

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Ассоциированные с опухолью
макрофаги в развитии
рака мочевого пузыря*

*Статины в лечении
нейрофиброматоза 1-го типа*

*Методы детекции
однонуклеотидных соматических
мутаций в препаратах
опухолевой цДНК*

*Детерминанты ферроптоза –
потенциальные терапевтические
мишени глиобластом*

*Мутационный профиль диффузной
В-крупноклеточной лимфомы*

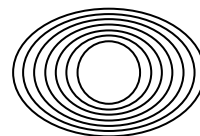


Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук. Журнал включен в Научную электронную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

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



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

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

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

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

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

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

ТОМ 9
3'22

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 И.В. Пучкова
Корректор Е.С. Самойлова
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.
2022. Том 9. № 3. 1–88.
Сдано в печать: 20.09.2022.
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2022.
Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562.
Отпечатано в типографии
«Мэйл Текнолоджи».
105082, Москва, Переведеновский
пер., 13, стр. 16.
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» (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина) Минздрава России, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза (НИИ канцерогенеза) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующий отделом экспериментальной биологии опухолей (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

Карамышева Анда Фуадовна, д.б.н., заведующая лабораторией генетики опухолевых клеток 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)

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

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)

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

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

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

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

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

Щербаков Александр Михайлович, старший научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией онкопротеомики отдела экспериментальной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Белицкий Геннадий Альтерович, д.м.н., профессор, 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)

Заридзе 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)

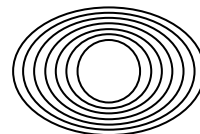
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

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 Scopus data base, CrossRef, its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

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

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

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



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

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

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

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

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

FOUNDED IN 2014

3^{Vol. 9}
'22

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, Bld. 15
24 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 I.V. Puchkova
Proofreader E.S. Samoylova
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
(PII No. ΦC77-57560
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.
2022. Vol. 9 No. 3. 1–88.

Submitted: 20.09.2022.

© PH "ABV-Press", 2022
Pressa Rossii catalogue index: 93562.

Printed at the Mail Technology Ltd
Bld. 16, 13 Perevedenovsky lane,
Moscow 105082.

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 Scientific Center of Roentgenoradiology of the Ministry of Health of Russia, Honored Doctor of the Russian Federation (Moscow, Russia)

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

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

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

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

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

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

Karamysheva Aida F., DSci, PhD, Head of the Laboratory of the Genetics of Tumor Cells 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)

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

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

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

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

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

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

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

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

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)

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

- В.Н. Павлов, М.Ф. Урманцев, Ю.А. Корелов, М.Р. Бакеев*
Значение макрофагов, ассоциированных с опухолью, в развитии рака мочевого пузыря 8
- Р.Н. Мустафин*
Перспективы применения статинов в лечении нейрофиброматоза 1-го типа 15

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Л.М. Дьяков, О.М. Кривцова, П.А. Хесина, И.Ф. Кустова, Н.А. Дьякова, Н.С. Мюге, Н.Е. Кудашкин, Ю.И. Патютко, Н.Л. Лазаревич*
Методы детекции специфических для опухолевой ткани однонуклеотидных соматических мутаций в препаратах цДНК из плазмы крови 24
- Н.В. Юнусова, Д.А. Сваровский, Е.Э. Дандарова, Д.Н. Костромицкий, А.А. Димча, О.В. Черемисина, С.Г. Афанасьев, А.И. Коновалов, Ж.А. Старцева, И.В. Кондакова, М.Р. Патышева, А.Е. Григорьева, Л.В. Спирина*
Матриксные металлопротеиназы и белки теплового шока на внеклеточных везикулах у больных колоректальным раком: связь с метаболическим статусом 38
- К.В. Смирнова, Н.Б. Сенюта, А.К. Лубенская, И.В. Ботезату, Т.Е. Душенькина, А.В. Лихтенштейн, В.Э. Гурцевич*
Вирус Эпштейна—Барр у адыгейцев и славян в России: типы вируса, варианты *LMP1* и злокачественные новообразования 49
- В.Е. Шевченко, З.Н. Никифорова, Т.И. Кушнир, И.А. Кудрявцев, А.А. Митрофанов, А.Х. Бекашев, Н.Е. Арноцкая*
Детерминанты ферроптоза — потенциальные терапевтические мишени стволовых клеток глиобластомы 60
- Е.Н. Воропаева, Т.И. Поспелова, В.С. Карпова, М.И. Чуркина, Ю.В. Вяткин, Т.А. Агеева, В.Н. Максимов*
Мутационный профиль диффузной В-крупноклеточной лимфомы с рецидивами в центральной нервной системе 69

ЮБИЛЕЙ

- К 95-летию профессора Н.В. Мяснцевой 85

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ 87

REVIEWS

- V.N. Pavlov, M.F. Urmantsev, Yu.A. Korelov, M.R. Bakeev*
Significance of tumor-associated macrophages in bladder cancer development 8
- R.N. Mustafin*
Prospects for the use of statins in the treatment of neurofibromatosis type 1 15

