия альтерации числа копий соматических генов (somatic copy-number alterations, SCNAs): опухоли с CIN и генетически стабильный подтип (GS).

Объединенный TCGA анализ аденокарцином ЖКТ показал, что ВЭБ⁺-опухоли локализуются только в желудке и характеризуются наибольшей степенью гиперметилирования генома среди всех типов опухолей [10].

Доля ВЭБ⁺-РЖ среди других молекулярных подтипов составляет около 10 (1,3–20,1) % [11]. Известно, что данный подтип РЖ чаще встречается среди мужчин, чем среди женщин, и в более молодой возрастной группе, чем ВЭБ⁻-опухоли желудка [12]. Несмотря на наличие эндемичных территорий с высокой распространенностью ВЭБ⁺-злокачественных новообразований (лимфома Беркитта, назофарингеальная карцинома), ВЭБ⁺-РЖ встречается повсеместно [13], однако наиболее часто данный подтип встречается в Замбии и Брунее — до 23–30 % [8].

Патогенез и патоморфология рака желудка, ассоциированного с вирусом Эпштейна–Барр

Отмечено, что ВЭБ⁺-РЖ чаще локализуется в проксимальных отделах желудка (кардиальный отдел и тело желудка) и имеет диффузный гистологический тип по классификации Lauren [13]. Макроскопически ВЭБ⁺-РЖ представляет собой, как правило, язвенный или бляшкообразный рак со значительным утолщением стенки желудка [4]. Встречаются также синхронные множественные ВЭБ⁺-карциномы желудка [13].

Среди всех молекулярных подтипов аденокарцином ЖКТ ВЭБ⁺-РЖ характеризуется наибольшей иммуногенностью. При данном подтипе выявлены высокая экспрессия PD-L1 и PD-L2, высокое содержание CD8⁺ опухолинфильтрирующих лимфоцитов (TILs), а также высокий уровень экспрессии генов иммуногенных путей, например сигнального пути IFN [10, 14, 15].

Механизм проникновения ВЭБ в эпителиоциты желудка остается до конца не изученным. Поскольку эпителиальные клетки желудка не экспрессируют молекулу CD21, которая служит рецептором на поверхности В-лимфоцитов для проникновения вирусных частиц, в эпителиоциты желудка вирус проникает иным путем. Известно, однако, что вирусный белок gHgL формирует комплекс с интегринами $\alpha\text{v}\beta 5$, $\alpha\text{v}\beta 6$ или $\alpha\text{v}\beta 8$, что приводит к слиянию вируса с клеткой хозяина [16]. Возможно, что вирус переносится в эпителиальные клетки из ВЭБ-инфицированных В-лимфоцитов слизистой оболочки желудка во время реактивации инфекции [13]. Для ВЭБ⁺-РЖ характерен моноклональный рост вирус-инфицированных клеток.

Клональность вирусного генома указывает на то, что ВЭБ-инфекция представляет собой ранний этап канцерогенеза [17]. Вероятно, первоначально одна или несколько вирус-инфицированных клеток слизистой оболочки желудка подвергается злокачественной трансформации и дает начало клональному росту эпителиоцитов. Поддержанию вирусной инфекции в опухолевых клетках способствует многофункциональный вирусный ядерный белок EBNA1. Данный белок взаимодействует с клеточным комплексом, узнающим точку начала репликации, опосредуя присоединение данного комплекса к точке старта репликации вирусной ДНК (OriP). Таким образом, ВЭБ использует системы клетки хозяина для собственного воспроизводства в S-фазу клеточного цикла [18].

Важная роль в вирусном онкогенезе при развитии ВЭБ⁺-опухолей принадлежит эпигенетической регуляции экспрессии вирусных и клеточных генов. При латентной инфекции ДНК ВЭБ, включая гены литической фазы, в значительной степени метилирована. Во время реактивации инфекции вирусный транскрипционный фактор Zta (ZEBRA, Z, BZLF1) избирательно связывается с метилированными промоторами генов литической фазы, в результате чего латентная инфекция переходит в литическую [19]. Метилирование CpG-динуклеотидов в составе промоторов генов латентной фазы имеет большое значение в поддержании латентной инфекции.

Показано, что при ВЭБ-инфекции с высокой частотой встречается метилирование не только вирусной ДНК, но и CpG-сайтов промоторных участков генов клеток хозяина [20]. Важно, что гиперметилирование при ВЭБ-инфекции носит не случайный, а закономерный характер, однако регуляторные механизмы этого процесса не изучены. Н. Abe и соавт. проанализировали профиль метилирования ДНК аденокарцином желудка и выделили 3 различных эпигенотипа опухолей: ВЭБ⁻-статус/низкое метилирование, ВЭБ⁻-статус/высокое метилирование, ВЭБ⁺-статус/высокое метилирование. ВЭБ⁻-эпигенотип с высоким метилированием отличался метилированием генов, служащих мишенью белков группы polycomb (комплекса, ремоделирующего хроматин), в отличие от подтипа ВЭБ⁺, где было зарегистрировано метилирование других генов (например, *p14*, *p16*, *E-кадгерина*) [17]. Это свидетельствует об уникальном эпигенетическом профиле ВЭБ⁺-опухолей желудка. Полагают, что эпигенетическая инактивация вирусных генов может быть обусловлена защитными механизмами клетки хозяина, цель которых подавить экспрессию генов чужеродной ДНК. По другой гипотезе сам вирус запускает метилирование. Однако в любом случае изменение паттерна метилирования может иметь и отрицательные последствия, среди которых супрессия генов латентной фазы и, как следствие, переход инфекции в активную фазу, а также сайленсинг онкосупрессорных генов [21]. Интересно, что паттерн метилирования, который ни-

когда не включает гены репарации неспаренных оснований (MRR), определяет отличие данного типа опухоли от MSI-H-ассоциированного РЖ [22].

Злокачественной трансформации эпителиоцитов при ВЭБ⁺-РЖ могут также способствовать микроРНК — малые некодирующие РНК, участвующие в регуляции экспрессии генов. МикроРНК комплементарно связываются с участками мРНК-мишени и ингибируют их трансляцию. ВЭБ кодирует собственные микроРНК, мишенями которых являются в том числе гены, ответственные за регуляцию апоптоза [23]. Кроме этого, вирусная инфекция может изменять профиль экспрессии клеточных микроРНК. В частности, снижение экспрессии клеточных микроРНК (*hsa-miR-200a* и *hsa-miR-200b*) подавляет экспрессию *E-кадгерина* в эпителиоцитах желудка, способствуя эпителиально-мезенхимальному переходу [17]. Полагают также, что вирусные микроРНК в составе экзосом могут играть значимую роль в моделировании опухолевого микроокружения при ВЭБ⁺-РЖ [24].

Молекулярные особенности рака желудка, ассоциированного с вирусом Эпштейна-Барр

Рак желудка, ассоциированный с ВЭБ, отличается характерными молекулярными особенностями. Анализ TCGA показал, что 80 % ВЭБ⁺-опухолей желудка имеют мутации *PIK3CA*, а также амплификации генов *JAK2*, *CD274 (PD-L1)* и *PDCD1LG2 (PD-L2)*. Распространены также мутации генов *ARID1A* (55 %) и *BCOR* (23 %), в то время как дефекты *TP53* не характерны для этого подтипа РЖ [9].

PIK3CA. Как отмечено выше, около 80 % случаев ВЭБ⁺-РЖ сопряжено с мутациями *PIK3CA* — гена, кодирующего компонент фосфатидилинозитол-3-киназы (PIK3). Фосфатидилинозитол-3-киназы — семейство ферментов, которые являются ключевыми компонентами сигнального пути *PI3K/Akt/mTOR*, участвующего во многих проонкогенных клеточных процессах, включая уход от апоптоза, рост и пролиферацию клеток. Амплификации гена *PIK3CA* способствуют клеточной пролиферации путем активации *PI3K/Akt/mTOR*-пути. Мутации в гене *PIK3CA* встречаются при опухолях различных локализаций, включая колоректальный рак, рак молочной железы, яичника, эндометрия. При этом мутации, как правило, локализуются в «горячих точках»: экзон 9 (E542K и E545K) и экзон 20 (H1047R) [25]. Однако для ВЭБ⁺-РЖ частота мутаций *PIK3CA* в «горячих точках» составляет лишь 28 %, мутации могут наблюдаться на всем протяжении нуклеотидной последовательности [17]. Отмечается, что появление генетических дефектов *PIK3CA* может предшествовать ВЭБ-инфекции, которая затем усиливает активацию *PI3K/Akt/mTOR*-пути. В инфицированных клетках в активации *PI3K/Akt/mTOR*-пути принимает участие вирусный белок LMP2A, а также ВЭБ-опосредованное метилирование промоторов генов-онкосупрессоров *PTEN* и *INPP4B* — ингибиторов данного сигнального пути [21, 26].

Все исследования оценки эффективности mTOR-ингибиторов не дали желаемого результата, отдельных исследований ВЭБ⁺-опухолей желудка не проводилось [27–29].

ARID1A. Ген *ARID1A* (AT-rich interactive domain 1A) кодирует компонент комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable), который регулирует структуру хроматина и экспрессию генов. Белковый продукт ARID1A обладает онкосупрессорной активностью. Мутации этого гена обнаруживаются при аденокарциноме желудка [30]. Наиболее часто встречаются миссенс- и нонсенс-мутации, приводящие к значительному снижению или прекращению синтеза белка [30]. При иммуногистохимическом исследовании 857 образцов аденокарциномы желудка, 67 из которых имели ВЭБ⁺-фенотип, было показано, что потеря экспрессии ARID1A наблюдается преимущественно в случае ВЭБ⁺ (34 %) и MLH1-негативного (29 %) РЖ [13]. При ВЭБ⁺-РЖ потеря синтеза ARID1A не коррелировала с глубиной инвазии опухоли, что свидетельствует о появлении данной мутации на ранних стадиях канцерогенеза, возможно, еще до инфицирования клеток ВЭБ. Сам вирус не влияет на уровень экспрессии ARID1A, в то время как мутация этого гена может способствовать проникновению вируса в ядро клетки и метилированию генов-мишеней [31].

BCOR. Ген *BCOR* кодирует белок, известный как корепрессор BCL6. Корепрессор BCL6 представляет собой транскрипционный фактор, избирательно связывающийся с POZ (Pox virus and Zinc finger) доменом BCL6. Данный белок необходим для формирования герминативных центров лимфоидных фолликулов и регуляции апоптоза. Мутации гена *BCOR* ассоциированы также с острым миелобластным лейкозом [32].

JAK2. Янус-киназы (Janus-kinase, JAK) — семейство белков, представляющих собой нерцепторные тирозинкиназы, участвующие в сигнальных путях некоторых цитокинов. Активированные янус-киназы фосфорилируют множество цитоплазматических белков-мишеней, в том числе транскрипционные факторы STAT (signal transducers and activators of transcription). Фосфорилированные STAT димеризуются и проникают в ядро, индуцируя транскрипцию генов, необходимых для клеточной пролиферации и дифференцировки. JAK2 является одним из представителей данного семейства белков, который опосредует сигнализацию рецепторов различных цитокинов (например, интерферонов α , β , γ , интерлейкинов (ИЛ) 6, 11, 22 и др.) и активирует транскрипционный фактор STAT3 [33]. Широко известно, что мутации *JAK2* характерны для миелопролиферативных заболеваний. Кроме этого, гиперэкспрессия данного белка ввиду амплификации гена *JAK2* является одной из молекулярных характеристик ВЭБ⁺-РЖ [8]. Значительную роль в активации *JAK2/STAT3*-пути при РЖ играет важнейший фактор патогенности *H. pylori* CagA (*H. pylori*-индуцирован-

ный цитотоксин-ассоциированный антиген). *H. pylori* доставляет CagA-протеин в мукоцит, используя IV тип бактериальной секреции. CagA-протеин, в свою очередь, индуцирует высвобождение различных цитокинов, в том числе ИЛ-11 и ИЛ-23, которые, связываясь со своими рецепторами на клетках-мишенях, активируют *JAK2/STAT3*-путь. Фосфорилированный STAT3 индуцирует транскрипцию генов-мишеней, опосредующих клеточную пролиферацию, миграцию/инвазию и ангиогенез: циклина D1, матриксной металлопротеиназы 9, CD44v6 и VEGF [34, 35].

Результаты исследования II фазы оценки эффективности молекулы BBI (ингибитора STAT3) в сравнении с плацебо у больных метастатическим РЖ свидетельствовали об отсутствии его эффекта [36].

Статус метилирования генов. Согласно анализу TCGA ВЭБ⁺-опухоли желудка характеризуются высокой частотой гиперметилирования ДНК. В частности, во всех исследуемых образцах ВЭБ⁺-опухолей желудка было отмечено гиперметилирование промотора гена *CDKN2A* (p16INK4A). Этот ген, известный как ингибитор циклинзависимой киназы 2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), кодирует онкосупрессор p16, участвующий в регуляции клеточного цикла. Белок p16 ингибирует циклинзависимые киназы 4 и 6 (CDK4 и CDK6), в результате чего другой онкосупрессор Rb блокирует переход клеточного цикла из фазы G1 в фазу S. Инактивирующие соматические мутации *CDKN2A* зарегистрированы для широкого спектра злокачественных опухолей. Для ВЭБ⁺-РЖ характерна именно эпигенетическая инактивация этого гена, наряду с такими онкосупрессорами, как p14, APC и TFAP2E [30, 31], в рамках CIMP-фенотипа (CpG island methylation phenotype) [37].

CIMP-фенотип характеризуется единовременным метилированием множественных генов и играет важную роль в карциногенезе аденокарцином ЖКТ, особенно ВЭБ⁺-РЖ и РЖ с MSI. Более того, этот процесс носит неслучайный характер. Так, оба подтипа имеют характерные отличия по профилю метилированных генов. Например, ген *MLH1* метилирован в опухолях MSI-подтипа, но интактен в ВЭБ⁺-аденокарциномах [38].

Интересно, что CIMP-статус (высокий CIMP-H, низкий CIMP-L, негативный CIMP-) коррелирует с прогнозом. Так, пациенты с CIMP-H чаще имеют относительно благоприятный прогноз, более поверхностные опухоли, диффузный гистологический подтип и раннюю стадию заболевания, чем пациенты с CIMP- -статусом [39].

CD274 (PD-L1)/PDCD1LG2 (PD-L2). Гены *CD274* и *PDCD1LG2* кодируют иммуносупрессивные молекулы PD-L1 и PD-L2 (лиганды программируемой гибели, programmed death ligands) соответственно. PD-L1 и PD-L2 представляют собой трансмембранные белки, которые экспрессируются на поверхности антигенпрезентирующих клеток. PD-L1 и PD-L2 соединяются с рецептором программируемой смерти PD-1,

находящимся на мембране Т-лимфоцита, после чего Т-лимфоцит теряет способность уничтожить опухолевую клетку. Некоторые злокачественные опухоли обладают высоким уровнем экспрессии PD-L1 и/или PD-L2, что приводит к ингибированию противоопухолевого иммунного ответа [40]. Среди 4 молекулярных подтипов РЖ с повышенной экспрессией PD-L1 и/или PD-L2 характеризуются ВЭБ⁺-опухоли [9, 41]. Повышенная экспрессия PD-L1 отмечается и в других ВЭБ⁺-опухолях [42, 43]. Известно, что у больных с высокой экспрессией PD-L1 отмечается выраженный противоопухолевый эффект на лечение моноклональными антителами к PD-1.

Методы молекулярной диагностики рака желудка, ассоциированного с вирусом Эпштейна–Барр

Таким образом, с учетом вышесказанного необходимо отметить, что к особенностям ВЭБ⁺-РЖ относят более благоприятный прогноз таких патологий, отсутствие эндемичных территорий, преимущественное выявление среди мужчин в более молодой возрастной группе, при этом такие пациенты составляют ~10 % всех больных аденокарциномами желудка. Кроме этого, такие опухоли преимущественно локализируются в проксимальных отделах желудка (кардиальный отдел, тело), характеризуются высоким содержанием CD8⁺ опухолинфильтрирующих лимфоцитов, а также повышенной экспрессией PD-L1 и PD-L2. К молекулярным особенностям ВЭБ⁺-опухолей желудка относят присутствие в клетках таких патологий мутаций *PIK3CA*, *ARID1A*, *BCOR*, интактного *TP53*, амплификацию *PD-L1* и *PD-L2*, а также *JAK2* и гиперметилирование, в том числе генов *p16*, *p14*, *APC*, *TFAP2E*.

Для обнаружения ВЭБ потенциально могут использоваться такие лабораторные методы, как гибридизация *in situ* (ISH), полимеразная цепная реакция (ПЦР), иммуноферментный анализ (ИФА), иммунофлуоресцентный анализ. Объектами исследования служат образцы резецированной опухолевой ткани и биопсийный материал (для ISH и ПЦР), образцы крови (для ПЦР), образцы плазмы крови пациентов (для ИФА). Возможные диагностические маркеры включают вирусные малые РНК EBER1 и EBER2 (для ISH); вирусные антигены EBNA1, Vam-M, VamHI-W (для ПЦР); антитела к вирусным антигенам EBNA (ядерному антигену), VCA (капсидному антигену), EA-D и EA-R (ранним антигенам) (для ИФА) [44].

Гибридизация *in situ* малых РНК ВЭБ. «Золотым стандартом» определения ВЭБ-инфицирования при РЖ является ISH малых РНК, локализованных в ядрах опухолевых клеток (EBER1/EBER2), в изучаемых образцах ткани (EBER-ISH). Это возможно благодаря тому, что вирусные малые РНК обнаруживаются в ядрах опухолевых клеток в больших количествах (10^{6–7} на клетку), в то время как здоровый эпителий желудка, как правило, имеет отрицательный статус при EBER-ISH [45].

По данным анализа 34 исследований, положительные результаты EBER-ISH были отмечены в 5–17,9 % образцах опухолевой ткани, а в контрольных группах (подлежащий здоровый эпителий, биопсийный материал от здоровых индивидуумов или пациентов с доброкачественными заболеваниями желудка) процент положительных результатов составил около 0 [44].

На сегодняшний день EBER-ISH является наиболее специфичным, хотя и менее чувствительным методом выявления ВЭБ-инфицирования при аденокарциномах желудка. К недостаткам данного метода следует отнести инвазивность и относительную сложность выполнения.

Обнаружение фрагментов ДНК ВЭБ в опухолевых тканях методом ПЦР. Целесообразность применения метода ПЦР для диагностики ВЭБ⁺-РЖ остается спорным вопросом. Результаты исследований показывают, что частота обнаружения фрагментов вирусных нуклеиновых кислот EBNA1 и VamHI-W в тканях РЖ методом ПЦР различна, но в целом выше по сравнению с таковой в подлежащих здоровых тканях [46–49].

Высокая гетерогенность результатов не позволяет судить о надежности данного метода. В настоящее время отсутствуют крупномасштабные исследования по изучению эффективности ПЦР-диагностики ВЭБ⁺-подтипа РЖ. По сравнению с ISH (EBER-ISH) ПЦР является более чувствительным, но менее специфичным методом. В некоторых исследованиях частота положительных результатов EBNA1 ПЦР достигает 80 % [46, 50].

Однако важно учитывать, что в ПЦР могут амплифицироваться вирусные ДНК не только из опухолевых клеток, но и из опухолинфильтрирующих лимфоцитов. При этом источник вирусных генов при ПЦР установить невозможно. Данная особенность является значительным ограничением метода ПЦР, так как известно, что около 90 % людей – носители латентной ВЭБ-инфекции, в результате которой лимфоциты содержат вирусные гены [51].

Таким образом, высокая частота обнаружения ДНК вируса в опухолевых тканях при использовании ПЦР может отражать степень локального воспаления и инфильтрации лимфоцитами, а не степень инфицирования вирусом опухолевых клеток. Следовательно, метод ПЦР для определения ВЭБ-статуса аденокарцином желудка следует использовать с осторожностью.

Серологические исследования. Серологическая диагностика ВЭБ-инфекции включает выявление в плазме крови иммуноглобулинов (Ig) к вирусным антигенам: ядерному EBNA, капсидному VCA и ранним антигенам EA-D/EA-R. Результаты единичных исследований показали, что значения титров антител по данным ИФА значительно варьируют как среди больных РЖ, так и среди здоровых индивидуумов [52–54].

Антитела к капсидному антигену (VCA IgG) обнаруживались чаще среди больных, чем в контрольных

группах, однако статистической значимости, как правило, эти различия не имели. В отношении других Ig были получены противоречивые данные. Тем не менее в одном исследовании показано статистически значимое увеличение серопозитивности в отношении VCA IgA и EA IgG среди пациентов с ВЭБ⁺-РЖ, в отличие от пациентов с ВЭБ⁻-РЖ [55].

Как и в случае ПЦР-диагностики ВЭБ⁺-РЖ, следует принимать во внимание крайне низкую специфичность серологического метода исследования. Необходимо учитывать, что наличие серологических маркеров ВЭБ свидетельствует также о перенесенной ранее ВЭБ-инфекции или ее реактивации. В силу высокой распространенности в популяции латентной ВЭБ-инфекции интерпретация результатов серодиагностики ВЭБ⁺-РЖ представляет собой сложную задачу.

Таким образом, антитела к ВЭБ нельзя считать специфичными диагностическими маркерами, а их применение для определения ВЭБ-статуса при РЖ остается сомнительным.

Выявление циркулирующей ДНК ВЭБ методом ПЦР. Детекция опухолевых специфических биомаркеров в периферической крови и других биологических жидкостях лежит в основе жидкостной биопсии. Данный метод представляет собой анализ нуклеиновых кислот опухолевых клеток, свободно циркулирующих в плазме крови (цДНК).