EXPERIMENTAL REPORTS

- L.M. Dyakov, O.M. Krivtsova, P.A. Khesina, I.F. Kustova, N.A. Dyakova, N.S. Muge, N.E. Kudashkin, Yu.I. Patyutko, N.L. Lazarevich*
Methods for the detection of tumor-specific single nucleotide somatic mutations in plasma cDNA samples 24
- N.V. Yunusova, D.A. Svarovsky, E.E. Dandarova, D.N. Kostromitsky, A.A. Dimcha, O.V. Cheremisina, S.G. Afanasiev, A.I. Kononov, Z.A. Startseva, I.V. Kondakova, M.R. Patysheva, A.E. Grigor'eva, L.V. Spirina*
Matrix metalloproteinases and heat shock proteins on extracellular vesicles in colorectal cancer patients: association with metabolic status 38
- K.V. Smirnova, N.B. Senyuta, A.K. Lubenskaya, I.V. Botezatu, T.E. Dushenkina, A.V. Lichtenstein, V.E. Gurtsevich*
Epstein–Barr virus in Adygeans and Slavs in Russia: virus types, *LMP1* variants, and malignant tumors 49
- V.E. Shevchenko, Z.N. Nikiforova, T.I. Kushnir, I.A. Kudryavtsev, A.A. Mitrofanov, A.Kh. Bekyashev, N.E. Arnotskaya*
Ferroptosis determinants – potential therapeutic targets glioblastoma stem cells 60
- E.N. Voropaeva, T.I. Pospelova, V.S. Karpova, M.I. Churkina, Yu.V. Vyatkin, T.A. Ageeva, V.N. Maksimov*
Mutation profile of diffuse large B-cell lymphoma with relapses in the central nervous system 69

JUBILEE

- To the 95th anniversary of Professor N.V. Myasishcheva** 85

INFORMATION FOR AUTHORS 87

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-8-14



Значение макрофагов, ассоциированных с опухолью, в развитии рака мочевого пузыря

В.Н. Павлов, М.Ф. Урманцев, Ю.А. Корелов, М.Р. Бакеев*ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, Республика Башкортостан, 450008 Уфа, ул. Ленина, 3***Контакты:** Валентин Николаевич Павлов pavlov@bashgmu.ru

Рак мочевого пузыря занимает 2-е место в структуре онкоурологических заболеваний во всем мире. Выделяют мышечно-инвазивную и немышечно-инвазивную формы опухоли. В последнее время большое внимание уделяется изучению микроокружения опухоли (МО) при злокачественных новообразованиях мочевого пузыря. Согласно имеющимся на сегодняшний день данным, МО представляет собой специфическую среду, создающую оптимальные условия для канцерогенеза в неопластическом очаге. Основными частями МО являются внеклеточный матрикс и строма, которая включает сосуды, стромальные и иммунные клетки. Помимо данных структур в состав МО входят цитокины, хемокины и другие соединения, способные обеспечивать активацию необходимых для опухолевых клеток сигнальных путей. Макрофаги, ассоциированные с опухолью (MAO), – активно изучаемые представители МО при солидных злокачественных новообразованиях различных локализаций. Эти макрофаги подразделяют на 2 фенотипа: M1 (провоспалительные и противоопухолевые) и M2 (противовоспалительные и проопухолевые). Роль каждого фенотипа различна, при этом макрофаги M2 участвуют в регуляции важнейших процессов онкогенеза (инвазии, пролиферации, неоангиогенезе и т. д.). В аспекте изучения рака мочевого пузыря наибольшую значимость имеют макрофаги M2, которые являются самыми многочисленными представителями MAO в составе МО.

Цель исследования – изучение роли макрофагов, ассоциированных с опухолью, в развитии злокачественных опухолей мочевого пузыря, а также их прогностической ценности.

Ключевые слова: макрофаги, ассоциированные с опухолью, мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря, немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря, микроокружение опухоли, канцерогенез

Для цитирования: Павлов В.Н., Урманцев М.Ф., Корелов Ю.А., Бакеев М.Р. Значение макрофагов, ассоциированных с опухолью, в развитии рака мочевого пузыря. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(3):8–14. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-8-14

Significance of tumor-associated macrophages in bladder cancer development

V.N. Pavlov, M.F. Urmantsev, Yu.A. Korelov, M.R. Bakeev*Bashkir State Medical University, Ministry of Health of Russia; 3 Lenin St., Ufa 450008, Republic of Bashkortostan, Russia***Contacts:** Valentin Nikolaevich Pavlov pavlov@bashgmu.ru

Bladder cancer is the 2nd most common urological oncological disease in the worlds. Tumors can be muscle invasive and non-muscle invasive. Recently, tumor microenvironment (TME) became a focus of investigation in malignant tumors of the bladder. According to the currently available data, TME is a specific environment crating optimal conditions for carcinogenesis in the neoplastic lesion. The main parts of TME are extracellular matrix and stroma including vasculature, stromal, and immune cells. Additionally, TME includes cytokines, chemokines, and other compounds activating signal pathways necessary for tumor cells. Tumor-associated macrophages (TAMs) are being extensively studied as representatives of TME in solid tumors of varying locations. These macrophages can be classified into 2 phenotypes: M1 (pro-inflammatory and antitumor) and M2 (anti-inflammatory and protumor). The phenotypes perform different roles, and M2 macrophages regulate the most important processes of oncogenesis (invasion, proliferation, neoangiogenesis, etc.). In the context of bladder cancer, M2 macrophages are the most significant as they are the most numerous TAMs in TME.

Aim. To study the role of tumor-associated macrophages in development of bladder tumors, as well as prognostic value of these macrophages.

Keywords: tumor associated macrophages, muscle-invasive bladder cancer, non- muscle-invasive bladder cancer, tumor microenvironment, cancerogenesis

For citation: Pavlov V.N., Urmantsev M.F., Korelov Yu.A., Bakeev M.R. Significance of tumor-associated macrophages in bladder cancer development. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(3):8–14. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-8-14

ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря (РМП) является одной из самых распространенных форм злокачественных новообразований мочевыделительной системы и занимает 2-е место в структуре онкоурологических заболеваний во всем мире. Ежегодно диагностируются более 400 тыс. новых случаев этой патологии [1]. Морфологически большинство опухолей представлены переходно-клеточным (уротелиальным) раком, но также встречаются плоскоклеточные формы и аденокарциномы. С клинической точки зрения удобнее выделять 2 формы РМП: немышечно-инвазивный (НМИРМП) и мышечно-инвазивный (МИРМП). Немышечно-инвазивный РМП соответствует стадиям Ta, Tis, T1 и диагностируется примерно в 80 % случаев этого заболевания. При злокачественных новообразованиях данной формы эффективно как медикаментозное, так и оперативное лечение, в результате которого увеличивается период ремиссии и улучшаются показатели выживаемости. В 20 % случаев выявляется МИРМП, который соответствует стадиям T2–4 и тяжелее поддается консервативной терапии [2]. Для МИРМП характерна высокая агрессивность, проявляющаяся ускоренной опухолевой инвазией и быстрым развитием метастазов [3–5]. Наиболее адекватным методом лечения этой патологии служит радикальная цистэктомия с последующей адъювантной терапией.

В канцерогенезе солидного новообразования любой локализации большое значение имеет микроокружение опухоли (МО), которое представлено своеобразной клеточно-стромальной ассоциацией, обеспечивающей развитие неоплазии. Как правило, микроокружение включает в себя питающие опухоль сосуды, иммунные, стромальные, про- и противовоспалительные клетки, а также клетки миелоидного ряда и др. Помимо цитологических популяций МО состоит из внеклеточного матрикса, обеспечивающего достаточный уровень жизнеобеспечения злокачественных клеток. Немалую роль в канцерогенезе играют сигнальные молекулы и факторы роста, выступающие в качестве лигандов, запускающих процессы опухолевой трансформации, адгезии, инвазии и др. [6].

Микроокружение РМП состоит преимущественно из опухолевых клеток, стромы и инфильтрирующих иммунных клеток. Иммунные клетки в МО могут оказывать как опухоль-супрессивное, так и опухоль-стимулирующее действие. CD8⁺-Т- и NK-клетки опосредуют противоопухолевые функции, тогда как ассоциированные с опухолью макрофаги и регуляторные Т-клетки, наоборот, обладают проопухолевой активностью [7, 8]. Различия клинического течения и ответа на лечение при НМИРМП и МИРМП обусловлены

уровнем агрессивности каждой опухоли. За последнее время получено достаточное количество данных, показывающих значительное влияние МО и опухолеассоциированных клеток на развитие этих форм РМП [9–11]. Изучение закономерностей канцерогенеза позволит улучшить диагностику НМИРМП и МИРМП и разработать эффективные методы лечения этих заболеваний.

Цель исследования — изучение роли макрофагов, ассоциированных с опухолью, в развитии злокачественных опухолей мочевого пузыря, а также их прогностической ценности.

ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫЕ МАКРОФАГИ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ, ЭТИОЛОГИЯ, КЛАССИФИКАЦИЯ, ФУНКЦИИ

Макрофаги являются огромной клеточной популяцией, рассеянной по всему организму и участвующей в различных патологических процессах. Основные функции макрофагов — фагоцитоз и элиминация чужеродных агентов, погибших клеток и т.д. [12, 13]. После получения провоспалительных сигналов от опухолевых клеток макрофаги дифференцируются в опухолеассоциированные. Согласно последним данным, макрофаги, ассоциированные с опухолью (МАО), происходят из моноцитов красного костного мозга [14]. Однако в глиомах и раке поджелудочной железы МАО могут происходить из эмбриональных макрофагов, особенно из макрофагов, депонированных в желточном мешке [15]. Эти макрофаги могут достигать до 50 % всех клеток МО и принимают значительное участие в процессах канцерогенеза [16]. Все МАО условно подразделяют на 2 фенотипа — М1 и М2, что отражает способ их активации [17]. Макрофаги М1 обладают провоспалительным фенотипом, а М2 — противовоспалительным. Также внутри популяции макрофаги М2 дифференцируются на подтипы: М2a, М2b, М2c и М2d [18].