С учетом моноклонального характера роста раковых клеток при ВЭБ⁺-РЖ вирусный геном может служить надежным опухолевым биомаркером. Возможность использования цДНК ВЭБ в качестве маркера ВЭБ⁺-РЖ была показана еще в 2001 г. [56]. При этом авторы описали корреляцию цДНК ВЭБ с выявлением EBER методом флуоресцентной ISH. В исследовании K. Shoda и соавт. оценили клиническую значимость жидкостной биопсии ВЭБ⁺-РЖ [57]. Чувствительность метода составила 71,4 % (10/14), специфичность — 97,1 % (135/139). Ложноотрицательные результаты (EBER-ISH⁺/цДНК ВЭБ⁻) были зафиксированы у пациентов, размеры аденокарцином которых составляли менее 70 мм. При этом была выявлена значительная корреляция размера опухоли с количеством цДНК ВЭБ. Следовательно, более низкая чувствительность метода может быть обусловлена недостаточным количеством цДНК вируса для детекции методом ПЦР в реальном времени при малом размере опухоли.

В отличие от ПЦР-анализа на вирусную ДНК в опухолевых тканях или серологического исследования, жидкостная биопсия не выявляет латентную ВЭБ-инфекцию, так как источниками цДНК считаются опухолевые клетки, погибшие в результате некроза или апоптоза. Этот факт и объясняет высокую специфичность метода.

Важным клиническим преимуществом жидкостной биопсии является также возможность неинвазивного мониторинга эффективности терапии и опухолевой прогрессии. Действительно, после хирургического

лечения ВЭБ⁺-РЖ вирусной ДНК в плазме крови ранее цДНК-ВЭБ-положительных пациентов обнаружено не было [57]. Однако эффективность жидкостной биопсии в диагностике и мониторинге ВЭБ⁺-РЖ необходимо подтвердить в проспективных исследованиях с участием большего числа пациентов.

Прогностическое значение выявления положительного статуса вируса Эпштейна-Барр при раке желудка

На сегодняшний день активно изучается клиническое значение TCGA классификации РЖ. На основе данных TCGA В.Н. Sohn и соавт. разработали первую прогностическую модель, установив статистически значимые корреляции определенных молекулярных подтипов РЖ с показателями выживаемости пациентов, а также с эффективностью адъювантной химиотерапии [58].

Оказалось, что ВЭБ⁺-РЖ имел наилучший прогноз в отношении как безрецидивной выживаемости ($p = 0,006$), так и общей выживаемости ($p = 0,004$), в то время как наихудший прогноз был связан с генетически стабильным подтипом (GS). Остальные 2 подтипа (MSI и CIN) заняли промежуточное положение по показателям выживаемости. Кроме этого, было подтверждено, что ВЭБ⁺-РЖ встречается чаще среди мужчин (79 %) и в более молодом возрасте, чем остальные подтипы (средний возраст 53 года; $p = 0,01$).

Наибольшая эффективность адъювантной химиотерапии была отмечена в подгруппе пациентов с CIN-подтипом РЖ, в которой наблюдалось значительное увеличение безрецидивной выживаемости (относительный риск (ОР) 0,39; 95 % доверительный интервал (ДИ) 0,16–0,94; $p = 0,03$). В группе пациентов с генетически стабильным РЖ (GS), напротив, статистически значимого эффекта от адъювантной химиотерапии не выявлено (ОР 0,83; 95 % ДИ 0,36–1,89; $p = 0,65$). Оценить эффективность адъювантной химиотерапии в подгруппе ВЭБ⁺-РЖ не удалось ввиду отсутствия контрольной группы. Авторы также разработали единую модель оценки риска рецидива после лечения (integrated risk assessment model, TRS), которая была успешно использована для определения прогноза безрецидивной выживаемости (ОР 1,5; 95 % ДИ 1,2–1,9; $p = 0,001$).

О том, что ВЭБ⁺-РЖ имеет более благоприятный прогноз, чем ВЭБ⁻-опухоли, свидетельствует также международный анализ 13 крупных многоцентровых исследований, объединивший данные 4599 пациентов с аденокарциномой желудка. Большинство злокачественных опухолей было диагностировано на поздних стадиях (52 % III–IV стадии). При этом присутствие ВЭБ определяло снижение относительного риска смерти по сравнению с ВЭБ⁻-статусом на 28 % (ОР 0,72; 95 % ДИ 0,61–0,86) [59]. Медиана выживаемости пациентов с ВЭБ⁺-РЖ составила 8,5 года, в то время как среди пациентов с ВЭБ⁻-РЖ этот показатель был 5,3 года ($p = 0,0006$).

Таким образом, наряду со стадированием TNM и степенью дифференцировки опухоли ВЭБ-статус являлся важным прогностическим фактором. Стоит отметить, что, несмотря на статистически значимые корреляции ВЭБ⁺-статуса с показателями выживаемости, ретроспективный характер проводимых ранее исследований не позволяет сделать окончательный вывод о прогностической роли ВЭБ-инфекции при злокачественных новообразованиях желудка, так же как остается неизученным вопрос влияния различных схем химиотерапии на ответ ВЭБ⁺-метастатического РЖ.

Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа в терапии рака желудка, ассоциированного с вирусом Эпштейна-Барр

Применение иммунотерапии, ингибиторов рецептора PD-1, его лиганда (PD-L1) и ингибиторов CTLA-4 позволило достичь значительных успехов в лечении ряда солидных опухолей, включая меланому и рак легкого. Показано, что гиперэкспрессия PD-L1 в опухолевых клетках желудка статистически значимо коррелирует с таким неблагоприятным клиническим параметром, как большой размер опухоли, наличием отдаленных метастазов и низкой выживаемостью [60]. Иммунотерапия представляет наибольший клинический интерес для ВЭБ⁺-РЖ в связи с повышенной экспрессией PD-L1. Эффективность и безопасность анти-PD-антитела пембролизумаба в лечении рецидивирующей или метастатической PD-L1-положительной аденокарциномы желудка были изучены в клиническом исследовании I фазы KEYNOTE-012 [61]. Общая частота ответов составила 22 %, выживаемость без прогрессирования и общая выживаемость — 1,9 и 11,4 мес соответственно. В целом пембролизумаб продемонстрировал приемлемый профиль токсичности и перспективную противоопухолевую активность. Однако в рандомизированном исследовании III фазы KEYNOTE-061 не было показано значительных преимуществ пембролизумаба перед паклитакселом во 2-й линии терапии у больных распространенным РЖ или раком пищевода-желудочного перехода. При этом подгрупповой анализ показал, что пациенты со статусом по шкале ECOG 0 больше выигрывали от применения пембролизумаба (ОР 0,69), как и больные раком пищевода-желудочного перехода (ОР 0,61). Пациенты с комбинированным показателем позитивности (CPS) ≥ 5 тоже имели преимущество при использовании пембролизумаба (ОР 0,73), как и пациенты с CPS ≥ 10 (ОР 0,64). Напротив, пациенты с CPS < 1 лучше отвечали на терапию паклитакселом

(ОР 1,20) [62]. Результаты другого исследования III фазы KEYNOTE-062 продемонстрировали, что для комбинированного лечения пембролизумабом и химиотерапией (цисплатин с фторпиримидинами) в 1-й линии общая выживаемость и выживаемость без прогрессирования были сопоставимы с таковыми при применении только химиотерапии независимо от значения CPS [63]. Также не дали значимых результатов исследования по использованию анти-CTLA4- и анти-PD-L1-антител при метастатическом РЖ [64, 65].

Такие противоречивые результаты по применению чекпойнт-ингибиторов при РЖ определили необходимость поиска биомаркеров их эффективности. В недавно опубликованном проспективном исследовании II фазы впервые была показана очень высокая частота ответов на терапию пембролизумабом среди пациентов с метастатическим ВЭБ⁺-РЖ и MSI-подтипом РЖ (общая частота ответов — 100 и 85,7 % соответственно). Авторы исследования сделали вывод о том, что ВЭБ⁺-статус и высокая MSI служат дополнительными достоверными предикторами ответа на иммунотерапию наряду с высокой экспрессией PD-L1 в опухоли по данным иммуногистохимического исследования. Было предложено ввести в клиническую практику рутинное определение ВЭБ⁺-статуса в целях выявления пациентов с аденокарциномами желудка, для которых иммунотерапия была бы наиболее эффективна [66].

Заключение

Рак желудка, ассоциированный с ВЭБ, является отдельным подтипом опухолей ЖКТ. Этот подтип чаще встречается в более молодой возрастной группе, преимущественно среди мужчин. ВЭБ⁺-РЖ, как правило, включает аденокарциномы диффузного типа, локализованные в проксимальных отделах желудка, и имеет лучший прогноз среди всех 5 подтипов аденокарцином ЖКТ. Кроме характерного клинко-патологического фенотипа ВЭБ⁺-аденокарциномы желудка имеют отличительные молекулярные особенности: уникальный мутационный статус (частые мутации генов *PIK3CA*, *ARID1A* и *BCOR*, амплификации *PD-L1* и *PD-L2*) и эпигенетический профиль. Этот подтип характеризуется наибольшей иммуногенностью среди всех опухолей ЖКТ. Данные характеристики позволяют предположить, что успешным терапевтическим подходом для этого подтипа может стать иммунотерапия. Дальнейшие исследования по идентификации молекулярных характеристик ВЭБ⁺-РЖ позволят выявить потенциальные терапевтические мишени для персонализированного лечения этой патологии.

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

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359–86. DOI: 10.1002/ijc.29210.
2. Burke A.P., Yen T.S., Shekitka K.M., Sobin L.H. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein–Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 1990;3(3):377–80.
3. Shibata D., Weiss L.M. Epstein–Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1992;140(4):769–74.
4. Hoshikawa Y., Satoh Y., Murakami M. et al. Evidence of lytic infection of Epstein–Barr virus (EBV) in EBV-positive gastric carcinoma. *J Med Virol* 2002;66(3):351–9. DOI: 10.1002/jmv.2152.
5. Imai S., Koizumi S., Sugiura M. et al. Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein–Barr virus latent infection protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(19):9131–5. DOI: 10.1073/pnas.91.19.9131.
6. Fukayama M., Hayashi Y., Iwasaki Y. et al. Epstein–Barr virus-associated gastric carcinoma and Epstein–Barr virus infection of the stomach. *Lab Invest* 1994;71(1):73–81.
7. Ott G., Kirchner T., Muller-Hermelink H.K. Monoclonal Epstein–Barr virus genomes but lack of EBV-related protein expression in different types of gastric carcinoma. *Histopathology* 1994;25(4):323–9. DOI: 10.1111/j.1365-2559.1994.tb01350.x.
8. Naseem M., Barzi A., Brezden-Masley C. et al. Outlooks on Epstein–Barr virus associated gastric cancer. *Cancer Treat Rev* 2018;66:15–22. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.03.006.
9. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014;513(7517):202–9. DOI: 10.1038/nature13480.
10. Hinoue T., Bass A.J., Laird P.W. Comparative molecular analysis of gastrointestinal comparative molecular analysis of gastrointestinal adenocarcinomas. *Cancer Cell* 2018;33(4):721–35. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.03.010.
11. Akiba S., Koriyama C., Herrera-Goepfert R., Eizuru Y. Epstein–Barr virus associated gastric carcinoma: epidemiological and clinicopathological features. *Cancer Sci* 2008;99(2):195–201. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00674.x.
12. Lee J.H., Kim S.H., Han S.H. et al. Clinicopathological and molecular characteristics of Epstein–Barr virus associated gastric carcinoma: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24(3):354–65. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2009.05775.x.
13. Abe H., Maeda D., Hino R., Otake Y. ARID1A expression loss in gastric cancer: pathway-dependent roles with and without Epstein–Barr virus infection and microsatellite instability. *Virchows Arch* 2012;461(4):367–77. DOI: 10.1007/s00428-012-1303-2.
14. Koh J., Ock C.Y., Kim J.W. et al. Clinicopathologic implications of immune classification by PD-L1 expression and CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes in stage II and III gastric cancer patients. *Oncotarget* 2017;8(16):26356–67. DOI: 10.18632/oncotarget.15465.
15. Derks S., Liao X., Chiaravalli A.M. et al. Abundant PD-L1 expression in Epstein–Barr virus-infected gastric cancers. *Oncotarget* 2016;7(22):32925–32. DOI: 10.18632/oncotarget.9076.
16. Chesnokova L.S., Hutt-Fletcher L.M. Epstein–Barr virus infection mechanisms. *Chin J Cancer* 2014;33(11):545–8. DOI: 10.5732/cjc.014.10168.
17. Abe H., Kaneda A., Fukayama M. Epstein–Barr virus-associated gastric carcinoma: use of host cell machineries and somatic gene mutations. *Pathobiology* 2015;82(5):212–23. DOI: 10.1159/000434683.
18. Frappier L. Contributions of Epstein–Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) to cell immortalization and survival. *Viruses* 2012;4(9):1537–47. DOI: 10.3390/v4091537.
19. Chen C., Li D., Guo N. Regulation of cellular and viral protein expression by the Epstein–Barr virus transcriptional regulator Zta: implications for therapy of EBV associated tumors. *Cancer Biol Ther* 2009;8(11):987–95. DOI: 10.4161/cbt.8.11.8369.
20. Kang G.H., Lee S., Kim W.H. et al. Demonstrates frequent aberrant methylation of multiple genes and constitutes CpG island methylator phenotype-positive gastric carcinoma. *Am J Pathol* 2002;160(3):787–94. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64901-2.
21. Hino R., Uozaki H., Murakami N. et al. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of *PTEEN* gene in gastric carcinoma. *Cancer Res* 2009;69(7):2766–74. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3070.
22. Shinozaki-Ushiku A., Kunita A., Fukayama M. Update on Epstein–Barr virus and gastric cancer. *Int J Oncol* 2015;46(4):1421–34. DOI: 10.3892/ijo.2015.2856.
23. Shinozaki-Ushiku A., Kunita A., Isogai M. et al. Profiling of virus-encoded microRNAs in Epstein–Barr virus-associated gastric carcinoma and their roles in gastric carcinogenesis. *J Virol* 2015;89(10):5581–91. DOI: 10.1128/JVI.03639-14.
24. Gu J., Qian H., Shen L. et al. Gastric cancer exosomes trigger differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts through TGF- β /Smad pathway. *PLoS One* 2012;7(12):e52465. DOI: 10.1371/journal.pone.0052465.
25. Samuels Y., Waldman T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010;347:21–41. DOI: 10.1007/82_2010_68.
26. Yuen J.W., Chung G.T., Lun S.W. et al. Epigenetic inactivation of inositol polyphosphate 4-phosphatase B (INPP4B), a regulator of PI3K/AKT signaling pathway in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One* 2014;9(8):e105163. DOI: 10.1371/journal.pone.0105163.
27. Ohtsu A., Ajani J.A., Bai Y.X. et al. Everolimus for previously treated advanced gastric cancer: results of the randomized, double-blind, phase III GRANITE-1 study. *J Clin Oncol* 2013;31(31):3935–43. DOI: 10.1200/JCO.2012.48.3552.
28. Al-Batran S.E., Riera-Knorrenschild J., Pauligk C. et al. A randomized, doubleblind, multicenter phase III study evaluating paclitaxel with and without RAD001 in patients with gastric cancer who have progressed after therapy with a fluoropyrimidine/platinum-containing regimen (RADPAC). *J Clin Oncol* 2017;35(4_suppl):4.
29. Ramanathan R.K., McDonough S.L., Kennecke H.F. et al. Phase 2 study of MK-2206, an allosteric inhibitor of AKT, as second-line therapy for advanced gastric and gastroesophageal junction cancer: a SWOG cooperative group trial (S1005). *Cancer* 2015;121(13):2193–7. DOI: 10.1002/cncr.29363.
30. Wang K., Law S., Wang K. et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. *Nat Genet* 2011;43(12):1219–23. DOI: 10.1038/ng.982.
31. Day L., Chau C.M., Nebozhyn M. et al. Chromatin profiling of Epstein–Barr virus latency control region. *J Virol* 2007;81(12):6389–401. DOI: 10.1128/JVI.02172-06.
32. Grossmann V., Tiaci E., Holmes A.B. et al. Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood* 2011;118(23):6153–63. DOI: 10.1182/blood-2011-07-365320.
33. Yu H., Lee H., Herrmann A. et al. Revisiting STAT3 signaling in cancer: new

- and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer* 2014;14(11):736–46. DOI: 10.1038/nrc3818.
34. Kim D.Y., Cha S.T., Ahn D.H. et al. STAT3 expression in gastric cancer indicates a poor prognosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24(4):646–51. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05671.x.
 35. Han J., Zhang K., Chen X. et al. Expression of seven gastric cancer-associated genes and its relevance for Wnt, NF- κ B and Stat3 signaling. *APMIS* 2007;115(12):1331–43. DOI: 10.1111/j.1600-0643.2007.00695.x.
 36. Sonbol M.B., Bekaii-Saab T. A clinical trial protocol paper discussing the BRIGHTER study. *Future Oncol* 2018;14(10):901–6. DOI: 10.2217/fon-2017-0406.
 37. Geddert H., Zur Hausen A., Gabbert H.E., Sarbia M. EBV-infection in cardiac and non-cardiac gastric adenocarcinomas is associated with promoter methylation of p16, p14 and APC, but not hMLH1. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2010;33(3):143–9. DOI: 10.3233/ACP-CLO-2010-0540.
 38. Chang M., Uozaki H., Chong J. et al. Human cancer biology CpG island methylation status in gastric carcinoma with and without infection of Epstein–Barr virus. *Clin Cancer Res* 2006;12(10):2995–3002. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1601.
 39. dos Jacome A.A.A., de Lima E.M., Kazzi A.I. et al. Epstein–Barr virus-positive gastric cancer: a distinct molecular subtype of the disease? *Rev Soc Bras Med Trop* 2016;49(2):150–7. DOI: 10.1590/0037-8682-0270-2015.
 40. Dong H., Strome S., Salomao D. et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8(8):793–800. DOI: 10.1038/nm730.
 41. Pereira M.A., Ramos M.F., Faraj S.F. et al. Clinicopathological and prognostic features of Epstein–Barr virus infection, microsatellite instability, and PD-L1 expression in gastric cancer. *J Surg Oncol* 2018;117:829–39. DOI: 10.1002/jso.25022.
 42. Chen B.J., Chapuy B., Ouyang J. et al. PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. *Clin Cancer Res* 2013;19(13):3462–73. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0855.
 43. Green M.R., Rodig S., Juszczynski P. et al. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2012;18(6):1611–8. DOI: 10.1158/1078-0432.
 44. Chen X.Z., Chen H., Castro F.A. et al. Epstein–Barr virus infection and gastric cancer: a systematic review. *Medicine (Baltimore)* 2015;94(20):e792. DOI: 10.1097/MD.0000000000000792.
 45. Tokunaga M., Land C.E., Uemura Y. et al. Epstein–Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol* 1993;143(5):1250–4.
 46. Shukla S.K., Prasad K.N., Tripathi A. et al. Epstein–Barr virus DNA load and its association with *Helicobacter pylori* infection in gastroduodenal diseases. *Braz J Infect Dis* 2011;15(6):583–90.
 47. Martinez-Lopez J.L., Torres J., Camorlinga-Ponce M. et al. Evidence of Epstein–Barr virus association with gastric cancer and non-atrophic gastritis. *Viruses* 2014;6(1):301–18. DOI: 10.3390/v6010301.
 48. Lee M.A., Hong Y.S., Kang J.H. et al. Detection of Epstein–Barr virus by PCR and expression of LMP1, p53, CD44 in gastric cancer. *Korean J Intern Med* 2004;19(1):43–7. DOI: 10.3904/kjim.2004.19.1.43.
 49. Oda K., Koda K., Takiguchi N. et al. Original article detection of Epstein–Barr virus in gastric carcinoma cells and surrounding lymphocytes. *Gastric Cancer* 2003;6(3):173–8. DOI: 10.1007/s10120-003-0247-2.
 50. Shukla S., Prasad K., Tripathi A. et al. Expression profile of latent and lytic transcripts of Epstein–Barr virus in patients with gastroduodenal diseases: a study from northern India. *J Med Virol* 2012;84(8):1289–97. DOI: 10.1002/jmv.23322.
 51. Rowlands D.C., Ito M., Mangham D.C. et al. Epstein–Barr virus and carcinomas: rare association of the virus with gastric adenocarcinomas. *Br J Cancer* 2016;114(12):e15. DOI: 10.1038/bjc.2016.156.
 52. Kim Y., Shin A., Gwack J. et al. Epstein–Barr virus antibody level and gastric cancer risk in Korea: a nested case-control study. *Br J Cancer* 2009;101(3):526–9. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605146.
 53. Koshiol J., Qiao Y.L., Dawsey S.M. et al. Epstein–Barr virus serology and gastric cancer incidence and survival. *Br J Cancer* 2007;97(11):1567–9. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604063.
 54. Levine P.H., Stemmermann G., Lennette E.T. et al. Elevated antibody titers to Epstein–Barr virus prior to the diagnosis of Epstein–Barr-virus-associated gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1995;60(5):642–4. DOI: 10.1002/ijc.2910600513.
 55. Shinkura R., Yamamoto N., Koriyama C. et al. Epstein–Barr virus-specific antibodies in Epstein–Barr virus-positive and -negative gastric carcinoma cases in Japan. *J Med Virol* 2000;60(4):411–6. DOI: 10.1002/(sici)1096-9071(200004)60:4<411::aid-jmv8>3.0.co;2-8.
 56. Lo Y.M., Chan W.Y., Ng E.K. et al. Circulating Epstein–Barr virus DNA in the serum of patients with gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7(7):1856–9.
 57. Shoda K., Ichikawa D., Fujita Y. et al. Clinical utility of circulating cell-free Epstein–Barr virus DNA in patients with gastric cancer. *Oncotarget* 2017;8(17):28796–804. DOI: 10.18632/oncotarget.15675.
 58. Sohn B.H., Hwang J.E., Jang H.J. et al. Clinical significance of four molecular subtypes of gastric cancer identified by the cancer genome atlas project. *Clin Cancer Res* 2017. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2211.
 59. Camargo M.C., Kim W.H., Chiaravalli A.M. et al. Improved survival of gastric cancer with tumour Epstein–Barr virus positivity: an international pooled analysis. *Gut* 2014;63(2):236–43. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-304531.
 60. Qing Y., Li Q., Ren T. et al. Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer. *Drug Des Devel Ther* 2015;16(9):901–9. DOI: 10.2147/DDDT.S75152.
 61. Muro K., Bang Y.J., Shankaran V. et al. Relationship between PD-L1 expression and clinical outcomes in patients (Pts) with advanced gastric cancer treated with the anti-PD-1 monoclonal antibody pembrolizumab (Pembro; MK-3475) in KEYNOTE-012. *J Clin Oncol* 2015;33(3 suppl):3.
 62. Shitara K., Ozguroglu M., Bang Y.J. et al. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2018;392(10142):123–33. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31257-1.
 63. Tabernero J., Van Cutsem E., Bang Y.J. et al. Pembrolizumab with or without chemotherapy versus chemotherapy for advanced gastric or gastroesophageal junction (G/GEJ) adenocarcinoma: the phase III KEYNOTE-062 study. *J Clin Oncol* 2019;37(18). DOI: 10.1200/JCO.2019.37.18_suppl.LBA4007.
 64. Bang Y.J., Cho J.Y., Kim Y.H. et al. Efficacy of sequential ipilimumab monotherapy versus best supportive care for unresectable locally advanced/metastatic gastric or gastroesophageal junction cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23(19):5671–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0025.
 65. Bang Y.J., Ruiz E.Y., van Cutsem E. Phase III, randomised trial of avelumab versus physician's choice of chemotherapy as third-line treatment of patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer: primary analysis of JAVELIn Gastric 300. *Ann Oncol* 2018;29(10):2052–60. DOI: 10.1093/annonc/mdy264.
 66. Kim S.T., Cristescu R., Bass A.J. et al. Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer. *Nat Med* 2018;24(9):1449–588. DOI: 10.1038/s41591-018-0101-z.