Макрофаги М1 являются классически активированными макрофагами, которые приобретают свои свойства благодаря интерферону гамма (ИНФ-γ) [19], иммуностимулирующим цитокинам интерлейкину 12 (ИЛ-12) и интерлейкину 23 (ИЛ-23), а также другим провоспалительным цитокинам [15]. Макрофаги М1 обладают бактерицидной активностью и участвуют в элиминации микроорганизмов. В МО данные клетки отвечают за индукцию Th1 иммунного ответа, который может обеспечивать их противоопухолевую активность [20]. Клетки фенотипа М2 относятся к альтернативно активированным макрофагам и индуцируются за счет влияния интерлейкина 4 (ИЛ-4) и интерлейкина 13 (ИЛ-13). Макрофаги М2 способствуют

элиминации чужеродных и токсических агентов, секретируют антагонисты рецепторов интерлейкина 1 (ИЛ-1) и различные хемокины. Данные клетки активно участвуют в экспрессии аргиназы, рецепторов маннозы и SR-рецепторов (скавенджер-рецепторов). Макрофаги M2 в основном индуцируют Th2 иммунный ответ, обладают низкой антигенпрезентирующей способностью [21], участвуют в процессе роста клеток, ангиогенезе, иммуносупрессии и репарации тканей [22]. Благодаря всем вышеперечисленным функциям макрофаги M2 могут способствовать развитию злокачественных новообразований.

Макрофаги, ассоциированные с опухолью, могут снижать активность Т-лимфоцитов с помощью секреции иммуносупрессивных цитокинов и медиаторов воспаления, таких как интерлейкин 10 (ИЛ-10), трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor β , TGF- β), простагландин E_2 и матричная металлопротеиназа 7 (ММР-7). В связи с этим Т-лимфоциты теряют способность идентифицировать и уничтожать опухолевые клетки, которые участвуют в уклонении от иммунного ответа [23]. Трансформирующий фактор роста β и ИЛ-10 также вносят значительный вклад в создание иммуносупрессивной среды опухоли [24].

В большинстве опухолей МАО преимущественно представлены макрофагами M2, которые относятся к подтипу M2d [15]. В процессе роста и развития злокачественного новообразования находящиеся в строме макрофаги M1 способствуют Th1-зависимой иммунной реакции и вызывают торможение развития опухолевых клеток. В случае прогрессирования опухоли МАО фенотипа M1 трансформируются в МАО фенотипа M2 (ИЛ-12_{низкий}, ИЛ-10_{высокий}) [25]. Такие изменения способствуют инвазии, ангиогенезу и метастазированию злокачественного новообразования [21].

На всех этапах развития опухоли требуются питательные вещества и кислород, которые доставляются к опухолевым клеткам по кровеносным сосудам. Также с помощью сосудов осуществляется метастазирование, что имеет большое значение для прогрессирования новообразования [26]. Для обеспечения всех потребностей опухоли МО ремоделирует сосудистую сеть и активирует неоангиогенез. Макрофаги, ассоциированные с опухолью, участвуют в регуляции данных процессов с помощью секреции факторов роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factors, VEGF), роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF), роста тромбоцитов (platelet-derived growth factor, PDGF), роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor, HGF) и роста плаценты (placenta growth factor, PLGF) [27].

ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫЕ МАКРОФАГИ И РАК МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Микроокружение опухоли при РМП, как и при других неоплазиях, имеет большое значение для роста злокачественного образования и развития патологического процесса. В последние десятилетия проведено

много клинических исследований, направленных на изучение МО при РМП, что связано с ежегодным ростом заболеваемости опухолями мочевыделительной системы. Согласно последним данным, в ядре и строме НМИРМП и МИРМП присутствуют МАО, большинство из которых представлены макрофагами M2 [28–30]. Макрофаги M1 в МО при РМП встречаются редко. Так, согласно результатам исследования S. Qiu и соавт., в полученных из РМП МАО выявлены высокие уровни экспрессии CD206, Arg-1, ИЛ-10 и TGF- β . Представленные соединения характерны для макрофагов M2 [31]. Макрофаги, ассоциированные с опухолью, при РМП идентифицируют по экспрессии поверхностного маркера CD68 [32].

Клетки РМП принимают участие в рекрутинге макрофагов. Имеются сведения о том, что при РМП опухолевые клетки с высоким уровнем CD14 активно синтезируют интерлейкин 6 (ИЛ-6), интерлейкин 8 (ИЛ-8), CXCL5, CXCL1, CXCL2, VEGF-A и FGF-2 [33]. Данные соединения обеспечивают хемотаксис макрофагов в опухолевый очаг. Также отмечено, что при РМП инфильтрация МАО больше в опухолях с высокой экспрессией фактора, индуцируемого гипоксией 1- α (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1 α) или HIF-2 α [32]. Как известно, клетки РМП могут влиять на трансформацию макрофагов M1 в макрофаги M2. Опухолевые клетки секретируют ИЛ-10, различные продукты метаболизма, факторы роста и хемокины, за счет чего МАО экспрессируют CD206, CD163, лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) и ИЛ-10, приобретая проопухолевый и иммуносупрессивный фенотипы [34–38].