Вклад авторов

Е.О. Игнатова: разработка дизайна публикации, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;
 Д.А. Серяк: поиск и анализ данных литературы;
 М.Ю. Федянин, А.А. Трякин: разработка дизайна рукописи;
 И.А. Покатаев, С.Ф. Меньшикова, М.С. Карбышев: обзор публикаций по теме статьи;
 Ю.В. Вахабова: обзор и анализ публикаций по теме статьи;
 К.В. Смирнова: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;
 С.А. Тюляндин: разработка дизайна публикации, редактирование текста рукописи.

Authors' contributions

E.O. Ignatova: developing the publication design, reviewing of publications of the article's theme, article writing;
 D.A. Seryak: search and analysis of literature data;
 M.Yu. Fedyanin, A.A. Tryakin: developing the publication design;
 I.A. Pokataev, S.F. Menshikova, M.S. Karbyshev: reviewing of publications of the article's theme;
 Yu.V. Vakhobova: review and analysis of publications of the article's theme;
 K.V. Smirnova: reviewing of publications of the article's theme, article writing;
 S.A. Tulyandin: developing the publication design, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.О. Игнатова / E.O. Ignatova: <https://orcid.org/0000-0002-8114-7885>
 Д.А. Серяк / D.A. Seryak: <https://orcid.org/0000-0003-3884-9256>
 М.Ю. Федянин / M.Yu. Fedyanin: <https://orcid.org/0000-0001-5615-7806>
 А.А. Трякин / A.A. Tryakin: <https://orcid.org/0000-0003-2245-214X>
 И.А. Покатаев / I.A. Pokataev: <https://orcid.org/0000-0001-9864-3837>
 Ю.В. Вахабова / Yu.V. Vakhobova: <https://orcid.org/0000-0002-2209-4410>
 М.С. Карбышев / M.S. Karbyshev: <https://orcid.org/0000-0001-5969-3874>
 К.В. Смирнова / K.V. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0001-6209-977X>
 С.А. Тюляндин / S.A. Tulyandin: <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. Исследование выполнено в рамках экспериментального государственного задания Минздрава России при координации ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА, а также поддержано грантом Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-015-00505А).

Financing. Research is conducted under the auspices of the experimental governmental assignment of the Ministry of Health of Russia and coordinated by the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical and Biological Agency, also it was financially supported by the grant of the Russian Foundation for Basic Research (project No. 18-015-00505A).

Статья поступила: 14.10.2020. **Принята к публикации:** 28.10.2020.

Article submitted: 14.10.2020. **Accepted for publication:** 28.10.2020.

Анализ генетических aberrаций в глиомах высокой степени злокачественности у детей

М.А. Зайцева¹, А.П. Шехтман¹, Л.И. Папуша¹, Э.Ф. Валиахметова^{1,2}, Л.А. Ясько¹, А.Е. Друй^{1,3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1;

²ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России; Россия, 125047 Москва, ул. 4-я Тверская-Ямская, 16;

³ГАЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»; Россия, 620026 Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22а

Контакты: Маргарита Алексеевна Зайцева astice@list.ru

Введение. Высокозлокачественные глиомы характеризуются широким спектром генетических аномалий. Различия в молекулярно-генетическом профиле позволяют выделить несколько основных подгрупп глиом высокой степени злокачественности у детей и подростков, которые различаются как по клиническому течению заболевания, его прогнозу, так и по ответу на стандартные схемы терапии.

Цель исследования — оценить профиль молекулярно-генетических маркеров глиом высокой степени злокачественности у детей.

Материалы и методы. В исследование были включены 53 образца глиом высокой степени злокачественности у детей. Были проанализированы мутации в генах H3F3A, Hist1H3B, BRAF, IDH1/2, а также аномалии числа копий генов CDKN2A/2B и экспрессия химерного гена ETV6-NTRK3.

Результаты. В 24 (45 %) из 53 проанализированных случаев выявлена драйверная мутация в ткани опухоли, в 15 (28 %) — потеря копии CDKN2A/2B, которая может выступать как второе мутационное событие. В общей сложности обнаружена 41 генетическая aberrация, из них 24 (58,5 %) составляют соматические миссенс-мутации, 1 (2,4 %) — вариант с неясным клиническим значением, 1 (2,4 %) — химерный онкоген и 15 (36,6 %) — делеции генов-онкосупрессоров.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о важности углубленного изучения генетического профиля опухоли для определения тактики ведения пациентов, а также подбора персонализированной терапии для больных злокачественными глиомами.

Ключевые слова: глиобластома, анапластическая астроцитома, анапластическая плеоморфная ксантоастроцитома, диффузная срединная глиома, H3 K28M, BRAF V600E, CDKN2A/2B, ETV6-NTRK3

Для цитирования: Зайцева М.А., Шехтман А.П., Папуша Л.И. и др. Анализ генетических aberrаций в глиомах высокой степени злокачественности у детей. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(3):37–47.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-3-37-47



Analysis of genetic aberrations in pediatric high-grade gliomas

M.A. Zaytseva¹, A.P. Shekhtman¹, L.I. Papusha¹, E.F. Valiakhmetova^{1,2}, L.A. Yasko¹, A.E. Druy^{1,3}

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., GSP-7, Moscow 117997, Russia;

²N.N. Burdenko National Medical Research Center for Neurosurgery, Ministry of Health of Russia; 16, 4th Tverskaya-Yamskaya St., Moscow 125047, Russia;

³Research Institute of Medical Cell Technologies; 22a Karla Marksa St., Yekaterinburg 620026, Russia

Background. High-grade gliomas are characterized by a wide range of genetic abnormalities. The heterogeneous genomic landscape of pediatric high-grade gliomas allows identifying distinct subgroups of the disease in children and young adults. Most importantly, these subgroups differ by clinical course and prognosis, as well as treatment response to standard therapy.

Objective: to assess the profile of molecular genetic markers of high-grade gliomas in children.

Materials and methods. In the current study, we examine the frequency of H3F3A, Hist1H3B, BRAF, IDH1/2 mutations, the copy number alterations of CDKN2A/2B genes and the expression of ETV6-NTRK3 fusion gene in a cohort of 53 pediatric high-grade gliomas.

Results. Driver mutations and CDKN2A/2B deletions were observed in 24 (45 %) and 15 (28 %) of 53 tumors, respectively. Overall, the studied high-grade gliomas harbored 41 genetic aberrations including 24 (58.5 %) somatic missense mutations, 1 (2.4 %) genetic variant of unknown clinical significance, 1 (2.4 %) oncogenic fusion gene and 15 (36.6 %) deletions of the tumor suppressor genes.

Conclusion. These findings point to the importance of molecular profiling of tumors for the optimal clinical care and development of new approaches to treatment aimed at molecular targets for personalized anticancer therapies.

Key words: glioblastoma, anaplastic astrocytoma, anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma, diffuse midline glioma, H3 K28M, BRAF V600E, CDKN2A/2B, ETV6-NTRK3

For citation: Zaytseva M.A., Shekhtman A.P., Papusha L.I. et al. Analysis of genetic aberrations in pediatric high-grade gliomas. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2020;7(3):37–47. (In Russ.).

Введение

Глиомы — самые распространенные новообразования центральной нервной системы (ЦНС). Традиционно, основываясь на данных гистологического исследования с применением рутинной окраски гематоксилином и эозином и методов иммуногистохимии, глиомы подразделяют на 4 степени злокачественности (grade). В основе определения степени злокачественности лежат следующие гистологические критерии: клеточный и ядерный полиморфизм, фигуры митозов, эндотелиальная пролиферация и области некрозов опухолевой ткани. При наличии 2 и более критериев глиальные опухоли оцениваются как высокозлокачественные (ВЗГ). К ним относятся анапластическая астроцитома (АА), анапластическая плеоморфная ксантоастроцитома (АПКА), анапластическая олигодендроглиома, анапластическая ганглиоглиома — степень злокачественности III по классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) grade III. Некроз и/или пролиферация микрососудов (ангиогенез) являются характерными особенностями глиобластом (ГБ) — опухолей IV степени злокачественности (WHO grade IV) [1].

За последние 5 лет в диагностике опухолей ЦНС произошли кардинальные изменения благодаря совершенствованию методов молекулярной биологии. В обновленной классификации опухолей ЦНС ВОЗ 2016 г. (издание 4-е, пересмотренное) впервые был реализован междисциплинарный подход в диагностике, основанный на определении не только гистологических, но и в обязательном порядке молекулярно-генетических особенностей опухоли. Определение мутационного статуса генов *IDH1*, *IDH2*, а также делеции 1p/19q стало необходимым для окончательной верификации гистологических вариантов глиом у взрослых пациентов, а определение мутации K28M в гене *H3F3A* стало обязательным для исключения диффузной срединной глиомы у детей, характеризующейся крайне агрессивным клиническим течением и неблагоприятным прогнозом [1]. Более того, после публикации классификации опухолей ЦНС ВОЗ 2016 г. была продемонстрирована диагностическая и прогностическая ценность многих других молекулярно-генетических аномалий, выявление которых в настоящее время активно применяется в рутинной практике и является неотъемлемым этапом окончательной постановки диагноза, а также определения тактики лечения пациентов с учетом генетического профиля опухоли [2–5].

Принимая во внимание, что глиальные опухоли характеризуются высокой гетерогенностью по своему клеточному составу, не вызывает сомнений, что выявление молекулярно-генетических маркеров позволит существенно улучшить качество дифференциальной диагностики фенотипически схожих гистологических вариантов глиом, а также позволит использовать идентифицированные генетические варианты в качестве прогностических биомаркеров и терапевтических мишеней.

Цель исследования — оценить профиль молекулярно-генетических маркеров ВЗГ у детей.

Материалы и методы

В ретроспективно-проспективное исследование были включены 53 пациента в возрасте от 4 мес до 21 года (медиана возраста 10 лет) с глиальными опухолями grade III–IV. Клинический диагноз у всех пациентов был подтвержден результатами гистологического исследования в патологоанатомическом отделении Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева в период с 2013 по 2020 г. Законные представители пациентов предоставили информированное согласие на использование результатов исследований в научных целях.

В общей структуре исследованного материала ВЗГ большую часть наблюдений составили гистологически верифицированные ГБ ($n = 35$; 66 %), среди них 8 (15 %) случаев — гигантоклеточные ГБ. Меньшее количество наблюдений составили АА ($n = 9$; 17 %) и АПКА ($n = 7$; 13 %). В 2 (4 %) случаях ввиду малого количества диагностически значимого материала гистологический вариант злокачественной глиомы не был дифференцирован.

В серии наших наблюдений ВЗГ имели преимущественно полушарное расположение ($n = 27$; 51 %), 1 из них с вовлечением подкорковых структур. Опухоли срединной локализации составили 22 (42 %) наблюдения, среди них 12 (23 %) — опухоли таламуса, 4 (7 %) — опухоли ствола головного мозга, 3 (6 %) — опухоли мозжечка и 3 (6 %) — опухоли спинного мозга. У 4 (7 %) пациентов данные о локализации опухоли неизвестны. Соотношение девочек и мальчиков составило 1:1,5 (21 и 32 пациента соответственно).

Молекулярно-генетическое исследование ткани опухоли включало определение наиболее характерных генетических aberrаций для ВЗГ у детей: мутаций в генах *H3F3A* (COSM327928, COSM327929), *Hist1H3B* (COSM829202), *BRAF* (COSM476), *IDH1* (COSM28746, COSM28747), *IDH2* (COSM33733) аномалий числа копий (делеций) генов *CDKN2A/2B* и экспрессии химерного гена *ETV6-NTRK3* (COSF571) [6].

Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы опухолевой ткани, фиксированные в формалине и залитые в парафиновые блоки. Для выделения РНК и ДНК использовали коммерческий набор FFPE RNA/DNA Purification Plus (Norgen Biotek, Канада) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Концентрацию выделенных РНК и ДНК оценивали с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ мутаций в генах *H3F3A* и *Hist1H3B* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим двусторонним секвенированием продуктов амплификации на генетическом анализаторе ABI 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Полученные данные интерпретировали с использованием программного обеспечения Variant Reporter v2.0 (Applied Biosystems, США) и Sequencing Analysis v6.0 (Applied Biosystems, США). Для количественной оценки частоты мутантного аллеля *H3 K28M* проводили цифровую капельную ПЦР с применением системы QX200 Droplet Digital PCR (Bio-Rad, США). Анализ и интерпретацию результатов осуществляли с помощью программного обеспечения QuantaSoft Version 1.6.6.0320 (Bio-Rad, США).

Определение соматических мутаций в экзоне 4 *IDH1* (R132C и R132H), экзоне 4 *IDH2* (R172M и R172K), экзоне 15 *BRAF* (V600E), а также анализ числа копий генов *CDKN2A/2B* выполняли методом множественной лигазно-зависимой амплификации зондов (MLPA). Для пробоподготовки использовали набор реагентов SALSA MLPA probemix P370-A1 *BRAF-IDH1-IDH2* (MRC-Holland, Нидерланды). Количественный анализ результатов проводили с применением программного обеспечения Coffalyser.Net (MRC-Holland, Нидерланды). Все выявленные нуклеотидные замены были подтверждены референтным методом — секвенированием по Сэнгеру.

Определение экспрессии химерного гена *ETV6* (экзон 5) — *NTRK3* (экзон 15) выполняли методом ПЦР с обратной транскрипцией с последующей верификацией ПЦР-продуктов секвенированием по Сэн-

геру. Для исключения ложноотрицательных результатов одновременно с выявлением химерного транскрипта проводилось определение экспрессии референсного гена *ABL*, что служило контролем сохранности выделенной РНК.

Статистическую обработку результатов исследований осуществляли с использованием программы XLStat. Различия качественных параметров между исследуемыми группами пациентов были проанализированы с помощью непараметрического критерия χ^2 , количественных параметров — Манна–Уитни.

Результаты

Определение мутационного статуса гена *H3F3A* было выполнено всем 53 пациентам. При секвенировании по Сэнгеру экзона 2 гена *H3F3A* выявлены 2 патогенных генетических варианта: с.83A>T, р.(K28M) — у 15 (28 %) пациентов и с.103G>A, р.(G35R) — у 4 (8 %), а также вариант с.95C>A, р.(S32Y) с неясным клиническим значением — у 1 (2 %) пациента. В качестве референса использовали транскрипт ENST00000366815.9, версия генома GRCh38.p13. Количественную оценку частоты мутантного аллеля *H3 K28M* выполняли 14 пациентам, результаты представлены на рис. 1 и в таблице.

Пациентам с «диким» типом гена *H3F3A* и срединной локализацией опухоли (таламус, ствол головного

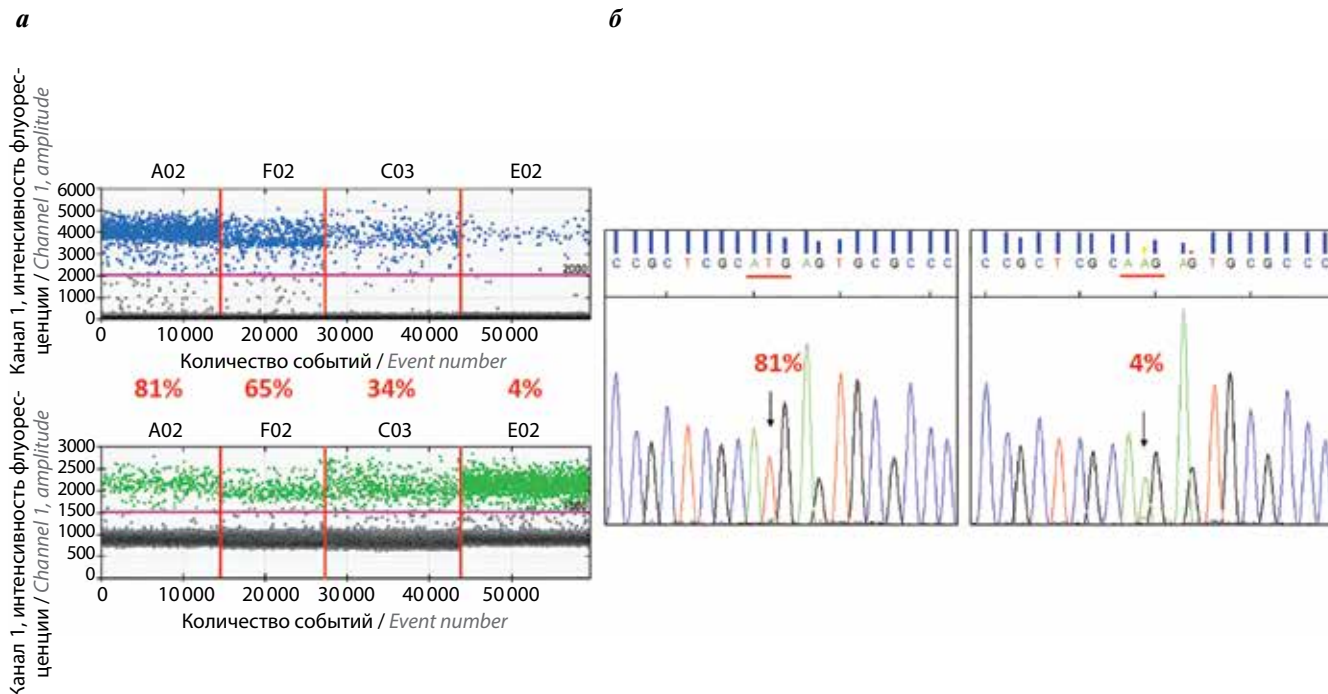


Рис. 1. Результаты оценки частоты мутантного аллеля *H3 K28M*: а — определение частоты мутантного аллеля *H3 K28M* методом цифровой капельной полимеразной цепной реакции. Канал 1 (FAM) — детекция мутантного аллеля, канал 2 (HEX) — детекция аллеля «дикого» типа. Розовой линией обозначен пороговый уровень интенсивности флуоресценции, выше которого капли расценивались как позитивные (HEX: 1500, FAM: 2000); б — секвенирование по Сэнгеру образцов с высокой (81 %) и низкой (4 %) частотой мутантного аллеля *H3 K28M*, стрелкой обозначена исследуемая нуклеотидная замена *H3F3A*:с.83A>T

Fig. 1. The results of assessing allele frequency of *H3 K28M*: а — the variant allele frequency of *H3 K28M* detection using digital droplet polymerase chain reaction assays. Channel 1 (FAM) — *H3F3A K28M*, channel 2 (HEX) — wild-type *H3F3A*. The pink line shows the threshold (HEX: 1500, FAM: 2000); б — Sanger sequencing in the cases with high (81 %) and low (4 %) *H3 K28M* variant allele frequency, the arrow indicates the location of the nucleotide substitution *H3F3A*:с.83A>T

Клинико-морфологические особенности злокачественных глиом с мутацией H3 K28M

Clinicopathologic features of high-grade gliomas with histone H3 K28M mutation

Номер Case number	Возраст пациента, лет Age at onset, years	Пол Sex	Локализация опухоли Tumor location	Частота мутант- ного аллеля H3 K28M, % Variant allele frequency (VAF) of H3 K28M, %	Пролиферативная активность по Ki-67, % Ki-67 proliferation index, %
1	10	Мужской Male	Ствол головного мозга и IV желудочек Brainstem and IV ventricle	Нет данных No data	Нет данных No data
2	15	Мужской Male	Левый таламус Left thalamus	53,2	60
3	17	Мужской Male	Теменно-затылочная область левого полушария Parieto-occipital region of the left cerebral hemisphere	4,0	15–20
4	13	Женский Female	Правый боковой желудочек с распростра- нением на область правого таламуса, правую ножку мозга и четверохолмие Right lateral ventricle with the extension to the right thalamus, right cerebral peduncle and corpora quadrigemina	56,2	20
5	2	Женский Female	Левое полушарие мозжечка Left cerebellar hemisphere	55,6	20–30
6	16	Мужской Male	Левый таламус и ножки мозга слева Left thalamus and left cerebral peduncles	33,9	10–15, фокально до 20 10–15, focally up to 20
7	9	Мужской Male	Правый таламус с распространением в ствол головного мозга Right thalamus with the extension to the brainstem	80,9	15–20, фокально до 25–30 15–20, focally up to 25–30
8	7	Мужской Male	Правое полушарие с распространением в боковой и III желудочки, правый таламус и средний мозг Right hemisphere with the extension to the lateral and III ventricles, right thalamus and midbrain	64,4	30
9	18	Женский Female	Правый зрительный бугор и средний мозг Right thalamus and midbrain	50,3	30
10	4	Мужской Male	Спинной мозг на уровне C4–C7 Spinal cord at C4–C7 level	64,6	15
11	14	Мужской Male	Спинной мозг на уровне C4–Th3 Spinal cord at C4–Th3 level	35,3	20
12	5	Мужской Male	Ствол головного мозга Brainstem	45,0	30
13	11	Женский Female	Левый таламус и ножки мозга слева Left thalamus and left cerebral peduncles	56,1	20
14	16	Мужской Male	Правый таламус и ножки мозга справа Right thalamus and right cerebral peduncles	44,2	40
15	11	Женский Female	Левый таламус и средний мозг Left thalamus and midbrain	44,8	15

мозга, спинной мозг) был проведен анализ мутаций в гене *Hist1H3B* ($n = 9$). Мутация *Hist1H3B* K28M не обнаружена ни в одном из исследуемых образцов ВЗГ.

Далее образцы были проанализированы на предмет более редких генетических aberrаций. При исследовании методом MLPA у 1 пациента обнаружена

замена с.394C>T, p.(R132C) в гене *IDH1*, у 4 – мутация *BRAF* с.1799T>A, p.(V600E). Мутаций в гене *IDH2* (R172M и R172K) в исследуемой когорте пациентов не выявлено. Делеция локуса 9p21.3, затрагивающая *CDKN2A/2B*, обнаружена в 15 (43 %) из 35 образцов: в 4 случаях – гомозиготная и в 11 случаях –

гетерозиготная. В 6 (40 %) из 15 образцов ген *MIR31*, расположенный в регионе 9p13, также был вовлечен в делецию.

Определение химерного транскрипта *ETV6-NTRK3* было выполнено пациентам в возрасте 0–7 лет ($n = 14$). Экспрессия химерного гена в ткани опухоли обнаружена только у 1 пациентки. На рис. 2 представлена электрофореграмма продуктов амплификации детектируемого химерного транскрипта *ETV6-NTRK3* и фрагмента гена *ABL*, а также результат верификации выявленного транскрипта путем секвенирования по Сэнгеру.

На рис. 3 показаны обнаруженные генетические aberrации в когорте пациентов с ВЗГ.

Обсуждение

При интерпретации результатов секвенирования гена *H3F3A* могут возникать трудности, поскольку в зависимости от используемой номенклатуры можно встретить разные обозначения мутаций: *H3* K27M и *H3* G34R/V или *H3* K28M и *H3* G35R/V. Данные

разногласия связаны с устоявшейся номенклатурой сайтов модификации гистонов в контексте эпигенетической регуляции экспрессии генов. Однако при уточнении первичной структуры гистонов было обнаружено, что после трансляции полипептидная цепь H3, как и многие другие полипептиды, подвергается пост-трансляционной модификации (процессингу) для приобретения функциональной активности – отщеплению N-концевого остатка метионина. Поскольку в составляющих нуклеосомную глобулу молекулах гистонов отсутствует метионин, то в общеизвестной номенклатуре гистонов при нумерации аминокислот не учитывается удаленный аминокислотный остаток метионина. Несмотря на то что в научной литературе чаще встречаются обозначения генетических вариантов *H3F3A* по общепринятой номенклатуре гистонов, в данном исследовании все варианты нуклеотидной последовательности *H3F3A* названы в соответствии с номенклатурой, принятой HGVS (Human Genome Variation Society; <http://www.hgvs.org>), во избежание ошибочной интерпретации сообщаемых данных

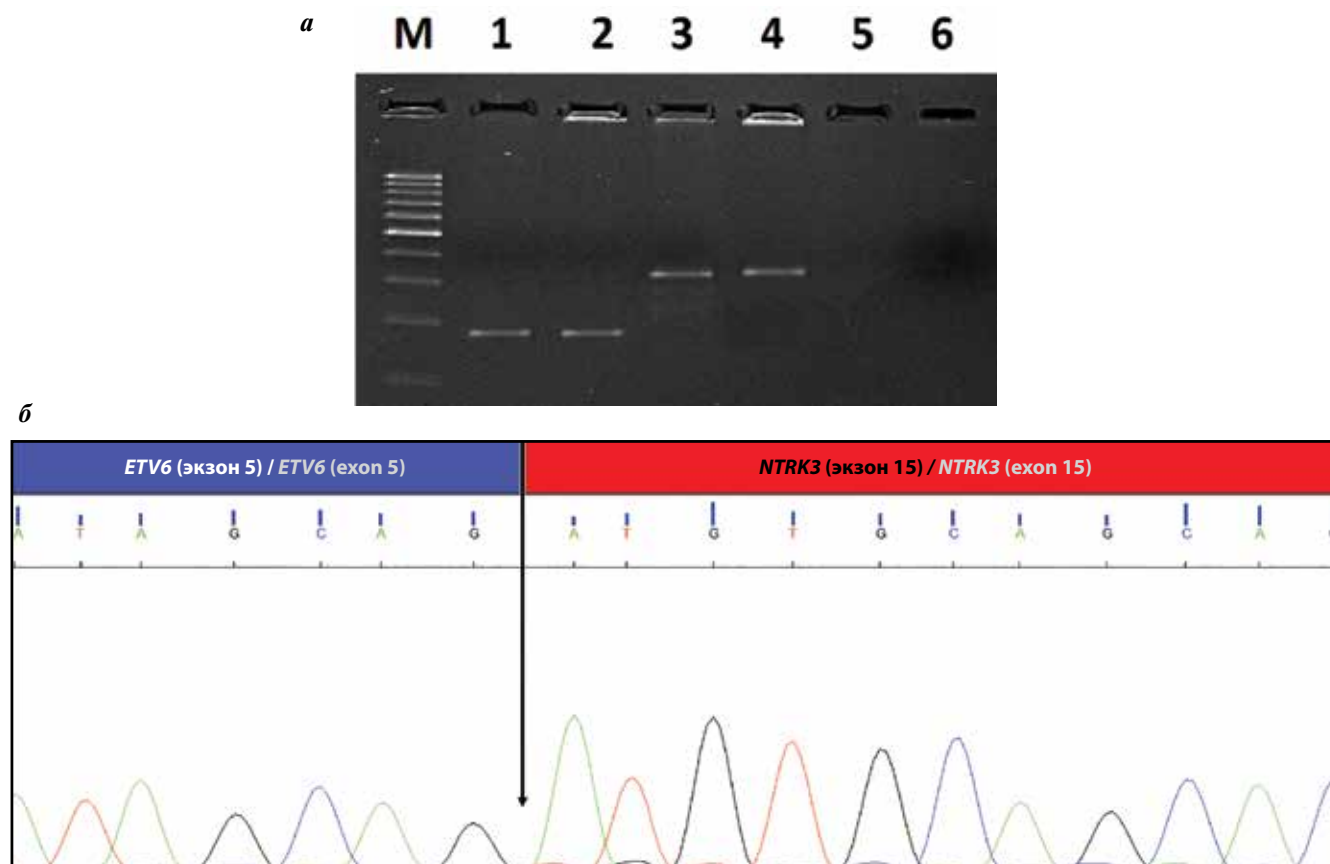


Рис. 2. Результат определения химерного транскрипта *ETV6-NTRK3*: а – электрофореграмма продуктов амплификации (М – маркер молекулярной массы; 1, 2 – фрагмент химерного транскрипта *ETV6-NTRK3* (188 пар оснований); 3, 4 – фрагмент референсного гена *ABL*; 5, 6 – отрицательный контроль реакции); б – фрагмент хроматограммы *ETV6* (экзон 5) – *NTRK3* (экзон 15) с указанием точки разрыва. В качестве референсных транскриптов для генов *ETV6* и *NTRK3* использованы ENST00000396373.9 и ENST00000360948.6 соответственно, версия генома GRCh38.p13

Fig. 2. Results of the fusion transcript *ETV6-NTRK3* detection: а – gel electropherogram of RT-PCR products (M – DNA Ladder; 1, 2 – fragment of *ETV6-NTRK3* fusion transcript (188 base pairs); 3, 4 – fragment of *ABL* housekeeping gene transcript; 5, 6 – negative amplification control); б – sequence chromatogram of *ETV6* (exon 5) – *NTRK3* (exon 15) fusion transcript, with the arrow indicating the fusion breakpoint. ENST00000396373.9 and ENST00000360948.6 transcripts were used as reference sequences for *ETV6* and *NTRK3* genes respectively, genome build GRCh38.p13

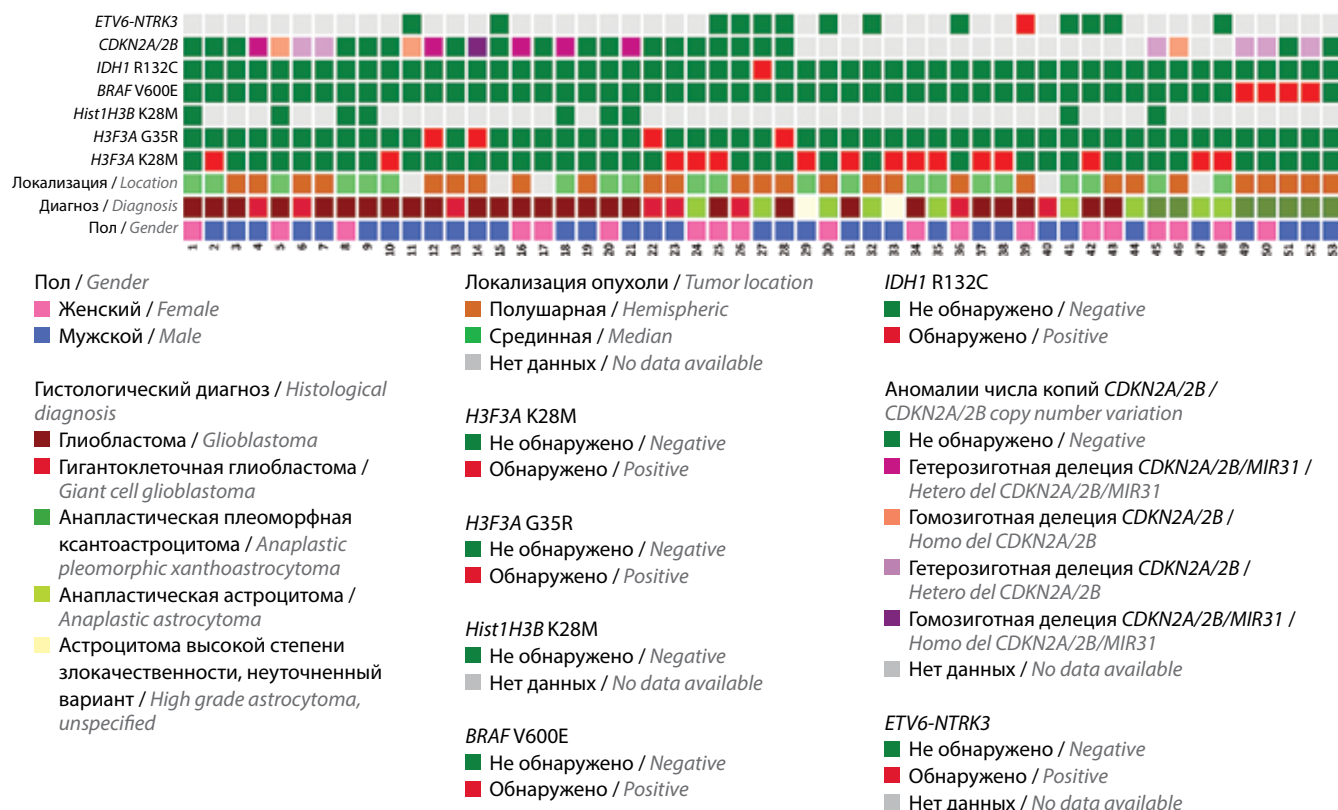


Рис. 3. Графическое представление клинических данных и генетических aberrаций в исследуемой когорте пациентов с высокозлокачественными глиомами

Fig. 3. Graphical representation of the clinical data and of the genetic alterations observed in the cohort of pediatric high-grade gliomas

и диагностических неточностей. Тем не менее стоит иметь в виду, что обозначения *H3F3A*: с.83A>T, р.(K28M) и *H3F3A*: с.103G>A, р.(G35R) эквивалентны общеизвестным *H3* K27M и *H3* G34R [7].

В данном исследовании было проанализировано 53 образца ВЗГ у детей. В 24 (45 %) из них выявлена драйверная мутация в ткани опухоли. Все выявленные мутации были взаимоисключающими — сочетаний мутаций в генах *H3F3A*, *IDH1/2*, *BRAF* не обнаружено. В соответствии с наличием или отсутствием драйверных мутаций в выбранных генах-кандидатах и экспрессии химерного гена *ETV6-NTRK3* все глиомы у детей и подростков можно разделить на 6 основных подгрупп: *H3* K28-мутантный тип, *H3* G35-мутантный тип, *IDH1/2*-мутантный тип, *BRAF*-мутантный тип, с наличием перестроек *NTRK* и *H3/BRAF/IDH*-«дикий» тип. Наиболее распространенными соматическими мутациями в ВЗГ у детей оказались мутации в гене *H3F3A*.

В серии наших наблюдений мутации *H3F3A* были обнаружены в 19 (36 %) из 53 образцов: вариант K28M выявлен в 15 (28 %) случаях, вариант G35R – в 4 (8 %), вариант G35V не обнаружен. Из 15 глиом с *H3* K28M в 8 (53 %) случаях был выставлен гистологический диагноз ГБ, в 1 (7 %) – гигантоклеточная ГБ, в 4 (27 %) – АА, в 2 (13 %) случаях гистологический вариант ВЗГ не был дифференциально диагностирован. Мутация *H3* K28M обнаружена в глиомах средней линии

в 13 (59 %) из 22 образцов: 8 (67 %) из 12 глиом таламуса, 2 (50 %) из 4 глиом ствола головного мозга, 2 (67 %) из 3 глиом спинного мозга, а также 1 (33 %) из 3 глиом мозжечка. В 1 случае опухоль имела диффузное распространение из правого полушария головного мозга в боковой и III желудочек, правый таламус, средний мозг. В классификации опухолей ЦНС ВОЗ 2016 г. для обозначения подобных опухолей введена новая нозологическая единица «диффузная срединная глиома с мутацией *H3* K28M, WHO grade IV» [1].

Однако у 1 пациента с полушарной гигантоклеточной ГБ также выявлена мутация *H3F3A* K28M. Стоит отметить, что в данном случае частота мутантного аллеля составила 4 %, т.е. соответствовала субклональной. Данный факт указывает на внутриопухольную гетерогенность и ставит под сомнение драйверный характер замены *H3* K28M и ее прогностическое значение. На момент сбора катamnестических данных пациент закончил локальную лучевую терапию с параллельной химиотерапией темозоломидом и вальпроевой кислотой по протоколу HIT HGG 2007 и жив без признаков прогрессирования заболевания спустя 20 мес от постановки диагноза.

У пациента 4 лет с АА спинного мозга в гене *H3F3A* были обнаружены 2 генетических варианта: 1) патогенный вариант с.83A>T, р.(K28M) с частотой мутантного аллеля 64,6 %; 2) гетерозиготная однонуклеотидная замена с.95C>A в экзоне 2 с частотой альтернативного

аллеля ~65 %, приводящая к замене аминокислоты p.(S32Y). Вариант *H3* S32Y не зарегистрирован в базе данных аллельных вариантов человека The Genome Aggregation Database (gnomAD) и базе данных Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). Для оценки возможного влияния замены аминокислоты на структуру и функцию белка были применены компьютерные (*in silico*) программы предсказаний патогенности. По данным предсказательных ресурсов MutationTaster, Mutation assessor, SIFT и PROVEAN, замена считается патогенной. Более того, найденный генетический вариант располагается в высококонсервативном участке ДНК, а аминокислота в позиции 32 является уникальным сайтом фосфорилирования гистона H3.3, отличающим его от других вариантов гистона H3, что также свидетельствует в пользу его патогенности. В исследовании F.N. Grigore и соавт. показано, что замены K28M, S32E, G35R/V инициируют онкогенез через хромосомную нестабильность, обусловленную нарушением регуляции клеточного цикла и приводящую к анеупloidии. На клеточной линии диффузной срединной глиомы авторы продемонстрировали, что аномальная сегрегация хромосом обусловлена снижением метилирования лизина H3K28 и влечет за собой нарушение фосфорилирования серина H3S32. В то же время клеточные линии с сочетанными мутациями (K28M/S32E или G35R/S32E) проходят контрольные точки клеточного цикла и завершают цикл деления без каких-либо нарушений. Таким образом, нуклеотидная замена в сайте фосфорилирования может нивелировать потерю метилирования H3K28 и восстанавливать эпигенетическую регуляцию активности генов, ответственных за прохождение клетки по тому или иному периоду клеточного цикла [8]. Спустя год от постановки диагноза описываемый пациент жив и продолжает терапию.

По последним данным, срединные глиомы с аллельной нагрузкой *H3* K28M, превышающей 50 %, характеризуются наиболее агрессивным фенотипом [9]. Наличие соматического генетического варианта с частотой мутантного аллеля >50 % обусловлено аллельным дисбалансом области расположения гена *H3F3A* (локус 1q42.12). В исследовании S. Maeda и соавт. в 27 % диффузных срединных глиом аллельная нагрузка *H3* K28M превышала 50 %, что было связано с увеличением числа копий мутантного аллеля, потерей интактного аллеля и потерей гетерозиготности 1q. Наличие аллельного дисбаланса локуса 1q42.12 было ассоциировано с высоким индексом пролиферации Ki-67, а также с низкими показателями выживаемости пациентов ($p < 0,05$) [9]. Таким образом, принципиально важно определять не только наличие мутации *H3* K28M, но и оценивать частоту альтернативного аллеля.

Мы провели количественную оценку частоты мутантного аллеля *H3* K28M в опухолевой ДНК, в 8 (57 %) из 14 случаев она превышала 50 % (см. таблицу). При сравнении пролиферативной активности опухолевых

клеток в группах пациентов с частотой мутантного аллеля *H3* K28M >50 и ≤50 % статистически значимых различий не получено ($p > 0,05$).

Мутация G35R в гене *H3F3A* выявлена в 4 (15 %) из 26 полушарных ВЗГ, а именно в ГБ лобной доли, ГБ височной доли и в 2 ГБ с сочетанным поражением долей (лобно-теменной и теменно-височно-затылочной).

Полученные нами данные о преобладании мутаций *H3F3A* в ВЗГ у детей соответствуют результатам ранее опубликованных исследований. D.A. Solomon и соавт., проведя иммуногистохимическое исследование, выявили наличие *H3* K28M в 17 (94 %) из 18 диффузных глиом ствола, в 15 (65 %) из 23 глиом зрительного бугра и в 9 (53 %) из 17 глиом спинного мозга [10]. По данным A. Johnson и соавт., в серии из 90 ГБ аберрации *H3F3A* наблюдались в 43 (48 %) случаях, из них *H3* K28M — в 35 (81 %), *H3* G35R — в 8 (19 %) [2]. Кроме того, в исследованиях, посвященных изучению молекулярно-генетического профиля ВЗГ, подчеркивается, что для замен K28M и G35R/V характерна корреляция с локализацией опухоли [2, 3]. В глиомах срединных структур выявляется мутация *H3* K28M, в глиомах полушарной локализации — *H3* G35R/V. Данная особенность подтверждена и в серии наших наблюдений.

Аберрантная активация сигнального пути MAPK/ERK является наиболее частым событием в патогенезе глиом низкой степени злокачественности. Тем не менее в 5–10 % ВЗГ, преимущественно АПКА и эпителиоидных ГБ, также встречается активирующая мутация *BRAF* V600E [2]. Среди исследуемых нами пациентов с ВЗГ данная мутация обнаружена только у пациентов с АПКА, а именно в 4 (57 %) из 7 проанализированных случаев.

Отличительная особенность генетического профиля АПКА — аберрантная активация генов семейства *RAF* (*BRAF*, *RAF1*) в сочетании с биаллельной инактивацией гена-супрессора опухолевого роста *CDKN2A*. По данным J.J. Phillips и соавт., с частотой до 90 % в АПКА наблюдаются мутации в гене *BRAF*, безусловно, наиболее распространенная из них *BRAF* V600E [11]. Описан случай АПКА с редким генетическим вариантом — *BRAF* p.(485_490del), также приводящим к конститутивной активации сигнального пути MAPK/ERK. Помимо точечных мутаций *BRAF* в геноме АПКА могут присутствовать структурные перестройки, приводящие к образованию химерных генов *NRF1-BRAF* и *ATG7-RAF1* [11, 12]. Данные генетические aberrации являются идеальной мишенью для таргетной терапии пациентов с ВЗГ [5, 13].