Взаимоотношения между РМП и МАО не ограничиваются повышением концентрации последних в МО. Доминирующие макрофаги M2 принимают активное участие в прогрессировании опухоли и способствуют повышению пролиферативной активности клеток РМП за счет секреции CXCL1 и коллагена типа I [39]. Макрофаги, ассоциированные с опухолью, стимулируют ангиогенез вследствие секреции VEGF и воздействия на клетки РМП, которые начинают продуцировать проангиогенные сигналы [40–42]. Макрофаги M2 увеличивают лимфангиогенез с помощью синтеза VEGF-C/D [43], а также обеспечивают метастазирование, индуцируя инвазию опухолевых клеток за счет продукции CXCL8 и остеопонтина [41, 44, 45]. Наконец, эти макрофаги способствуют прогрессированию опухоли благодаря своей способности ингибировать противоопухолевый иммунитет. Данные сведения указывают на то, что макрофаги повышают агрессивность РМП, а значит, могут участвовать в переходе НМИРМП в МИРМП.

С каждым годом проводится все больше исследований, направленных на изучение иммунного ландшафта МО при злокачественных новообразованиях мочевого пузыря. При этом устанавливаются тесные

связи между МАО и клетками РМП. Макрофаги M2 занимают одну из центральных позиций в канцерогенезе НМИРМП и МИРМП, что не исключает использования этих клеток в качестве мишеней для таргетной терапии. Микроокружение опухоли создает условия для существования и развития опухоли, воздействуя на которые можно добиться регрессии злокачественного процесса. Исследование МО и МАО перед началом лечения может помочь в выборе вида хирургического вмешательства, определении целесообразности радикальных операций, ожидаемых результатов в послеоперационном периоде. В связи с этим в настоящее время МАО интенсивно изучаются как маркеры прогноза РМП.

МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛИ ПРИ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ И ПРИМЕНЕНИЕ ВНУТРИПУЗЫРНОЙ ТЕРАПИИ БАЦИЛЛОЙ КАЛЬМЕТТА–ГЕРЕНА

На протяжении последних десятилетий при НМИРМП успешно используется внутрипузырная терапия бациллой Кальметта–Герена (БЦЖ). В начале применения ее терапевтическая эффективность не была подкреплена фундаментальными представлениями о механизмах противоопухолевого действия данного метода. В настоящее время благоприятные ответы на лечение вакциной БЦЖ обуславливают иммунокомпетентными клетками, входящими в состав МО. Имеются данные, что опухолевые клетки РМП и уротелиальные клетки способствуют прикреплению БЦЖ к эпителию и формированию локального иммунного ответа. В результате иммунные клетки мигрируют в патологический очаг и происходят их дифференцировка и активация [46]. Представителями МО, обуславливающими эффективность терапии БЦЖ, являются CD4⁺- и CD8⁺-лимфоциты, NK-клетки, гранулоциты, макрофаги и дендритные клетки [47], оказывающие непосредственное цитотоксическое действие на РМП. Также немаловажное значение для эффективности лечения вакциной БЦЖ имеют цитокины, секретируемые в МО и оказывающие противоопухолевое действие. В связи с этим при данной терапии описано действие TRAIL (лиганд из семейства факторов некроза опухолей, вызывающий апоптоз) [48], интерлейкина 2 (ИЛ-2), ИЛ-8, ИЛ-12, интерлейкина 18 (ИЛ-18), ИНФ-γ и фактора некроза опухоли α (ФНО-α) [47]. Таким образом, МО может способствовать подавлению опухолевой прогрессии при РМП.

ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫЕ МАКРОФАГИ КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Течение опухолевого процесса определяется количеством МАО и тем, к каким иммунологическим категориям они относятся. В ряде исследований было проанализировано соотношение уровней макрофагов со стадиями, степенью агрессивности опухоли

(НМИРМП и МИРМП) и выживаемостью пациентов с РМП. Стоит отметить, что наличие МАО коррелирует с неблагоприятными клиническими исходами при РМП. Кроме того, присутствие этих макрофагов связано с развитием рецидивов опухоли у пациентов с НМИРМП [49]. У больных как НМИРМП, так и МИРМП наличие большого количества МАО ассоциировано с высоким риском прогрессирования опухоли [50, 51], а также с худшими показателями безрецидивной и общей выживаемости [30, 52].

Согласно данным G. Sjö Dahl и соавт., высокое соотношение CD68/CD3 коррелирует с плохим прогнозом у пациентов с МИРМП [53]. В то же время S.Q. Wu и соавт. по результатам проведенного метаанализа пришли к выводу, что высокие показатели экспрессии CD68 среди МАО не имели значимой корреляции с прогнозом пациентов с РМП, но высокие уровни CD163 соответствовали низкому уровню безрецидивной выживаемости [54]. M.B. Maniecki и соавт. выявили, что экспрессия матричной РНК CD163 в биоптатах РМП связана с поздними стадиями заболевания, высокой агрессивностью опухоли и низкими показателями общей выживаемости. Более того, повышенная инфильтрация МАО CD163⁺ была ассоциирована с поздней стадией РМП [55]. F. Aljabery и соавт. [56] проанализировали образцы МИРМП после цистэктомии с помощью иммуногистохимического исследования и обнаружили, что инфильтрация опухоли макрофагами M2 не коррелирует со стадией РМП. B. Wang и соавт. сообщили, что большое значение имеет локализация МАО в опухолевой ткани. Преобладание количества макрофагов M2 в строме опухоли по сравнению с ядром положительно коррелирует со стадией РМП [29]. Одно из крупнейших исследований по данной теме было проведено Y. Xue и соавт. Авторы поставили цель изучить влияние МАО на развитие РМП, используя данные секвенирования РНК из базы The Cancer Genome Atlas (TCGA). Они проанализировали 426 генотипов и пришли к интересным выводам: макрофаги M2 усиленно инфильтрируют агрессивные формы РМП и являются самыми многочисленными представителями МАО при РМП. В ходе дальнейшего изучения влияния МАО на развитие МИРМП и НМИРМП было установлено, что плохой прогноз (снижение показателей общей выживаемости) при данных заболеваниях коррелирует с высоким уровнем макрофагов M2 [7].