По данным R.A. Vaubel и соавт., гомозиготная делеция *CDKN2A/2B* наблюдается в 93 % случаев АПКА. Согласно приведенным данным потеря *CDKN2A/2B* выявлялась в сочетании с другими aberrациями хромосомы 9 — с утратой всей хромосомы, делециями короткого плеча, а также с потерей гетерозиготности 9p, не сопровождающейся изменениями числа

копий [12]. Значительно реже в АПКА наблюдается гетерозиготная делеция *CDKN2A*, однако при проведении иммуногистохимического окрашивания с антителом к белковому продукту *CDKN2A* (p16^{INK4a}) выявляется полная утрата экспрессии маркера, что указывает на биаллельную инактивацию гена альтернативным механизмом (например, за счет гиперметилирования промоторной области) [11]. В исследуемой нами когорте в 4 (57 %) из 7 АПКА наблюдалась гетерозиготная делеция *CDKN2A*, в 1 (14 %) из 7 — гомозиготная, в 3 образцах она сочеталась с мутацией *BRAF* V600E.

С высокой частотой делеция *CDKN2A* встречается и при других гистологических вариантах ВЗГ у детей. L. Frazão и соавт. выявили делецию *CDKN2A/2B* в 6 (35,3 %) из 17 ВЗГ разных гистологических вариантов (ГБ, АА и других более редких нозологических форм): в 4 случаях — гомозиготную и в 2 — гетерозиготную. Наличие делеции было ассоциировано с худшей общей и бессобытийной выживаемостью пациентов [14]. A. Johnson и соавт. выявили делеции *CDKN2A* и *CDKN2B* соответственно в 18 (20 %) и 14 (16 %) из 90 ГБ у детей [2]. В исследуемой нами группе пациентов делеция *CDKN2A/2B* обнаружена в 15 из 35 (43 %) образцов: в 4 случаях — гомозиготная и в 11 — гетерозиготная. При этом в 2 образцах ГБ она сочеталась с мутацией *H3F3A* G35R. В 6 (40 %) из 15 наблюдений ген *MIR31*, расположенный в регионе 9p13, также был вовлечен в делецию. По данным R. Rajbhandari и соавт., экспрессия miR-31 снижена в >70 % ГБ и ассоциирована с худшими показателями общей выживаемости независимо от количества копий *CDKN2A/2B* [15].

Наиболее изученными прогностическими маркерами глиом у взрослых являются мутации в генах *IDH1* и *IDH2*. С частотой до 80 % в астроцитомах, олигодендроглиомах и вторичных ГБ обнаруживается мутация в кодоне 132 гена *IDH1*. Однако в ВЗГ у детей мутации *IDH1* и *IDH2* наблюдаются в редких случаях. В исследовании Детской онкологической группы США (Children's Oncology Group, COG) частота встречаемости мутаций *IDH1* в ВЗГ у детей составила 16 %, при этом чаще наблюдалась замена R132H, реже — R132S и R132C. Согласно приведенным данным мутации *IDH1* чаще встречались у детей с АА, чем с ГБ (26 и 8 % соответственно). Все мутации *IDH1* были обнаружены у детей старше 14 лет, в то время как в младшей возрастной группе данных мутаций не выявлено. Наличие мутации *IDH1* имело благоприятное влияние на 1-годовалую безрецидивную выживаемость и общую годовую выживаемость [16]. A. M. Buccoliero и соавт., исследовав серию из 42 глиом различных гистологических типов и степеней злокачественности у детей, не обнаружили мутаций *IDH1* [17]. В исследовании M. Antonelli и соавт. в когорте из 27 ВЗГ мутаций гена *IDH1* также не выявлено [18]. Вероятно, полученные данные связаны с малым возрастом детей в исследуемых группах (медиана возраста 6 и 9 лет соответственно).

В исследуемой нами когорте пациентов замена с.394C>T, p.(R132C) в гене *IDH1* обнаружена только у 1 пациента 17 лет с гистологически верифицированной АА лобной доли. Полученный результат подтверждает низкую частоту встречаемости мутаций *IDH1* в глиомах у детей, а также данные о старшем подростковом возрасте пациентов с ВЗГ, имеющих мутацию *IDH1* [16–18].

A. S. Guerreiro Stucklin и соавт. представили данные о парадоксальном клиническом поведении глиом у младенцев до 1 года в сравнении с детьми старшего возраста: наибольшая выживаемость была отмечена в группе пациентов с ВЗГ, в то время как пациенты с глиомами низкой степени злокачественности имели более высокий уровень смертности. Причины таких отличий в течении заболевания свидетельствуют об уникальной биологии глиом у младенцев. В 83 % полушарных ВЗГ были обнаружены транслокации *ALK*, *ROS1*, *NTRK1/2/3*, *MET*. В 2 из 7 *NTRK*-положительных ВЗГ наблюдалось посттерапевтическое созревание опухоли в более дифференцированный вариант [19].

Среди больных, включенных в исследуемую нами группу, была пациентка с полушарной ВЗГ в возрасте 4 мес на момент постановки диагноза. Ткань опухоли имела гистологическое строение ВЗГ и в большей степени соответствовала ГБ. Ввиду отсутствия специфической гистологической картины дифференциальная диагностика проводилась с АПКА и анапластическим вариантом пилоцитарной астроцитомы. После проведения 4 блоков химиотерапии в составе комбинации винкристина с циклофосфаном (блоки 1, 3) и этопозида с карбоплатином (блоки 2, 4) была выполнена повторная резекция опухоли. При гистологическом исследовании материала от повторной операции и его сопоставлении с инициальным материалом было подтверждено идентичное морфологическое строение опухоли (рис. 4).

При проведении молекулярно-генетического исследования был выявлен химерный транскрипт *ETV6* (экзон 5) — *NTRK3* (экзон 15). Данный вариант транскрипта обнаруживают у подавляющего большинства пациентов с инфантильной фибросаркомой и мезобластной нефромой клеточного типа, у пациентов с ВЗГ он встречается значительно реже. Стоит отметить, что в зависимости от локализации точки разрыва могут возникать различные типы химерного гена *ETV6-NTRK3*. Вариант химерного транскрипта *ETV6* (экзон 4) — *NTRK3* (экзон 14) у детей с ВЗГ встречается заметно чаще [3, 4, 19].

С учетом того, что опухоли в детском возрасте отличаются малым совокупным количеством мутаций, в том числе являющихся мишенями для таргетной терапии, обнаружение подгруппы ВЗГ с перестройками генов, кодирующих протеинкиназы, открывает перспективы для использования соответствующих ингибиторов. Управление по санитарному надзору за качеством

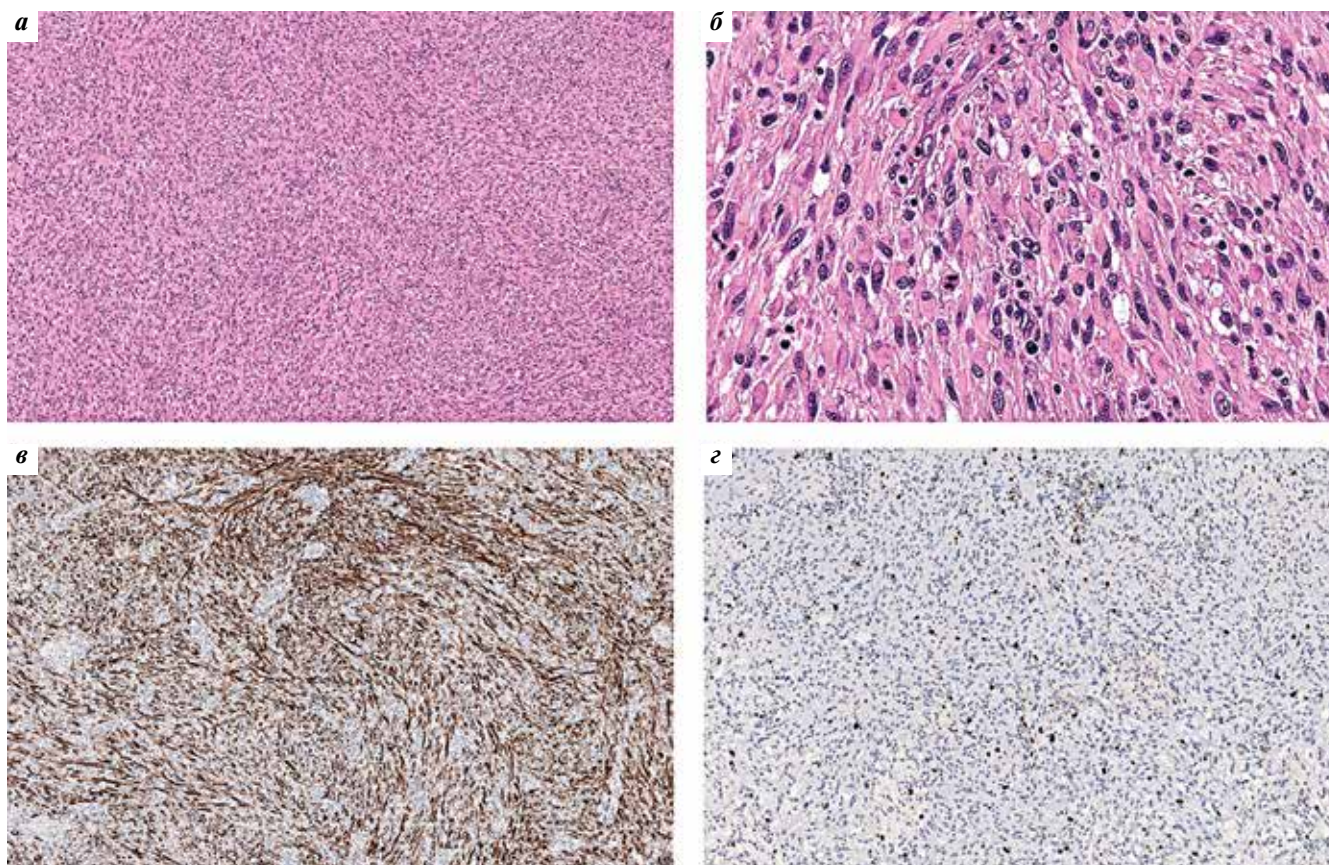


Рис. 4. Гистологическая картина инфантильной глиобластомы с наличием химерного гена *ETV6-NTRK3*: а — ткань опухоли с компактным расположением клеточных элементов. Клетки опухоли с умеренно выраженным клеточным полиморфизмом, местами формируют потоковые структуры (окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$); б — клетки опухоли с умеренно выраженным ядерным полиморфизмом. Определяются фигуры митоза и пролиферация эндотелия сосудов (окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$); в — клетки опухоли экспрессируют GFAP (GFAP, $\times 100$); з — пролиферативная активность по уровню экспрессии Ki-67 — 10 % (Ki-67, $\times 200$)

Fig. 4. Histopathologic analysis of infant glioblastoma harboring *ETV6-NTRK3* fusion gene: а — tumor tissue with compact arrangement of cellular elements. Slightly polymorphic cells form stream-like structures (H&E, $\times 100$); б — tumor cells demonstrate moderate nuclear pleomorphism. Mitotic figures and vascular endothelial proliferation are present (H&E, $\times 400$); в — immunohistochemical stains showing tumor cell immunoreactivity for glial fibrillary acidic protein (GFAP, $\times 100$); з — approximate cell proliferative index 10 % (Ki-67, $\times 200$)

пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило применение энтректиниба (entrectinib) — селективного ингибитора рецепторных тирозинкиназ Trk A/B/C, ROS1, ALK — для лечения взрослых и детей с неоперабельными или метастатическими солидными опухолями с перестройкой генов *NTRK1/2/3*, *ROS1* и *ALK* вне зависимости от гистологического диагноза и локализации опухоли. Эффективность применения энтректиниба у детей была продемонстрирована в I/II фазе исследования STARTRK-NG (NCT02650401). Одним из преимуществ данного таргетного препарата является его способность проникать через гематоэнцефалический барьер, благодаря чему были показаны исключительно высокие результаты противоопухолевой активности у пациентов с ВЗГ ($n = 8$) с транслокацией генов *NTRK1/2/3* и *ROS1*: 4 полных ответа (*ETV6-NTRK3*, *EML1-NTRK2*, *GOPC-ROS1*, *TPR-NTRK1*) и 2 частичных ответа (*KANK1-NTRK2*, *EEFIG-ROS1*). У 2 пациентов наблюдался продолженный рост опухоли (*EML4-ALK* и *PARP6-NTRK3*) [20]. Обнаружение экспрессии химерного гена *ETV6-NTRK3* в ткани

опухоли описываемой больной позволяет рассматривать ингибиторы NTRK как потенциально эффективную терапевтическую опцию.

Заключение

Представленные данные подчеркивают важность углубленного изучения молекулярной биологии ВЗГ. Идентификация патогенетически значимых молекулярных маркеров имеет важное практическое значение для определения тактики ведения пациентов и поиска новых терапевтических возможностей, в том числе молекулярно-направленной (таргетной) терапии, в случаях опухолей, устойчивых к стандартным схемам лечения.

На основании полученных нами данных можно выработать диагностический алгоритм поиска генетических aberrаций в ВЗГ у детей. На первом этапе целесообразно проводить поиск драйверных мутаций в «горячих точках» *H3F3A*: K28M — для опухолей срединной локализации и G35R/V — полушарной локализации. Далее, при отрицательном результате, необходим поиск более редких генетических aberrаций.

Для пациентов с «диким» типом гена *H3F3A* и срединной локализацией опухоли рекомендовано исследование ткани опухоли на наличие мутации K28M в гене *Hist1H3B*, в случае полушарной локализации — *BRAF*

V600E. Пациентам с ВЗГ старше 14 лет целесообразно проводить поиск мутаций в генах *IDH1/2*, детям младше 1 года — химерных онкогенов с вовлечением *NTRK1/2/3*, *MET*, *ROS1* и *ALK*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Louis D.N., Perry A., Reifenberger G. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016;131:803–20. DOI: 10.2176/nmc.ra.2017-0010.
- Johnson A., Severson E., Gay L. et al. Comprehensive genomic profiling of 282 pediatric low- and high-grade gliomas reveals genomic drivers, tumor mutational burden, and hypermutation signatures. *Oncologist* 2017;22(12):1478–90. DOI: 10.1634/theoncologist.2017-0242.
- Зайцева М.А., Ясько Л.А., Папуша Л.И., Друй А.Е. Молекулярно-генетические характеристики глиом у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2019;18(4):109–17. [Zaytseva M.A., Yasko L.A., Papusha L.I., Druy A.E. Molecular genetic features of pediatric gliomas. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii* = *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2019;18(4):109–17. (In Russ.)]. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-4-109-117.
- Gambella A., Senetta R., Collemi G. et al. NTRK fusions in central nervous system tumors: a rare, but worthy target. *Int J Mol Sci* 2020;21(3):753. DOI: 10.3390/ijms21030753.
- Toll S.A., Tran H.N., Cotter J. et al. Sustained response of three pediatric BRAFV600E mutated high-grade gliomas to combined *BRAF* and *MEK* inhibitor therapy. *Oncotarget* 2019;10(4):551–7. DOI: 10.18632/oncotarget.26560.
- Catalogue of somatic mutations in cancer. Available at: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.
- Leske H., Rushing E., Budka H. et al. K27/G34 versus K28/G35 in histone H3-mutant gliomas: a note of caution. *Acta Neuropathologica* 2018;136(1):175–6. DOI: 10.1007/s00401-018-1867-2.
- Grigore F.N., Day C., Yang H. et al. Histone H3.3 mutations drive tumorigenesis through chromosomal instability. *Neurooncology* 2019;21(Suppl_2):ii84. DOI: 10.1093/neuonc/noz036.086.
- Maeda S., Ohka F., Okuno Y. et al. H3F3A mutant allele specific imbalance in an aggressive subtype of diffuse midline glioma, *H3 K27M*-mutant. *Acta Neuropathol Commun* 2020;8(1):8. DOI:10.1186/s40478-020-0882-4.
- Solomon D.A., Wood M.D., Tihan T. et al. Diffuse midline gliomas with histone *H3 K27M* mutation: a series of 47 cases assessing the spectrum of morphologic variation and associated genetic alterations. *Brain Pathol* 2016;26(5):569–80. DOI: 10.1111/bpa.12336.
- Phillips J.J., Gong H., Chen K. et al. The genetic landscape of anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma. *Brain Pathol* 2019;29(1):85–96. DOI: 10.1111/bpa.12639.
- Vaubel R.A., Caron A.A., Yamada S. et al. Recurrent copy number alterations in low-grade and anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma with and without *BRAF* V600E mutation. *Brain Pathol* 2018;28(2):172–82. DOI: 10.1111/bpa.12495.
- Touat M., Younan N., Euskirchen P. et al. Successful targeting of an *ATG7-RAF1* gene fusion in anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma with leptomeningeal dissemination. *JCO Precis Oncol* 2019;3:1–7. DOI: 10.1200/PO.18.00298.
- Fraão L., do Carmo Martins M., Nunes V.M. et al. *BRAF* V600E mutation and 9p21: CDKN2A/B and MTAP co-deletions — markers in the clinical stratification of pediatric gliomas. *BMC Cancer* 2018;18(1):1259. DOI: 10.1186/s12885-018-5120-0.
- Rajbhandari R., McFarland B.C., Patel A. et al. Loss of tumor suppressive micro-RNA-31 enhances TRADD/NF-κB signaling in glioblastoma. *Oncotarget* 2015;6(19):17805–16. DOI: 10.18632/oncotarget.4596.
- Pollack I.F., Hamilton R.L., Sobol R.W. et al. IDH1 mutations are common in malignant gliomas arising in adolescents: a report from the Children's Oncology Group. *Child's Nervous System* 2011;27(1):87–94. DOI: 10.1007/s00381-010-1264-1.
- Buccoliero A.M., Castiglione F., Degl'Innocenti D.R. et al. *IDH1* mutation in pediatric gliomas: has it a diagnostic and prognostic value? *Fetal Pediatr Pathol* 2012;31:278–82. DOI: 10.3109/15513815.2012.659383.
- Antonelli M., Buttarelli F.R., Arcella A. et al. Prognostic significance of histological grading, p53 status, YKL-40 expression, and IDH1 mutations in pediatric high-grade gliomas. *J Neurooncol* 2010;99:209–15. DOI: 10.1007/s11060-010-0129-5.
- Guerreiro Stucklin A.S., Ryall S., Fukuoka K. et al. Alterations in *ALK/ROS1/NTRK/MET* drive a group of infantile hemispheric gliomas. *Nat Commun* 2019;10(1):4343. DOI: 10.1038/s41467-019-12187-5.
- Desai A.V., Robinson G.W., Basu E.M. et al. Updated entrectinib data in children and adolescents with recurrent or refractory solid tumors, including primary CNS tumors. *J Clin Oncol* 2020;38(15_suppl):107. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.107.

Вклад авторов

М.А. Зайцева: разработка дизайна исследования, проведение генетических исследований и анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

А.П. Шехтман: проведение гистологических исследований, редактирование текста рукописи;

Л.И. Папуша, Э.Ф. Валиахметова: обзор публикаций по теме статьи, сбор клинических данных;

Л.А. Ясько, А.Е. Друй: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, научное редактирование текста рукописи.

Authors' contributions

M.A. Zaytseva: developing the research design, genetic testing and analysis of the obtained data, analysis of the literature, writing of the manuscript;

A.P. Shekhtman: histopathologic analysis, editing of the manuscript;

L.I. Papusha, E.F. Valiakhmetova: analysis of the literature, clinical data collection;

L.A. Yasko, A.E. Druy: developing the research design, analysis of the literature, scientific editing of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.А. Зайцева / M.A. Zaytseva: <https://orcid.org/0000-0003-2015-5790>

А.П. Шехтман / A.P. Shekhtman: <https://orcid.org/0000-0001-5461-7442>

Л.И. Папуша / L.I. Papusha: <https://orcid.org/0000-0001-7750-5216>

Э.Ф. Валиахметова / E.F. Valiakhmetova: <https://orcid.org/0000-0002-2977-665X>

Л.А. Ясько / L.A. Yasko: <https://orcid.org/0000-0003-3007-3772>

А.Е. Друй / A.E. Druy: <https://orcid.org/0000-0003-1308-8622>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование было поддержано благотворительным фондом «Наука-детям».

Financing. The study was supported by charity foundation "Science for children"

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Все пациенты или законные представители пациентов 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 Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia.

All patients or legal representatives of patients gave written informed consent to participate in the study.

Спектр мутаций гена *VHL* при спорадическом светлоклеточном почечно-клеточном раке

Н.Н. Мазуренко¹, И.В. Цыганова¹, В.В. Стрельников², А.В. Балбуцкий¹, Т.Ф. Маливанова¹, Е.Б. Кузнецова², В.А. Драудин-Крыленко¹, О.В. Шаньгина¹, А.Ф. Мукерия¹, В.Б. Матвеев¹, Д.Г. Заридзе¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

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

Контакты: Наталья Николаевна Мазуренко nmazurenko@mail.ru

Нарушения гена *VHL* являются ранней и характерной особенностью светлоклеточного почечно-клеточного рака (скПКР). Проведен анализ мутаций *VHL* в 98 образцах скПКР для определения их локализации относительно функционально значимых мотивов белка *VHL*. Анализ мутаций *VHL* проводили в ДНК из свежесамозамороженных тканей опухоли секвенированием по Сэнгеру, параллельно 62 образца скПКР подвергли секвенированию нового поколения (next generation sequencing, NGS). В 73 (74,4 %) из 98 образцов скПКР обнаружены нон-сайлент-мутации в кодирующей части гена *VHL*. Мутации, нарушающие функции белка *VHL* (нон-сенс-мутации, мутации в сайтах сплайсинга и делеции/инсерции со сдвигом рамки считывания), выявлены в 40 (40,8 %) образцах скПКР, миссенс-мутации — в 35 (35,7 %). Всего обнаружено 76 мутаций, влияющих на функции белка *VHL* в 72 (73 %) образцах скПКР, причем 15 мутаций не были описаны ранее (делеции/инсерции *VHL* со сдвигом или без сдвига рамки считывания). В 4 случаях скПКР выявлено по 2 мутации *VHL*. Большинство миссенс-мутаций нарушают сайты взаимодействия белка *VHL* с HIF, PKC или кинезином. Рассмотрен вопрос о патогенности сайлент-мутации p.P154P и мутаций в интронах вблизи сайтов сплайсинга. Полученные результаты важны для изучения роли мутаций *VHL* в прогрессировании и прогнозе скПКР.

Ключевые слова: светлоклеточный почечно-клеточный рак, мутации *VHL*, секвенирование по Сэнгеру, NGS-анализ

Для цитирования: Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В., Стрельников В.В. и др. Спектр мутаций гена *VHL* при спорадическом светлоклеточном почечно-клеточном раке. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(3):48–57.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-3-48-57



Spectrum of *VHL* mutations in clear cell renal cell carcinoma

N.N. Mazurenko¹, I.V. Tsyganova¹, V.V. Strelnikov², A.V. Balbutsky¹, T.F. Malivanova¹, E.B. Kuznetsova², V.A. Draudin-Krilenko¹, O.V. Shangina¹, A.F. Mukeria¹, V.B. Matveev¹, D.G. Zaridze¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²N.P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115522, Russia

The *VHL* gene alterations are the early and characteristic feature of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). We have examined *VHL* mutations in sporadic 98 ccRCC cases to evaluate their localization in relation to functionally important motifs of the *VHL* protein. The DNA samples were obtained from snap-frozen carcinoma biopsies and used for Sanger sequencing, while 62 ccRCC DNA cases were studied by next generation sequencing (NGS) analysis in parallel. In 73 (74.4 %) of 98 ccRCC cases the somatic non-silent *VHL* mutations were identified. Loss of function *VHL* mutations (nonsilent, frameshifts or in splicing sites) were detected in 40 (40.8 %) ccRCC, while missense mutations — in 35 (35.7 %) ccRCC. In total 76 mutations important for *VHL* functioning were detected in 72 (73 %) ccRCC samples, of them 15 mutations (deletion/insertion in-frame or frameshifts) were identified for the first time. Four ccRCC cases contained two mutations each. Most of missense mutations disturb the sites of *VHL* interactions with HIF, PKC or kinesin. The pathogenicity of p.P154P silent mutation and intronic mutations near mRNA *VHL* splicing sites was discussed. The obtained results are important for understanding the role of *VHL* mutations in ccRCC progression and prognosis.

Key words: clear cell renal cell carcinoma, *VHL* mutations, Sanger sequencing, NGS analysis

For citation: Mazurenko N.N., Tsyganova I.V., Strelnikov V.V. et al. Spectrum of *VHL* mutations in clear cell renal cell carcinoma. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2020;7(3):48–57. (In Russ.).

Введение

Рак почки занимает 9-е место по распространенности в структуре онкологической заболеваемости в мире [1]. Ежегодно регистрируют более 330 тыс. новых случаев заболевания раком почки и более 140 тыс.

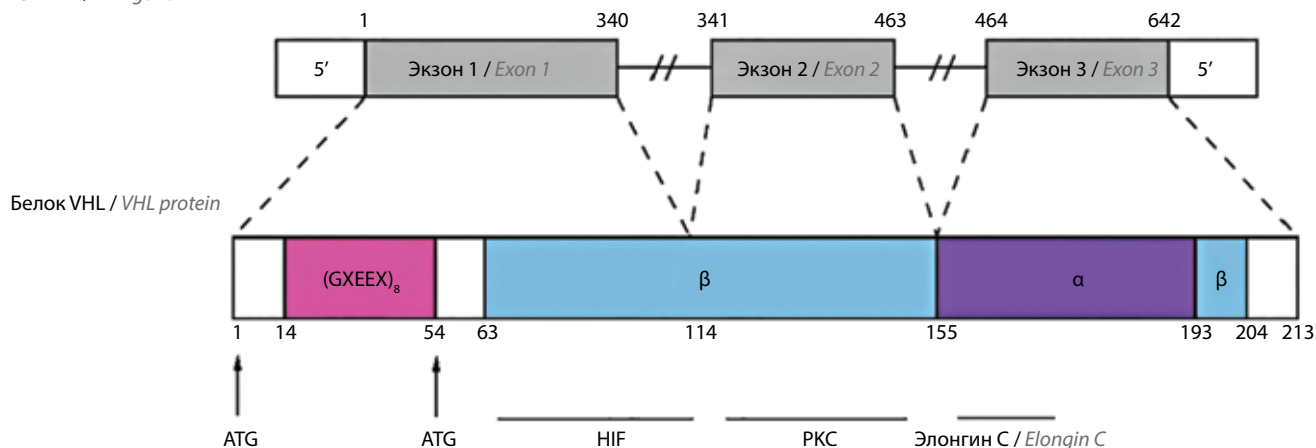
смертей от этой патологии. В России в 2017 г. было зарегистрировано 24 779 новых случаев рака почки, от него умерли 8386 человек, причем заболеваемость с 1990 г. выросла с 5,5 до 13,8 случая на 100 тыс. населения [2, 3].

Рак почки представлен различными гистологическими формами, наиболее распространен (80–85 %) светлоклеточный почечно-клеточный рак (скПКР), который отличается наибольшей агрессивностью. Для скПКР характерны нарушения гена *von Hippel–Lindau (VHL)*, которые присутствуют как у пациентов с семейным раком почки с наследственным синдромом *von Hippel–Lindau* (2–4 %), так и у больных спорадическим раком почки. Изменения гена *VHL* являются ранним и общим событием в канцерогенезе спорадического скПКР. В 85–98 % случаев имеет место потеря гетерозиготности на 3p, что в сочетании с мутациями приводит к биаллельной инактивации гена *VHL*, при этом выявляют разнообразные соматические мутации: делеции/инсерции со сдвигом рамки считывания, нонсенс- и миссенс-мутации, мутации, затрагивающие сайты сплайсинга [4–6]. В 8–19 % случаев скПКР инактивация гена *VHL* происходит за счет гиперметилирования промотора [7–9]. Нарушения *VHL* характерны именно для скПКР [10], тогда как гиперметилирование промотора выявляется в равной степени в различных гистологических подтипах почечно-клеточного рака (ПКР) [11].

Ген *VHL* размером 10 kb расположен в локусе 3p25.3, состоит из 3 экзонов и кодирует 2 белковых изоформы VHL 30 (экзоны 1, 2, 3; 213 ак) и VHL19 (экзоны 1 и 3; 160 ак). Каноническая изоформа VHL30 является компонентом E3 убиквитинлигазного комплекса VCB-cul2, содержащего элонгины C и B, белки Cullin-2 и Rbx1. Белок VHL связывается более чем с 30 белками для их последующей убиквитинзависимой деградации, в том числе с индуцируемыми гипоксией факторами (HIF), протеинкиназой C, ретинолсвязывающим белком 1 [12]. Среди мишеней VHL наиболее изучены субъединицы HIF1 α /2 α , регулирующие транскрипцию большого числа генов, в том числе *VEGF*, *PDGF*, *EPO*, *CA9* и *CXCR4*, важных для клеточного метаболизма, ангиогенеза, инвазии и метастазирования [13].

Белок VHL30 имеет N-концевой домен в 53 аминокислотных остатка (включает 8 копий кислых пентамерных повторов GXEEX), который связывается с фибрином и, как принято считать, не несет функциональной нагрузки (см. рисунок). Однако имеются указания, что фосфорилирование этого домена влияет на супрессивные свойства белка VHL [14]. Изучение кристаллической структуры показало, что центральная и C-концевая части VHL30 состоят из β -сэндвич домена, распознающего субстрат (63–154 ак, кодируются экзонами 1 и 2; 193–204 ак, кодируются экзон 3), и α -спирального домена (155–192 ак, кодируются экзон 3), который контактирует с элонгином C. В нормальных условиях в присутствии кислорода субъединицы HIF после гидроксирования пролилгидроксилазой PHD приобретают способность связываться с β -доменом белка VHL, который через α -домен формирует третичный комплекс с элонгинами C и B, компонентами E3 убиквитинлигазного комплекса. При этом молекулы убиквитина взаимодействуют с HIF и осуществляют его протеолиз. В условиях гипоксии негидроксированные субъединицы HIF1 α образуют гетеродимеры с HIF1 β , поступают в ядро и активируют транскрипцию генов, ответственных за функционирование клеток при низком содержании кислорода. Кроме дестабилизации HIF1 α белок VHL участвует в активации многих эффекторных белков, регулирующих активацию p53, стабильность микротрубочек, клеточную сценесценцию и анеуплоидию клеток, апоптоз нейронов, убиквитинизацию РНК-полимеразы, активность NF- κ B [15].

При анализе публикаций выявляются значительные различия в частоте мутаций *VHL* при скПКР – от 41 до 82 % [4, 7, 11, 16–21]. Вариации в частоте мутаций частично связаны с тем, что одни авторы изучают только нон-сайлент-мутации в экзонах, влияющие на структуру белка VHL [21], тогда как другие описывают все мутации, включая мутации в первых

Ген *VHL* / *VHL gene*Структура гена и белка *VHL*
VHL gene and protein structure

53 кодонах экзона 1, сайлент-мутации, а также мутации в интронах. Различия в результатах также могут быть связаны с выборкой пациентов, процентным соотношением опухолевой и нормальной ткани в исследуемом образце, субъективной оценкой гистологии опухоли, а также с методом определения мутаций. В частности, отмечается более низкая частота мутаций при секвенировании нового поколения (next generation sequencing, NGS), чем при секвенировании по Сэнгеру [18, 19].

Изучение связи мутаций *VHL* с этиологией, прогрессированием и прогнозом скПКР привело к накоплению большого количества противоречивых данных. Метаанализ результатов 10 публикаций, включивших 1082 пациента со скПКР, показал, что изменения гена *VHL* незначительно ассоциированы с клиническими характеристиками заболевания и общей выживаемостью пациентов [22]. Тем не менее изучение мутаций *VHL* важно, так как для прогрессирования скПКР и, возможно, для прогноза заболевания определенное значение имеет сочетание мутаций *VHL* и других генов [23–25]. При этом независимо от нарушений других генов слабая экспрессия белка VHL была ассоциирована с более высокой стадией заболевания ($p = 0,023$) и меньшей общей выживаемостью пациентов ($p = 0,013$) [26].

Цель исследования — изучение спектра мутаций гена *VHL* в образцах спорадического скПКР у российских больных.

Материалы и методы

Клинический материал. В исследование включено 98 образцов первичного скПКР от пациентов, которые находились на лечении в отделении онкоурологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Больные были отобраны из базы данных молекулярно-эпидемиологического исследования рака почки, проводимого в отделе эпидемиологии и профилактики злокачественных опухолей [27]. Исследование одобрено комитетом по этике при НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Диагноз был установлен на основании клинической картины и гистологической верификации опухолевых образцов в отделении патологической анатомии опухолей человека.

Опухолевую ДНК выделяли из свежемороженых операционных биоптатов ПКР с использованием протеиназы К и последующей фенол-хлороформной экстракцией. Для всех образцов был определен процент опухолевых клеток в серийных срезах свежемороженных тканей, в исследование вошли образцы ПКР, которые содержали 60–100 % опухолевых клеток. Для 8 образцов скПКР ДНК была получена из опухолевых клеток, собранных с депарафинизированных срезов опухолевых биоптатов при использовании протеиназы К.

Анализ мутаций. Анализ мутаций гена *VHL* проводили секвенированием по Сэнгеру и NGS.

Аmplification участков кодирующей последовательности *VHL* в ДНК из свежемороженных тканей проводили в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами к экзонам 1–3, как описано [11]: *VHL1_F*: cta-cgg-agg-tcg-act-cgg-gag; *VHL1_R*: ggg-ctt-cag-acc-gtg-cta-tcg; *VHL2_F*: ccg-tcg-cca-gcc-acc-ggt-gtg; *VHL2_R*: gga-taa-cgt-gcc-tga-cat-cag; *VHL3_F*: cgt-tcc-ttg-tac-tga-gac-cct-ag; *VHL3_R*: gaa-cca-gtc-ctg-tat-vta-gat-caa-g.

ПЦР-продукты разделяли в 2 % агарозном геле и после электрофореза выделяли из геля для секвенирования по Сэнгеру с помощью набора Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher, США).

Параллельно было проведено NGS для 62 препаратов ДНК скПКР (54 препарата ДНК из свежемороженных тканей и 8 препаратов ДНК из парафиновых срезов) с праймерами: *NGS_VHL1_F*: ggt-cat-ctt-ctg-caa-tcg-cag-t; *NGS_VHL1_R*: gct-tca-gac-cgt-gct-act-gt; *NGS_VHL2_F*: tac-ggt-gct-gga-gga-tcc-tt; *NGS_VHL2_R*: tac-tct-tcg-acg-cct-gcc-tcc; *NGS_VHL3_F*: aca-ttc-agt-tag-tta-aag-caa-tca-caa-gc; *NGS_VHL3_R*: cgc-tct-ttc-aga-gta-tac-act-gga-ag; *NGS_VHL4_F*: cca-ccg-gtg-tgg-ctc-tt; *NGS_VHL4_R*: cta-tcc-tgt-act-tac-cac-aac-aac-ctt-acc; *NGS_VHL5_F*: ctg-gat-cgc-gga-ggg-aat; *NGS_VHL5_R*: tgc-gat-tgc-aga-aga-tga-cct; *NGS_VHL6_F*: ccc-tag-tct-gcc-act-gag-gat-t; *NGS_VHL6_R*: atc-agt-acc-acc-aaa-agg-tga-gat-ga.

Высокопроизводительное полупроводниковое параллельное секвенирование ДНК выполняли на приборе Ion S5 (Thermo Fisher, США). Подготовку библиотек фрагментов ДНК проводили с использованием набора реактивов Ion AmpliSeq Library Kit 2.0.

Поиск данных о выявленных мутациях и их патогенетическом значении осуществляли в базах COSMIC (the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer; <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) и HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

Результаты и обсуждение

В данной работе не проводили выявление герминальных мутаций гена *VHL*, так как исследовали ДНК только из опухолевых клеток скПКР, но не из нормальных тканей пациентов.

По функциональной значимости все мутации гена *VHL* можно разделить на 3 группы.

1. Мутации, приводящие к утрате белка VHL или нарушению его функций (LOF, loss of function)

В 1-ю группу вошли различные мутации, приводящие к нарушению функций белка VHL (loss of function, LOF), которые обнаружены в 40 (40,8 %) из 98 образцов скПКР (табл. 1):

- 1) 6 вариантов нонсенс-мутаций обнаружены в 7 (7,1 %) из 98 образцов скПКР, все описаны в базе COSMIC;
- 2) делеции/инсерции *VHL*, вызывающие сдвиг рамки считывания, выявлены в 27 (27,5 %) из 98 образцов скПКР, причем 11 из 27 мутаций являются новыми и отсутствуют в базе COSMIC (данные

Таблица 1. Мутации, приводящие к утрате белка VHL или нарушению его функциональности в образцах спорадического светлоклеточного почечно-клеточного рака

Table 1. Loss of function mutations in the VHL gene in sporadic clear cell renal cell carcinoma samples

№	Эк- зон Exon	Мутация мРНК Mutation mRNA change	Мутация белка VHL VHL protein mutation	Тип мутации Mutation type	COSMIC	Патоген- ность Pathoge- nicity	Домен Domen	Мишень связывания Proteins binding site
1	1	c.159_166 del 8nt	p.E53FS*	FS*			N-концевой N-end	
2	1	c.163G>T	p.E55X	Nonsense	COSM249129	Патоген Pathogen	β	HIF
3	1	c.164 ins 4nt	p.E55FS*	FS*			β	HIF
4	1	c.166 dupG	p.A56FS*	FS*	COSM3734689		β	HIF
5	1	c.176_180 del 5nt	p.P59FS*	FS*			β	HIF
6	1	c.198_207 del 10nt	p.N67FS*	FS*			β	HIF
7	1	c.217C>T	p.Q73X	Nonsense	COSM17872	0,82	β	HIF
8	1	c.221 delT	p.V74FS*	FS*	COSM4186011	N/a	β	HIF
9	1	c.225 delC	p.I75FS*	FS*			β	HIF
10	1	c.236_237 del	p.R79FS	FS*	COSM17719	N/a	β	HIF
11	1	c.251 delT	p.84VFS*	FS*			β	HIF
12	1	c.263 delG	p.W88FS*	FS*	COSM26785	N/a	β	HIF
13	1	c.263G>A	p.W88X	Nonsense	COSM18070	0,98	β	HIF
14	1	c.310_339 del 30nt	p.G104_ R113 del	In frame Splicing effect			β	HIF
15	1	c.315_316 ins 7nt	p.T105_ T106FS*	FS*			β	HIF Kinesin
16	1	c.319 delC	p.R107FS*	FS*	COSM17891	N/a	β	HIF Kinesin
17	1	c.320_323 delins CA	p.R107FS*	FS*			β	HIF Kinesin
18	1	c.G340C	p.G114R	Missense Splicing effect	COSM18065	0,98	β	HIF Kinesin
19	2	c.341_11 del 37nt	c.341_11 del 37nt	Splicing effect			β	HIF Kinesin
20, 21	2	c.341-1G>T	p.G114C	Splicing effect	COSM17642	0,98	β	HIF Kinesin
22	2	c.369 delG	p.T124FS*	FS*	COSM17895	N/a	β	Kinesin
23	2	c.408 delT	p.F136FS*	FS*	COSM18059	N/a	β	PKC
24	2	c.419_420 del	p.L140FS*	FS*	COSM17930	N/a	β	PKC
25	2	c.431 delG	p.G144FS*	FS*	COSM14412	N/a	β	PKC
26	2	c.439 delA	p.I147FS*	FS*	COSM17976	N/a	β	PKC
27	2	c.444 delT	p.F148FS*	FS*	COSM14410	N/a	β	PKC
28	2	c.463G>A	p.V155M	Missense Splicing effect	COSM18152	0,87	β	PKC
29	3	c.475A>T	p.K159X	Nonsense	COSM422840	0,93	α	Elongin C

Окончание табл. 1

End of table 1

№	Эк- зон Exon	Мутация мРНК Mutation mRNA change	Мутация белка VHL VHL protein mutation	Тип мутации Mutation type	COSMIC	Патоген- ность Pathoge- nicity	Домен Domen	Мишень связывания Proteins binding site
30, 31	3	c.481C>T	p.R161X	Nonsense	COSM17612	0,87	α	Elongin C
32	3	c.483_490 del8	p.C161FS*	FS*			α	Elongin C
33	3	c.493 delG	p.V165FS*	FS*	COSM14332	0,93	α	Elongin C
34	3	c.500_501 ins GA	p.S168FS*	FS*			α	Elongin C
35	3	c.525C>A	p.Y175X	Nonsense	COSM17789	0,71	α	Elongin C
36	3	c.532 delC	p.L178FS*	FS*	COSM18265	N/a	α	Elongin C
37	3	c.548_549 del 2nt	p.L184FS*	FS*			α	Elongin C
38	3	c.562 delC	p.L188FS*	FS*	COSM14337	N/a	α	Elongin C
39	3	c.576_586 del 11nt	p.P192FS*	FS*			α	Elongin C
40	3	c.607_608 del CA	p.Q203FS*	FS*	COSM3358443	N/a	С-концевой C-end	

Примечание. Здесь и в табл. 2: мРНК — матричная РНК; FS* — мутация со сдвигом рамки считывания; n/a — нет данных; kinesin — кинезин; elongin — элонгин.

Note. Here and in the table 2: mRNA — messenger RNA; FS* — frameshift mutation; n/a — data non-available.

на июль 2020 г.). Делеции обнаружены в 22 случаях скПКР, инсерции — в 4, мутация p.R107 FS* (c.320_323 delins CA) — в 1;

3) мутации, затрагивающие сайты сплайсинга, разнообразны и выявлены в 6 (6,1 %) образцах скПКР:

- в 2 образцах скПКР выявлены ранее не описанные делеции, затрагивающие сайты сплайсинга мРНК *VHL*:
— c.341_11 del 37nt начинается в интроне 1 и включает 26 кодонов экзона 2,
— c.310_339 del 30nt, p.104_113 del захватывает донорный сайт сплайсинга экзона 1;
- в 2 образцах скПКР выявлены миссенс-мутации, затрагивающие сайты сплайсинга матричной РНК (мРНК) *VHL*. Это патогенные миссенс-мутации в акцепторном сайте сплайсинга экзона 2: c.340 G>C, p.G114R, COSM18065 (Pathogenic score 0,98) и в донорном сайте сплайсинга экзона 2: c.463G>A, p.V155M, COSM18152 (Pathogenic score 0,97);
- в 2 образцах скПКР выявлена мутация в интроне в сайте сплайсинга: c.341-1G>T, COSM17642 (Pathogenic score 0,98).

2. Мутации, не нарушающие рамку считывания *VHL*

Во 2-ю группу включены делеции/инсерции, не нарушающие рамку считывания *VHL*, и миссенс-мутации.