Особый интерес представляет соответствие уровней МАО и проведенных радикальных цистэктомий в группе пациентов с РМП. T. Hanada и соавт. в своем исследовании продемонстрировали достоверную корреляцию между уровнями МАО и количеством таких операций. Также было отмечено, что после трансуретральной резекции мочевого пузыря уровни МАО были значительно ниже, чем после радикальной цистэктомии [57]. Определенные иммунологические типы МАО, выявляемые в РМП, коррелируют с низкими

показателями выживаемости после радикальной цистэктомии. К таким макрофагам относятся MAC387⁺ [50] и HIF-2 α ⁺ [58]. Имеются сведения, что увеличение количества CD169⁺-макрофагов M1 в регионарных лимфатических узлах (но не в самой опухоли) ассоциировано с благоприятным прогнозом у пациентов с МИРМП [29, 59].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Макрофаги, ассоциированные с опухолью, представляют большой интерес для практической онкологии. Являясь важными участниками всех этапов канцерогенеза, они расширяют границы понимания процессов опухолевого прогрессирования. В аспекте значимости для РМП можно сделать вывод об одной

из ключевых ролей MAO в развитии инвазии, инфильтрации, ангиогенеза, метастазирования и уклонения от иммунного надзора. Иммунологический профиль опухолевых макрофагов остается малоизученным, но уже на данном этапе прослеживаются важные для разработки эффективных методов лечения закономерности. Макрофаги, ассоциированные с опухолью, демонстрируют свою ценность не только в качестве активных участников канцерогенеза РМП, но и как перспективные прогностические маркеры заболевания. В действительности макрофаги M1 и M2 позволяют открыть новые мишени для таргетной терапии и иммунотерапии. Также MAO способны повлиять на исходы оперативных вмешательств, увеличив периоды ремиссии пациентов с НМИРМП и МИРМП.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Antoni S., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. *Eur Urol* 2017;71(1):96–108. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.06.010
2. Ohishi T., Koga F., Migita T. Bladder cancer stem-like cells: their origin and therapeutic perspectives. *Int J Mol Sci* 2015;17(1):43. DOI: 10.3390/ijms17010043
3. Apodaca G. The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic* 2004;5(3):117–28. DOI: 10.1046/j.1600-0854.2003.00156.x
4. Khandelwal P., Abraham S.N., Apodaca G. Cell biology and physiology of the uroepithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;297(6):F1477–501. DOI: 10.1152/ajprenal.00327.2009
5. Kurzrock E.A., Lieu D.K., Degraffenried L.A. et al. Label-retaining cells of the bladder: candidate urothelial stem cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294(6):F1415–21. DOI: 10.1152/ajprenal.00533.2007
6. Chulpanova D.S., Kitaeva K.V., Green A.R. et al. Molecular aspects and future perspectives of cytokine-based anti-cancer immunotherapy. *Front Cell Dev Biol* 2020;8(402):1–24. DOI: 10.3389/fcell.2020.00402
7. Xue Y., Tong L., Liu F. et al. Tumor-infiltrating M2 macrophages driven by specific genomic alterations are associated with prognosis in bladder cancer. *Oncol Rep* 2019;42(2):581–94. DOI: 10.3892/or.2019.7196
8. Şenbabaoglu Y., Gejman R.S., Winer A.G. et al. Tumor immune microenvironment characterization in clear cell renal cell carcinoma identifies prognostic and immunotherapeutically relevant messenger RNA signatures. *Genome Biol* 2016;17:231. DOI: 10.1186/s13059-016-1092-z
9. Wang M., Zhao J., Zhang L. et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer* 2017;8(5):761–73. DOI: 10.7150/jca.17648
10. Ocaña M.C., Martínez-Poveda B., Quesada A.R. et al. Metabolism within the tumor microenvironment and its implication on cancer progression: an ongoing therapeutic target. *Med Res Rev* 2019;39(1):70–113. DOI: 10.1002/med.21511
11. Hatogai K., Sweis R.F. The tumor microenvironment of bladder cancer. *Adv Exp Med Biol* 2020;1296:275–90. DOI: 10.1007/978-3-030-59038-3_17
12. Haniffa M., Bigley V., Collin M. Human mononuclear phagocyte system reunited. *Semin Cell Dev Biol* 2015;41:59–69. DOI: 10.1016/j.semdcb.2015.05.004
13. Locati M., Curtale G., Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. *Annu Rev Pathol* 2020;15:123–47. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718
14. Yang L., Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol* 2017;10(1):58. DOI: 10.1186/s13045-017-0430-2
15. Zhu S., Luo Z., Li X. et al. Tumor-associated macrophages: role in tumorigenesis and immunotherapy implications. *J Cancer* 2021;12(1):54–64. DOI: 10.7150/jca.49692
16. Morrison C. Immuno-oncologists eye up macrophage targets. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15(6):373–4. DOI: 10.1038/nrd.2016.111
17. Wang N., Liang H., Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol* 2014;5:614. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00614
18. Qian B.Z., Pollard J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010;141(1):39–51. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.014
19. Najafi M., Hashemi Goradel N., Farhood B. et al. Macrophage polarity in cancer: a review. *J Cell Biochem* 2019;120(3):2756–65. DOI: 10.1002/jcb.27646
20. Arnold C.E., Whyte C.S., Gordon P. et al. A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. *Immunology* 2014;141(1):96–110. DOI: 10.1111/imm.12173
21. Chanmee T., Ontong P., Konno K. et al. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)* 2014;6(3):1670–90. DOI: 10.3390/cancers6031670
22. Brown J.M., Recht L., Strober S. The promise of targeting macrophages in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2017;23(13):3241–50. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3122
23. Zhou J., Tang Z., Gao S. et al. Tumor-associated macrophages: recent insights and therapies. *Front Oncol* 2020;10:188. DOI: 10.3389/fonc.2020.00188
24. Costa N.L., Valadares M.C., Souza P.P.C. et al. Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2013;49:216–23. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2012.09.012
25. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012;122(3):787–95. DOI: 10.1172/JCI59643
26. Hughes R., Qian B.Z., Rowan C. et al. Perivascular M2 macrophages stimulate tumor relapse after chemotherapy. *Cancer Res* 2015;75(17):3479–91. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3587
27. Zhang W., Wang L., Zhou D. et al. Expression of tumor-associated macrophages and vascular endothelial growth factor correlates with poor prognosis of peripheral T-cell lymphoma, not otherwise

- specified. *Leuk Lymphoma* 2011;52(1):46–52. DOI: 10.3109/10428194.2010.529204
28. Fu H., Zhu Y., Wang Y. et al. Identification and validation of stromal immunotype predict survival and benefit from adjuvant chemotherapy in patients with muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2018;24(13):3069–78. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2687
 29. Wang B., Liu H., Dong X. et al. High CD204+ tumor-infiltrating macrophage density predicts a poor prognosis in patients with urothelial cell carcinoma of the bladder. *Oncotarget* 2015;6(24):20204–14. DOI: 10.18632/oncotarget.3887
 30. Zhang H., Ye Y.L., Li M.X. et al. CXCL2/MIF-CXCR2 signaling promotes the recruitment of myeloid-derived suppressor cells and is correlated with prognosis in bladder cancer. *Oncogene* 2017;36(15):2095–104. DOI: 10.1038/ncr.2016.367
 31. Qiu S., Deng L., Liao X. et al. Tumor-associated macrophages promote bladder tumor growth through PI3K/AKT signal induced by collagen. *Cancer Sci* 2019;110(7):2110–8. DOI: 10.1111/cas.14078
 32. Leblond M.M., Zdimerova H., Desponds E. et al. Tumor-associated macrophages in bladder cancer: biological role, impact on therapeutic response and perspectives for immunotherapy. *Cancers (Basel)* 2021;13(18):4712. DOI: 10.3390/cancers13184712
 33. Cheah M.T., Chen J.Y., Sahoo D. et al. CD14-expressing cancer cells establish the inflammatory and proliferative tumor microenvironment in bladder cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(15):4725–30. DOI: 10.1073/pnas.1424795112
 34. Martínez V.G., Rubio C., Martínez-Fernández M. et al. BMP4 induces M2 macrophage polarization and favors tumor progression in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23(23):7388–99. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1004
 35. Prima V., Kaliberova L.N., Kaliberov S. et al. COX2/mPGES1/PGE2 pathway regulates PD-L1 expression in tumor-associated macrophages and myeloid-derived suppressor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114(5):1117–22. DOI: 10.1073/pnas.1612920114
 36. Wu A.T.H., Srivastava P., Yadav V.K. et al. Ovatodiolide, isolated from *Anisomeles indica*, suppresses bladder carcinogenesis through suppression of mTOR/β-catenin/CDK6 and exosomal miR-21 derived from M2 tumor-associated macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2020;401:115109. DOI: 10.1016/j.taap.2020.115109
 37. Wang X., Ni S., Chen Q. et al. Bladder cancer cells induce immunosuppression of T cells by supporting PD-L1 expression in tumour macrophages partially through interleukin 10. *Cell Biol Int* 2017;41(2):177–86. DOI: 10.1002/cbin.10716
 38. Zhao Y., Wang D., Xu T. et al. Bladder cancer cells re-educate TAMs through lactate shuttling in the microfluidic cancer microenvironment. *Oncotarget* 2015;6(36):39196–210. DOI: 10.18632/oncotarget.5538
 39. Reusser N.M., Dalton H.J., Pradeep S. et al. Clodronate inhibits tumor angiogenesis in mouse models of ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2014;15(8):1061–7. DOI: 10.4161/cbt.29184
 40. Zhang Q., Mao Z., Sun J. NF-κB inhibitor, BAY11-7082, suppresses M2 tumor-associated macrophage induced EMT potential via miR-30a/NF-κB/Snail signaling in bladder cancer cells. *Gene* 2019;710:91–7. DOI: 10.1016/j.gene.2019.04.039
 41. Wu H., Zhang X., Han D. et al. Tumour-associated macrophages mediate the invasion and metastasis of bladder cancer cells through CXCL8. *Peer J* 2020;8:e8721. DOI: 10.7717/peerj.8721
 42. Dominguez-Gutierrez P.R., Kwenda E.P., Donelan W. et al. Hyal2 expression in tumor-associated myeloid cells mediates cancer-related inflammation in bladder cancer. *Cancer Res* 2021;81(3):648–57. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-1144
 43. Chen C., He W., Huang J. et al. LNMAT1 promotes lymphatic metastasis of bladder cancer via CCL2 dependent macrophage recruitment. *Nat Commun* 2018;9(1):3826. DOI: 10.1038/s41467-018-06152-x