Выявлены 4 ранее не описанные делеции *VHL* без сдвига рамки считывания:

- 2 мутации в экзоне 1 *VHL* кодируют сайт взаимодействия белка *VHL* с HIF: p.V74_V83 del (c.220_249 del); p.C77_N78 del (c.228_233 del);
- 2 мутации в экзоне 2 *VHL* кодируют сайты взаимодействия белка *VHL* с PKC: p.G123 del (c.367_369 del); p.P146_A149 del (c.437_445 del).

Миссенс-мутации гена *VHL* встречаются в 28—35 % случаев скПКР, причем до 40 % этих мутаций существенно влияют на функции белка *VHL* [18, 20].

В нашей работе при анализе 98 образцов скПКР обнаружено 30 вариантов миссенс-мутаций в 35 (35,7 %) случаях, включая 2 вышеописанные мутации p.G114R и p.V155M в сайтах сплайсинга (табл. 2). Все выявленные мутации описаны в базе COSMIC, большинство высокопатогенны (0,85—0,99). Исключение составляет мутация в начале экзона 1 в N-концевом домене *VHL*: c.116G>A, p.G39D (COSM14345; Neutral, Pathogenic score 0,39).

Особый интерес представляет локализация мутаций в белке *VHL*, поскольку это определяет их роль в связывании белков, взаимодействующих с *VHL*. При анализе локализации мутаций в белке *VHL* в образцах скПКР подтверждено, что большинство миссенс-мутаций нарушают сайты взаимодействия *VHL* с HIF, PKC или кинезином (см. табл. 2). В 20 (57 %) из 35 образцов скПКР миссенс-мутации локализованы в β-домене

в сайте взаимодействия с HIF, в 10 (29 %) — в сайте взаимодействия с PKC. В 4 образцах скПКР миссенс-мутации затрагивают α -домен, сайт взаимодействия с элонгином С.

Встречаются различные замены в одной позиции: р.С65, р.Н78, р.Р86, р.Н115 и р.Л151. Некоторые мутации выявлены в 2–3 опухолях: р.С65L, р.Л89Р, р.Л118Р (см. табл. 2), что соответствует данным литературы. Кодоны р.С65, р.Н78, р.В117 и р.Л184 описаны как «горячие точки», а миссенс-мутации р.В117 и р.Л184 дестабилизируют VHL [20]. Выявленные нами мутации р.С65, р.Н78, р.Р86, р.В117, р.Л118, р.Л158 совпадают с «горячими точками», описанными ранее [28].

В 4 образцах скПКР выявлено по 2 мутации VHL, наблюдалось сочетание миссенс-мутации в экзоне 1 и миссенс-мутации в экзоне 2 или делеции со сдвигом рамки считывания в экзоне 3 (табл. 3). Присутствие двух мутаций VHL в одном образце скПКР наблюдали и ранее [16, 20]. Возможно, наличие нескольких мутаций VHL в скПКР связано с поликлональностью опухолей почки [28, 29], поскольку ДНК в каждом случае была получена из достаточно крупного фрагмента свежезамороженной опухолевой ткани.

3. Мутации, не влияющие на функции белка VHL

В 3-ю группу выделены мутации, влияние которых на функции белка VHL неочевидно или требует изучения. К ним относятся мутации, локализованные в 5'UTR (с.73С>Т), и упомянутая выше миссенс-мутация в N-концевом домене VHL: с.116G>A, р.С39D (COSM14345; Neutral, Pathogenic score 0,39).

В VHL обнаружено также достаточно много сайлент-мутаций и полиморфизмов, изучение которых не входило в задачу данной работы. Однако наше внимание привлекла сайлент-мутация вблизи сайта сплайсинга экзона 2 — с.462A>Т, р.Р154Р (COSM144976, Pathogenic score 0,87), патогенность которой вызывает сомнение. Мы выявили эту мутацию в 3 образцах скПКР, причем в двух опухолях помимо нее обнаружены мутации в экзоне 1 (р.В88 FS*) или экзоне 2 (р.В130I), а в 3-й — в интроне 3 (с.463+9G>Т). По консенсусной последовательности донорного сайта сплайсинга тимин (урацил в РНК) в положении «–2» не должен нарушить сплайсинг. Выявление других патогенных вариантов VHL в тех же образцах также свидетельствует в пользу непатогенности р.Р154Р.

В 25 образцах скПКР не выявлено нон-сайлент-мутаций в кодирующей части VHL. С помощью ПЦР со специфичными праймерами проанализированы последовательности интронов, граничащие с сайтами сплайсинга. В результате в 2 образцах скПКР выявлена мутация в интроне 1, влияющая на сплайсинг (с.341–1G>Т), которая была учтена ранее в 1-й группе мутаций. Выявлены также мутации в интронах гена VHL вблизи экзонов: с.341–20G>Т (интрон 1), с.463+9G>Т (интрон 2), с.464–3C>Т (интрон 2). Данных о патогенности этих мутаций нет, и они скорее всего

непатогенны, исходя из консенсуса акцепторного сайта сплайсинга человека. В пользу этого свидетельствует и то, что замены в интронах наблюдались иногда в тех же образцах скПКР, где отмечены мутации в экзонах. Помимо точечных замен в интронах обнаружены делеции (например, делеции del 5033G в интроне 1 в 2 образцах скПКР и др.).

Таким образом, всего выявлено 77 нон-сайлент-мутаций гена VHL в 73 (74,4 %) из 98 образцов скПКР, из которых 76 влияют на функциональность белка. При этом мутации в экзоне 1 выявлены в 36 (36,6 %) случаях скПКР, в экзоне 2 — в 26 (26,5 %), в экзоне 3 — в 15 (15,3 %).

Считается, что для скПКР характерны мутации, которые связаны с дестабилизацией VHL [6, 20, 28]. Мутации консервативных остатков глицина G93 или пролина могут разрушить и дестабилизировать VHL. Мутация N78 разрушает водородные связи, которые стабилизируют участок VHL, связывающий 2 петли, важные для взаимодействия с HIF и элонгином С. В то же время выявлено 3 разных мутации в позиции р.Н115N/Y/P, которая непосредственно взаимодействует с HIF α — гидроксипролинсвязывающим сайтом. Эти мутации нарушают способность белка VHL связывать HIF α для последующей убиквитинизации, при этом дестабилизации структуры белкового комплекса VHL с элонгином С и элонгином В (VCB) не происходит [6].

В настоящей работе выявлено 15 образцов скПКР с мутациями в α -домене белка VHL в участке взаимодействия с элонгином С, причем 4 из них — миссенс, приводящие к аминокислотным заменам в сайте сплайсинга мРНК VHL: р.Л158R, р.Л169Р, р.У175D и р.В155M.

Несмотря на то что мы не исследовали нормальную ткань почки, обнаруженные мутации р.С65L, р.Г114R, р.Л118Р, р.В130I, р.И151Т и р.Л169Р описаны как герминальные и могут встречаться при семейном ПКР [6].

Мутация в позиции р.Л169Р интересна тем, что находится между 2 сайтами фосфорилирования белка VHL по серину S168 и тирозину Y175, связанными с NEK1-киназой, которая фосфорилирует VHL по этим сайтам, способствуя его протеосомной деградации и цилиарной дестабилизации. Аминокислотная замена р.Л169Р может индуцировать накопление фосфорилированных CDK1 или родственных CDK- или MAP-киназ. Инактивация VHL связана с повышением уровней CDK1 и CDK2 и стабилизацией транскрипционных факторов HIF, которые являются мишенями VHL [30].

Заключение

Спектр мутаций VHL в скПКР достаточно разнообразен и представлен большим числом генетических нарушений. Всего выявлено 77 нон-сайлент-мутаций в кодирующей части гена VHL в 73 (74,4 %) из 98 образцов скПКР. Мутации, приводящие к утрате функций

Таблица 2. Миссенс-мутации белка VHL в образцах светлоклеточного почечно-клеточного рака

Table 2. VHL missense mutations in sporadic clear cell renal cell carcinoma samples

№	Экзон Exon	Мутация Mutation	Изменения в белке Aminoacid change	COSMIC HGMD	Патогенность Pathogenicity	Домен Domen	Мишень связывания Proteins binding site
1	1	c.116G>A	p.G39D	COSM14345	0,39	N-концевой N-end	
2	1	c.193T>A	p.S65T	COSM97135	0,99	β	HIF
3	1	c.193T>C	p.S65P	COSM18074	0,99	β	HIF
4–6	1	c.194C>T	p.S65L	COSM14400 CM941364 germline mutation	0,98	β	HIF
7	1	c.233A>C	p.N78T	COSM14319	0,98	β	HIF
8	1	c.234T>G	p.N78K	COSM17875	0,85	β	HIF
9	1	c.254T>C	p.L85P	COSM17859	0,89	β	HIF
10	1	c.257C>T	p.P86L	COSM18028	0,97	β	HIF
11	1	c.257C>G	p.P86R	COSM30234	0,97	β	HIF
12–14	1	c.266T>C	p.L89P	COSM14346	0,97	β	HIF
15	1	c.278G>A	p.G93D	COSM97143	0,99	β	HIF
16	1	c.280G>A	p.E94K	COSM3734682	0,93	β	HIF
17	1	c.313A>C	p.T105P	COSM18064	0,95	β	HIF
18	1	c.340G>C	p.G114R	COSM18065 CM951284 germline mutation	0,98	β	HIF Kinesin
19	2	c.343C>A	p.H115N	COSM17752	0,98	β	HIF Kinesin
20	2	c.343C>T	p.H115Y	COSM14375	0,98	β	HIF Kinesin
21	2	c.344A>C	p.H115P	COSM17962	0,98	β	HIF Kinesin
22	2	c.351T>G	p.W117G	COSM 30297	0,97	β	PKC Kinesin
23, 24	2	c.353T>C	p.L118P	COSM14312 CM941373 germline mutation	0,98	β	PKC Kinesin
25	2	c.388G>A	p.V130I	COSM1757303	0,98	β	PKC
26	2	c.391A>T	p.N131Y	COSM17758	0,98	β	PKC
27	2	c.393C>A	p.N131K	COSM1731999	0,95	β	PKC
28	2	c.403T>A	p.L135I	COSM33993	0,98	β	PKC
29	2	c.451A>T	p.I151F	COSM17978	0,99	β	PKC
30	2	c.452T>C	p.I151T	COSM17934	0,97	β	PKC
31	2	c.461C>T	p.P154L	COSM18266	0,96	β	PKC
32	3	c.463G>A	p.V155M	COSM18152	0,87	α	Elongin C
33	3	c.473T>G	p.L158R	COSM30286	0,89	α	Elongin C
34	3	c.506 T>C	p.L169P	COSM17837 CM003060 germline mutation	0,90	α	Elongin C
35	3	c.523T>G	p.Y175D	COSM17917	0,90	α	Elongin C

Таблица 3. Образцы светлоклеточного почечно-клеточного рака с 2 мутациями *VHL*

Окончание табл. 2

Table 3. Cases of clear cell renal cell carcinoma with two *VHL* mutations

End of table 2

№	Мутация 1 мРНК Mutation 1 mRNA change	Изменения в белке Aminoacid change	COSMIC	Мутация 2 мРНК Mutation 2 mRNA change	Изменения в белке Aminoacid change	COSMIC
1	Ex1 c.313A>C	p.T105P	COSM18064	Ex3 c.492 delG	p.V165FS*	COSM14332
2	Ex1 c.266T>C	p.L89P	COSM14346	Ex3 c.532 delC	p.L178FS*	COSM18265
3	Ex1 c.233A>C	p.N78T	COSM14319	Ex3 c.483_490 del 8nt	p.R161FS*	
4	Ex1 c.194C>T	p.S65L	COSM14400	Ex2 c. 404T>A	p.L135I	COSM33993

Примечание. мРНК — матричная РНК.

Note. mRNA — messenger RNA.

белка *VHL*, обнаружены в 40 (40,8 %), а миссенс-мутации — в 35 (35,7 %) образцах скПКР. Особое внимание привлекают ранее не описанные мутации — делеции/инсерции со сдвигом и без сдвига рамки считывания в 15 образцах скПКР. Анализ мутаций *VHL* в образцах скПКР показал, что большинство миссенс-мутаций нарушают сайты взаимодействия белка

VHL с HIF, РКС или кинезином. В дальнейшем предполагается использовать полученные результаты для сравнения показателей выживаемости пациентов с различными мутациями и «дикий» типом *VHL*, а также для изучения распространенности мутаций в скПКР в зависимости от эпидемиологических и клинических характеристик опухолевого процесса.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Znaor A., Lortet-Tieulent J., Laversanne M. et al. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur Urol* 2015;67(3):519–30. DOI: 10.1016/j.eururo.2014.10.002.
2. Заридзе Д.Г. Рак почки: клинические и экспериментальные исследования. Молекулярная эпидемиология рака почки. М.: РАН, 2019. С. 67–92. [Zaridze D.G. Kidney cancer: clinical and experimental research. Molecular epidemiology of kidney cancer. Moscow: RAN, 2019. Pp. 67–92. (In Russ.)].
3. Заридзе Д.Г., Мукерия А.Ф., Шаньгина О.В., Матвеев В.Б. Молекулярная эпидемиология рака почки. Онкоурология 2018;14(3):107–19. [Zaridze D.G., Mukeriya A.F., Shan'gina O.V., Matveev V.B. Molecular epidemiology of renal cancer. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2018;14(3):107–19. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9776-2018-14-3-107-119.
4. Banks R.E., Tirukonda P., Taylor C. et al. Genetic and epigenetic analysis of von Hippel–Lindau (*VHL*) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Res* 2006;66(4):2000–11. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3074.
5. Nordstrom-O'Brien M., van der Luijt R.B., van Rooijen E. et al. Genetic analysis of von Hippel–Lindau disease. *Hum Mutat* 2010;31(5):521–37. DOI: 10.1002/humu.21219.
6. Gossage L., Pires D.E., Olivera-Nappa A. et al. An integrated computational approach can classify *VHL* missense mutations according to risk of clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet* 2014;23(22):5976–88. DOI: 10.1093/hmg/ddu321.
7. Nickerson M.L., Jaeger E., Shi Y. et al. Improved identification of von Hippel–Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14(15):4726–34. DOI: 10.1158/1078-0432.
8. Cowey C.L., Rathmell W.K. *VHL* gene mutations in renal cell carcinoma: role as a biomarker of disease outcome and drug efficacy. *Curr Oncol Rep* 2009;11(2):94–101. DOI: 10.1007/s11912-009-0015-5.
9. Mehdi A., Riazalhosseini Y. Epigenome Aberrations: Emerging driving factors of the clear cell renal cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 2017;18(8):1774. DOI: 10.3390/ijms18081774.
10. Wang J., Xi Z., Xi J. et al. Somatic mutations in renal cell carcinomas from Chinese patients revealed by whole exome sequencing. *Cancer Cell Int* 2018;18:159. DOI: 10.1186/s12935-018-0661-5.
11. Moore L.E., Nickerson M.L., Brennan P. et al. Von Hippel–Lindau (*VHL*) inactivation in sporadic clear cell renal cancer: associations with germline *VHL* polymorphisms and etiologic risk factors. *PLoS Genet* 2011;7(10):e1002312. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002312.
12. Iwai K., Yamanaka K., Kamura T. et al. Identification of the von Hippel–Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(22):12436–41. DOI: 10.1073/pnas.96.22.12436.
13. Shen C., Kaelin W.G. The *VHL*/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2013;23(1):18–25. DOI: 10.1016/j.semcancer.2012.06.001.
14. Lolkema M.P., Gervais M.L., Snijckers C.M. et al. Tumor suppression by the von Hippel–Lindau protein requires phosphorylation of the acidic domain. *J Biol Chem* 2005;280:22205–11. DOI: 10.1074/jbc.M503220200.
15. Frew I.J., Moch H.A. Clearer view of the molecular complexity of clear cell renal cell carcinoma. *Annu Rev Pathol* 2015;10:263–89. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012414-040306.
16. Young A.C., Craven R.A., Cohen D. et al. Analysis of *VHL* gene alterations and their relationship to clinical parameters in sporadic conventional renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15(24):7582–92. DOI: 10.1158/1078-0432.

17. Taylor C., Craven R.A., Harnden P. et al. Determination of the consequences of VHL mutations on VHL transcripts in renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2012;41(4):1229–40. DOI: 10.3892/ijo.2012.1561.
18. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013;499(7456):43–9. DOI: 10.1038/nature12222.
19. Scelo G., Riazalhosseini Y., Greger L. et al. Variation in genomic landscape of clear cell renal cell carcinoma across Europe. *Nat Commun* 2014;5:5135. DOI: 10.1038/ncomms6135.
20. Razafinjato C., Bihr S., Mischo A. et al. Characterization of VHL missense mutations in sporadic clear cell renal cell carcinoma: hotspots, affected binding domains, functional impact on pVHL and therapeutic relevance. *BMC Cancer* 2016; 16:638. DOI: 10.1186/s12885-016-2688-0.
21. Mikhailenko D.S., Zhinzilo T.A., Kolpakov A.V. et al. Specific localization of missense mutations in the *VHL* gene in clear cell renal cell carcinoma. *Bull Exp Biol Med* 2017;163(4):465–8. DOI: 10.1007/s10517-017-3829-4.
22. Kim H.S., Kim J.H., Jang H.J. et al. Clinicopathologic significance of *VHL* gene alteration in clear-cell renal cell carcinoma: An Updated Meta-Analysis and Review. *Int J Mol Sci* 2018;19(9): E2529. DOI: 10.3390/ijms19092529.
23. Casuscelli J., Vanob Y.A., Fridman W.H., Hsieh J.J. Molecular classification of renal cell carcinoma and its implication in future clinical practice. *Kidney Cancer* 2017;1(1): 3–13. DOI: 10.3233/KCA-170008.
24. Poehlman W.L., Hsieh J.J., Feltus F.A. Linking binary gene relationships to drivers of renal cell carcinoma reveals convergent function in alternate tumor progression paths. *Sci Rep* 2019;9(1):2899. DOI: 10.1038/s41598-019-39875-y.
25. Huang Y., Wang J., Jia P. et al. Clonal architectures predict clinical outcome in clear cell renal cell carcinoma. *Nat Commun* 2019;10(1):1245. DOI: 10.1038/s41467-019-09241-7.
26. Högnér A., Krause H., Jandrig B. et al. PBRM1 and VHL expression correlate in human clear cell renal cell carcinoma with differential association with patient's overall survival. *Urol Oncol* 2018;36(3):94.e1–14. DOI: 10.1016/j.urolonc.2017.10.027.
27. Заридзе Д.Г., Мазуренко Н.Н., Бежанова С.Д. и др. Прогностическая роль экспрессии маркера PBRM1 при светлоклеточном раке почки. *Онкоурология* 2019;15(1):23–31. [Zaridze D.G., Mazurenko N.N., Bezhanova S.D. et al. Prognostic role of PBRM1 marker expression in clear-cell renal-cell carcinoma. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2019;15(1):23–31. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9776-2019-15-1-23-31.
28. Minervini G., Quaglia F., Tabaro F., Tosatto S.C.E. Insights into the molecular features of the von Hippel–Lindau-like protein. *Amino Acids* 2019;51(10–12):1461–74. DOI: 10.1007/s00726-019-02781-8.
29. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883–92. DOI: 10.1056/NEJMoa1113205.
30. Krassowski M., Paczkowska M., Cullion K. et al. Active Driver DB: human disease mutations and genome variation in post-translational modification sites of proteins. *Nucleic Acids Res* 2018;46(D1):D901–10. DOI: 10.1093/nar/gkx973.

Вклад авторов

Н.Н. Мазуренко: анализ полученных данных, обзор публикаций, написание текста и редактирование статьи;
 И.В. Цыганова: проведение генетических исследований;
 В.В. Стрельников: анализ результатов NGS, редактирование статьи;
 А.В. Балбуцкий: проведение генетического анализа;
 Т.Ф. Маливанова: проведение генетического анализа;
 Е.Б. Кузнецова: проведение NGS-исследования;
 В.А. Драудин-Крыленко: создание клинко-эпидемиологической базы данных;
 О.В. Шаньгина: создание клинко-эпидемиологической базы данных;
 А.Ф. Мукерия: создание клинко-эпидемиологической базы данных;
 В.Б. Матвеев: организация и предоставление клинического материала;
 Д.Г. Заридзе: разработка дизайна исследования, создание клинко-эпидемиологической базы данных, редактирование статьи.

Authors' contributions

N.N. Mazurenko: analysis of the obtained data, reviewing of publications, article writing, article editing;
 I.V. Tsyganova: genetic research;
 V.V. Strelnikov: analysis of NGS results, article editing;
 A.V. Balbutsky: genetic analysis;
 T.F. Malivanova: genetic analysis;
 E.B. Kuznetsova: NGS analysis;
 V.A. Draudin-Krilenko: creation of a clinical and epidemiological database;
 O.V. Shangina: creation of a clinical and epidemiological database;
 A.F. Mukeria: creation of a clinical and epidemiological database;
 V.B. Matveev: organization and provision of clinical material;
 D.G. Zaridze: study design development, creation of a clinical and epidemiological database, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.Н. Мазуренко / N.N. Mazurenko: <https://orcid.org/0000-0003-4767-6983>
 В.В. Стрельников / V.V. Strelnikov: <https://orcid.org/0000-0001-9283-902X>
 А.В. Балбуцкий / A.V. Balbutsky: <https://orcid.org/0000-0001-6809-3221>
 Т.Ф. Маливанова / T.F. Malivanova: <https://orcid.org/0000-0001-9699-2603>
 Е.Б. Кузнецова / E.B. Kuznetsova: <https://orcid.org/0000-0002-7857-6320>
 В.А. Драудин-Крыленко / V.A. Draudin-Krilenko: <https://orcid.org/0000-0003-2205-8345>
 О.В. Шаньгина / O.V. Shangina: <https://orcid.org/0000-0003-2431-068X>
 А.Ф. Мукерия / A.F. Mukeria: <https://orcid.org/0000-0002-6847-9295>
 В.Б. Матвеев / V.B. Matveev: <https://orcid.org/0000-0001-7748-9527>
 Д.Г. Заридзе / D.G. Zaridze: <https://orcid.org/0000-0002-2824-3704>

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

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

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

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

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

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

Эффект негативной регуляции эстрогенового сигналинга под действием экзосом: роль в развитии резистентности клеток рака молочной железы

Д.В. Сорокин, О.Е. Андреева, Е.И. Михеевич, Ю.Ю. Щеголев, А.М. Щербаков,
М.В. Гудкова, М.А. Красильников

НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24, стр. 15

Контакты: Михаил Александрович Красильников krasilnikovm1@yandex.ru

Наиболее эффективным методом лечения гормонозависимых опухолей молочной железы является использование антиэстрогенов группы SERM и ингибиторов ароматазы, однако их применение ограничивается постепенным развитием резистентности опухолей к препаратам.

Ранее мы продемонстрировали распространение гормональной резистентности от резистентных к чувствительным клеткам рака молочной железы в условиях совместного культивирования *in vitro* и установили непосредственное участие экзосом в этом процессе.

В настоящей работе мы показали, что экзосомы резистентных клеток вызывают существенное подавление эстрогенового сигналинга в клетках-реципиентах, и идентифицировали микроРНК, гиперэкспрессированные в экзосомах резистентных клеток и являющиеся ингибиторами рецептора эстрогенов ERα. Полученные результаты свидетельствуют о ключевой роли подавления эстрогенового сигналинга в распространении экзосоминдуцированной резистентности и об участии экзосомальных микроРНК в негативной регуляции ERα.

Ключевые слова: экзосомы, гормональная резистентность, микроРНК, рецептор эстрогенов ERα

Для цитирования: Сорокин Д.В., Андреева О.Е., Михеевич Е.И. и др. Эффект негативной регуляции эстрогенового сигналинга под действием экзосом: роль в развитии резистентности клеток рака молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(3):58–62.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-3-58-62



Effect of the exosome-mediated suppression of the estrogen signaling: the role in the progression of the hormonal resistance of breast cancer cells

D. V. Sorokin, O. E. Andreeva, E. I. Mikhaevich, Yu. Yu. Shchegolev, A. M. Scherbakov, M. V. Gudkova, M. A. Krasil'nikov

Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
Build. 15, 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

The most effective treatment of the hormone-dependent breast cancer is based on the antiestrogens SERM and aromatase inhibitor treatment, however its efficiency is limited by the acquired resistance to the drugs.

Previously we have revealed the effect of the transferring of the hormonal resistance from the resistant to the sensitive cells under *in vitro* cell co-cultivation, and demonstrated exosomes involvement in this process. Here we have shown that the exosomes of the resistant cells caused the marked inhibition of the estrogen signaling in the recipient cells, and identified microRNAs — ERα suppressors that overexpressed in the resistant exosomes.

Taken together, the results obtained demonstrate the important role of the estrogen signaling suppression in the exosome-induced transferring of the hormonal resistance, and revealed the involvement of the exosomal microRNA in the ERα down-regulation

Key words: exosomes, hormonal resistance, microRNAs, estrogen receptor ERα

For citation: Sorokin D.V., Andreeva O.E., Mikhaevich E.I. et al. Effect of the exosome-mediated suppression of the estrogen signaling: the role in the progression of the hormonal resistance of breast cancer cells. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2020;7(3):58–62. (In Russ.).

Экзосомы представляют собой микровезикулы размером 30–100 нм, продуцируемые клетками в окружающую среду и содержащие целый спектр биологически активных молекул, включая различные типы

РНК, ДНК, белков и липидов. Ключевая особенность экзосом — их способность проникать внутрь клеток-реципиентов, вызывая каскад изменений на геномном (за счет интеграции ДНК) и эпигеномном (за счет

изменения экспрессии/содержания белков, микроРНК и др.) уровнях.

Как известно, устойчивость к различного рода повреждающим и цитостатическим агентам является одной из универсальных характеристик злокачественных новообразований. Результаты последних исследований экзосом показали, что формирование резистентного фенотипа опухолевых клеток происходит в том числе с участием экзосом, которые могут обеспечивать распространение резистентности по всему пулу опухолевых клеток [1]. Развитие подобной индуцированной *de novo* резистентности напрямую связано с уникальным составом «резистентных» донорских экзосом. В разных случаях решающим фактором может служить накопление в экзосомах либо АВС-транспортеров, либо соответствующих микроРНК и матричных РНК, а скорее всего — комплекс этих факторов, что в итоге приводит к формированию и поддержанию резистентного фенотипа в клетках-реципиентах. Как показано в работах последних лет, экзосомы участвуют в распространении не только множественной лекарственной устойчивости, но и в развитии резистентности к препаратам направленного действия, в том числе к таргетным препаратам, гормональным соединениям.

Ранее мы показали возможность распространения резистентности на чувствительные клетки рака молочной железы в условиях совместного культивирования с резистентными клетками и продемонстрировали непосредственное участие экзосом в развитии приобретенной гормональной резистентности. Мы показали, что регулярное добавление к клеткам эстрогензависимого рака молочной железы MCF-7 экзосом, полученных от тамоксифенрезистентных клеток MCF-7/T, приводит к развитию частичной резистентности клеток MCF-7 к антиэстрогену тамоксифену. В то же время экзосомы, полученные от родительских клеток MCF-7, не обладают такой активностью, и их добавление не приводит к изменению гормональной чувствительности клеток [2]. Сравнительный анализ карго экзосом родительских и резистентных клеток выявил значительные изменения в составе протеома и профиля микроРНК экзосом резистентных клеток [3], однако вопрос о молекулярном механизме экзосом-индуцированной резистентности остается открытым.

Настоящие эксперименты были выполнены на культивируемых *in vitro* клетках рака молочной железы MCF-7 и резистентной сублинии MCF-7/T, полученной в результате длительного культивирования клеток родительской линии с антиэстрогеном тамоксифеном. Экзосомы выделяли из кондиционированной среды стандартным методом ультрацентрифугирования, для характеристики полученных препаратов применяли методы электронной микроскопии, анализ наночастиц (nanoparticle tracking analysis, NTA) и иммуноблоттинг, как было описано [2]. Транскрипционную активность рецептора эстрогенов ER α определяли

методом репортерного анализа с использованием плазмиды, содержащей ген люциферазы под контролем эстроген-респонсивного элемента (ERE) [4]. Анализ экзосомальной микроРНК был проведен ЗАО «Геноаналитика» (Москва, Россия) на секвенаторе HiSeq2500, минимальное число прочтений составило 5 млн на образец. Для экстракции микроРНК применяли набор реактивов PureLink RNA Micro Kit (#12183-016), подготовку библиотеки проводили с использованием NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina (E7330S). Синтез микроРНК-миметиков был выполнен ЗАО «Синтол», трансфекцию осуществляли стандартным методом в присутствии метафектена.

Мы показали, что культивирование клеток MCF-7 с экзосомами, полученными от резистентных клеток MCF-7/T, вызывает заметное подавление транскрипционной активности ER α , определяемого методом репортерного анализа, при этом экзосомы родительских клеток не приводят к подобным изменениям (рис. 1а). Эффект экзосомзависимого подавления ER был подтвержден независимым методом, по анализу экспрессии рецептора прогестерона — одного из ключевых эстрогензависимых белков: экзосомы резистентных, но не родительских клеток вызывали существенное снижение уровня прогестеронового рецептора в клетках (рис. 1б).

Для исследования возможного механизма экзосом-индуцированного подавления ER α был проведен сравнительный анализ профиля микроРНК экзосом родительских и резистентных клеток. В результате анализа идентифицировано более 400 микроРНК, гиперэкспрессированных в экзосомах резистентных клеток (табл. 1). Мы предположили, что одними из факторов, определяющих подавление эстрогенового сигналинга под действием «резистентных» экзосом, могут являться микроРНК, гиперэкспрессированные в экзосомах резистентных клеток и относящиеся к группе негативных регуляторов ER α . Действительно, биоинформатический анализ 471 микроРНК, гиперэкспрессированных в экзосомах резистентных клеток, выявил 6 микроРНК — супрессоров ER α (табл. 2). Методом репортерного анализа идентифицированные микроРНК были исследованы на предмет способности подавлять активность ER α . Полученные данные (рис. 2) продемонстрировали высокую ингибирующую активность как минимум 5 из 6 исследованных микроРНК.

Можно предположить, что экзосомы резистентных клеток, обогащенные микроРНК — супрессорами ER, вызывают развитие резистентности в клетках-реципиентах по такому же принципу, что и известные антигормональные препараты (антиэстрогены, ингибиторы ароматазы [5–7]). Действительно, хорошо известно, что длительное воздействие на опухоль таких препаратов приводит к развитию приобретенной резистентности, во многом как результат компенсаторной активации эстрогеннезависимых путей в условиях длительного блока эстрогенового сигналинга [8–10].

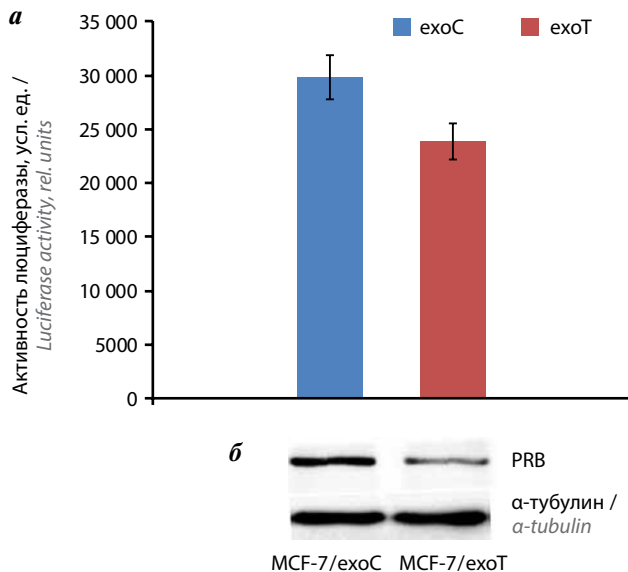


Рис. 1. Влияние экзосом клеток MCF-7 (exoC) и MCF-7/T (exoT) на транскрипционную активность ERα (а) и экспрессию рецептора прогестерона PRB (б). Активность ERα определяли методом репортерного анализа. Клетки трансфецировали ERE-плазмидой, содержащей ген люциферазы под контролем эстроген-респонсивного элемента [4], для контроля эффективности трансфекции использовали плазмиду, содержащую ген β-галактозидазы. Через 3 ч после трансфекции к клеткам добавляли препарат экзосом до концентрации 2 мкг/мл в присутствии 10 наноМ 17β-эстрадиола и через 24 ч определяли относительную активность люциферазы. Содержание рецептора прогестерона определяли методом иммуноблоттинга с антителами к рецептору прогестерона, для контроля содержания белка использовали гибридизацию с антителами к α-тубулину

Fig. 1. Influence of the exosomes of MCF-7 cells (exoC) and MCF-7/T cells (exoT) on the ERα transcriptional activity (a) and progesterone receptor PRB expression (b). ERα activity was determined by reporter analysis. Briefly, the cells were transfected with the ERE-plasmid encoding the luciferase gene under estrogen-responsive element [4], the efficiency of the transfection was controlled by the β-galactosidase plasmid transfection. After 3 hours the cells were treated with exosome preparations in the final concentration 2 μg/ml in the presence of 10 nM 17β-estradiol within 24 hours, and relative luciferase activity was measured according to manual. Progesterone receptor expression was determined by immunoblotting with antibody against progesterone receptor, the protein loading was controlled by the hybridization with tubulin antibody

Таблица 1. Сравнительный анализ микроРНК в клетках MCF-7/T и MCF-7

Table 1. Comparative analysis of the microRNA in the MCF-7/T and MCF-7 cells

Характеристика Characteristic	MCF-7/T vs MCF-7	
	Экзосомы Exosomes	Клетки Cells
Суммарный пул микроРНК Total microRNA	2589	2653
МикроРНК, гиперэкспрессированные в MCF-7/T vs MCF-7 MicroRNA overexpressed in MCF-7/T vs MCF-7	471	146
Гиперэкспрессированные микроРНК, общие для экзосом и клеток MCF-7/T Common microRNA overexpressed in the MCF-7/T exosomes and cells	21	

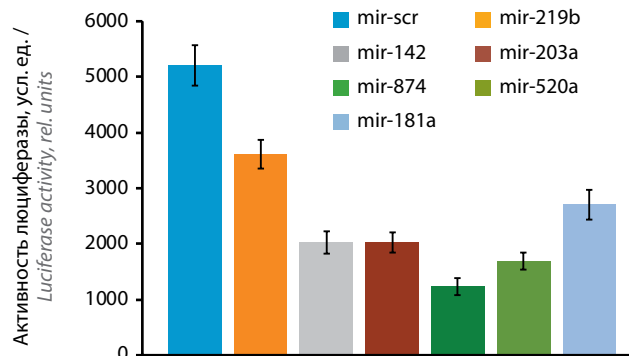


Рис. 2. Влияние микроРНК на транскрипционную активность ERα. Активность ERα определяли методом репортерного анализа, как описано в подписи к рис. 1. Через 3 ч после трансфекции ERE-плазмидой клетки трансфецировали соответствующими микроРНК-миметиками, культивировали 24 ч в присутствии 10 наноМ 17β-эстрадиола и определяли относительную активность люциферазы в клетках

Fig. 2. MicroRNA influence on the ERα transcriptional activity. ERα activity was determined by the reporter analysis as described in Fig. 1. 3 hours after ERE plasmid transfection the cells were transfected with the respective microRNA mimetics following with the cultivation within 24 hours in the presence of 10 nM 17β-estradiol, and relative luciferase activity in the cells was measured according to manual

Таблица 2. Экзосомальные микроРНК — супрессоры ERα

Table 2. Exosomal microRNA — ERα suppressors

МикроРНК — супрессоры ERα, гиперэкспрессированные в экзосомах MCF-7/T MicroRNA — ERα suppressors overexpressed in the MCF-7/T exosomes	Уровень активации микроРНК MicroRNA fold activation
142-3p	2
203a-3p	2
219b-5p	3
520a-3p	5
874-3p	4
181a	2

Собственно, именно так и была получена тамоксифенрезистентная сублиния MCF-7/T, на которой проводились настоящие эксперименты [11]. В данной работе мы показали, что экзосомы резистентных клеток вызывают существенное подавление эстрогенового сигналинга, и выявили микроРНК, гиперэкспрессированные в резистентных экзосомах и являющиеся ингибиторами ERα. Полученные результаты свидетельствуют в пользу предположения об универсальном механизме развития приобретенной резистентности, в основе которого как в случаях с резистентностью к антигормональным препаратам, так и в случаях с экзосоминдуцированной резистентностью лежит подавление эстрогенового сигналинга. С учетом известной плейотропности, многообразия мишеней микроРНК можно предположить, что микроРНК экзосом резистентных клеток не только подавляют эстрогеновый

сигналинг, но и участвуют в активации эстрогеннезависимого ростового сигналинга. В пользу такого предположения свидетельствует ранее продемонстрированная нами и другими авторами способность микроРНК-181, одного из супрессоров ER, одновременно активировать PI3K/Akt-сигнальный путь [12–14].

Вопрос о том, каким образом формируется столь специфический состав экзосом резистентных клеток, во многом остается открытым. При сравнении профиля микроРНК экзосом и самих клеток-продуцентов

оказалось, что из 471 микроРНК, гиперэкспрессированной в экзосомах резистентных клеток, только 21 микроРНК отличается повышенным содержанием в резистентных клетках, что свидетельствует о специфическом сортинге микроРНК в экзосомы (см. табл. 1). Мы рассчитываем, что последующие исследования позволят установить механизм специфического отбора микроРНК в экзосомы и оценить роль каждой из микроРНК – супрессоров ER в развитии экзосоминдуцированной резистентности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Семина С.Е., Руденская Е.А., Миттенберг А.Г. и др. Экзосомы и развитие резистентности опухолевых клеток к метформину: пилотное исследование. Успехи молекулярной онкологии 2017;4(3):92–8. [Semina S.E., Rudenskaya E.A., Mittenberg A.G. et al. Exosomes and development of cancer cell resistance to metformin: pilot study. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2017;4(3):92–8. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-92-98.
2. Semina S.E., Scherbakov A.M., Vnukova A.A. et al. Exosome-mediated transfer of cancer cell resistance to anti-estrogen drugs. *Molecules* 2018;23(4):829. DOI: 10.3390/molecules23040829.
3. Семина С.Е., Барлев Н.А., Миттенберг А.Г., Красильников М.А. Сравнительный анализ экзосом клеток эстроген-резистентного рака молочной железы. Сибирский онкологический журнал 2018;17(4):36–40. [Semina S.E., Barlev N.A., Mittenberg A.G., Krasil'nikov M.A. Comparative analysis of the exosomal cargo of the estrogen-resistant breast cancer cells. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2018;17(4):36–40. (In Russ.)]. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-4-36-40.
4. Reid G., Hubner M.R., Metivier R. et al. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 2003;11(3):695–707. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00090-x.
5. McAndrew N.P., Finn R.S. Management of ER positive metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 2020. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2020.07.005.
6. Spinello A., Ritacco I., Magistrato A. Recent advances in computational design of potent aromatase inhibitors: open-eye on endocrine-resistant breast cancers. *Expert Opin Drug Discov* 2019;14(10):1065–76. DOI: 10.1080/17460441.2019.1646245.
7. El Sayed R., El Jamal L., El Iskandarani S. et al. Endocrine and targeted therapy for hormone-receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer: insights to sequencing treatment and overcoming resistance based on clinical trials. *Front Oncol* 2019;9:510. DOI: 10.3389/fonc.2019.00510.
8. Clarke R., Tyson J.J., Dixon J.M. Endocrine resistance in breast cancer – an overview and update. *Mol Cell Endocrinol* 2015;418(Pt 3(0–3)):220–34. DOI: 10.1016/j.mce.2015.09.035.
9. Suba Z. The pitfall of the transient, inconsistent anticancer capacity of antiestrogens and the mechanism of apparent antiestrogen resistance. *Drug Design, Develop Ther* 2015;9:4341–53. DOI: 10.2147/dddt.s89536.
10. Viedma-Rodríguez R., Baiza-Gutman L., Salamanca-Gómez F. et al. Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (review). *Oncol Rep* 2014;32(1):3–15. DOI: 10.3892/or.2014.3190.
11. Semina S.E., Scherbakov A.M., Kovalev S.V. et al. Horizontal transfer of tamoxifen resistance in MCF-7 cell derivatives: proteome study. *Cancer Invest* 2017;35(8):506–18. DOI: 10.1080/07357907.2017.1368081.
12. Shchegolev Y., Sorokin D., Scherbakov A. et al. Upregulation of Akt/Raptor signaling is associated with rapamycin resistance of breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2020;330:109243. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109243.
13. Zhang W.L., Zhang J.H. miR-181c promotes proliferation via suppressing PTEN expression in inflammatory breast cancer. *Int J Oncol* 2015;46(5):2011–20. DOI: 10.3892/ijo.2015.2896.
14. Zhuang L., Qu H., Cong J. et al. MiR-181c affects estrogen-dependent endometrial carcinoma cell growth by targeting PTEN. *Endocr J* 2019;66(6):523–33. DOI: 10.1507/endocrj.EJ18-0538.

Благодарность. Авторы выражают благодарность G. Reid и F. Gannon за предоставление репортерной плазмиды ERE-TK-LUC [4].

Acknowledgment. Authors express thanks to G. Reid и F. Gannon for the providing the reporter plasmid ERE-TK-LUC [4].

Вклад авторов

Д.В. Сорокин: работа с клетками, иммуноблоттинг;

О.Е. Андреева: работа с плазмидами и микроРНК;

Е.И. Михеевич: выделение экзосом;

Ю.Ю. Щеголев: характеристика препаратов экзосом;

А.М. Щербakov: работа с литературой, подготовка рукописи к печати;

М.В. Гудкова: подготовка рукописи к печати;

М.А. Красильников: общее руководство экспериментальной работой, написание текста статьи, анализ данных.

Authors' contributions

D.V. Sorokin: work with cells, immunoblotting;

O.E. Andreeva: work with plasmids and microRNA;

E.I. Mikhaevich: exosome isolation;
Yu.Yu. Shchegolev: characterization of exosome preparations;
A.M. Scherbakov: working with literature, preparing a manuscript for printing;
M.V. Gudkova: preparing a manuscript for printing;
M.A. Krasil'nikov: general guidance of experimental work, article writing, analysis of the data.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.В. Сорокин / D.V. Sorokin: <https://orcid.org/0000-0002-1264-7405>
О.Е. Андреева / O.E. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0002-6015-6619>
Е.И. Михеевич / E.I. Mikhaevich: <https://orcid.org/0000-0002-1299-9080>
Ю.Ю. Щеголев / Yu.Yu. Shchegolev: <https://orcid.org/0000-0002-1490-6781>
А.М. Щербаков / A.M. Scherbakov: <https://orcid.org/0000-0002-2974-9555>
М.В. Гудкова / M.V. Gudkova: <https://orcid.org/0000-0003-2694-5232>
М.А. Красильников / M.A. Krasil'nikov: <https://orcid.org/0000-0002-5902-7633>

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

Финансирование. Исследование проведено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-09016).
Financing. The study was performed with the support of Russian Foundation for Basic Research (project No. 18-29-09016).