 44. Huang C.P., Liu L.X., Shyr C.R. Tumor-associated macrophages facilitate bladder cancer progression by increasing cell growth, migration, invasion and cytokine expression. *Anticancer Res* 2020;40(5):2715–24. DOI: 10.21873/anticancer.14243
 45. Lin F., Yin H.B., Li X.Y. et al. Bladder cancer cell-secreted exosomal miR-21 activates the PI3K/AKT pathway in macrophages to promote cancer progression. *Int J Oncol* 2020;56(1):151–64. DOI: 10.3892/ijo.2019.4933
 46. Böhle A., Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette–Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol* 2003;170(3):964–9. DOI: 10.1097/01.ju.0000073852.24341.4a
 47. Redelman-Sidi G., Glickman M.S., Bochner B.H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer – a current perspective. *Nat Rev Urol* 2014;11(3):153–62. DOI: 10.1038/nrurol.2014.15
 48. Ludwig A.T., Moore J.M., Luo Y. et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel mechanism for *Bacillus Calmette–Guérin*-induced antitumor activity. *Cancer Res* 2004;64(10):3386–90. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0374
 49. Yang G., Zhang L., Liu M. et al. CD163+ macrophages predict a poor prognosis in patients with primary T1 high-grade urothelial carcinoma of the bladder. *World J Urol* 2019;37(12):2721–6. DOI: 10.1007/s00345-018-02618-1
 50. Boström M.M., Irjala H., Mirtti T. et al. Tumor-associated macrophages provide significant prognostic information in urothelial bladder cancer. *PLoS One* 2015;10(7):e0133552. DOI: 10.1371/journal.pone.0133552
 51. Li P., Hao S., Ye Y. et al. Identification of an immune-related risk signature correlates with immunophenotype and predicts anti-PD-L1 efficacy of urothelial cancer. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:646982. DOI: 10.3389/fcell.2021.646982
 52. Xu Z., Wang L., Tian J. et al. High expression of B7-H3 and CD163 in cancer tissues indicates malignant clinicopathological status and poor prognosis of patients with urothelial cell carcinoma of the bladder. *Oncol Lett* 2018;15(5):6519–26. DOI: 10.3892/ol.2018.8173
 53. Sjö Dahl G., Lövgren K., Lauss M. et al. Infiltration of CD3+ and CD68+ cells in bladder cancer is subtype specific and affects the outcome of patients with muscle-invasive tumors. *Urol Oncol* 2014;32(6):791–7. DOI: 10.1016/j.urolonc.2014.02.007
 54. Wu S.Q., Xu R., Li X.F. et al. Prognostic roles of tumor associated macrophages in bladder cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget* 2018;9(38):25294–303. DOI: 10.18632/oncotarget.25334
 55. Maniecki M.B., Etzerodt A., Ulhøi B.P. et al. Tumor-promoting macrophages induce the expression of the macrophage-specific receptor CD163 in malignant cells. *Int J Cancer* 2012;131(10):2320–31. DOI: 10.1002/ijc.27506
 56. Aljabery F., Olsson H., Gimm O. et al. M2-macrophage infiltration and macrophage traits of tumor cells in urinary bladder cancer. *Urol Oncol* 2018;36(4):159.e19–159.e26. DOI: 10.1016/j.urolonc.2017.11.020
 57. Hanada T., Nakagawa M., Emoto A. et al. Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. *Int J Urol* 2000;7(7):263–9. DOI: 10.1046/j.1442-2042.2000.00190.x
 58. Koga F., Kageyama Y., Kawakami S. et al. Prognostic significance of endothelial Per-Arnt-sim domain protein 1/hypoxia-inducible factor-2α expression in a subset of tumor associated macrophages in invasive bladder cancer. *J Urol* 2004;171(3):1080–4. DOI: 10.1097/01.ju.0000110541.62972.08
 59. Asano T., Ohnishi K., Shiota T. et al. CD169-positive sinus macrophages in the lymph nodes determine bladder cancer prognosis. *Cancer Sci* 2018;109(5):1723–30. DOI: 10.1111/cas.13565

Вклад авторов

В.Н. Павлов: анализ литературы по теме статьи;

М.Ф. Урманцев, Ю.А. Корелов, М.Р. Бакеев: анализ литературы по теме статьи, написание текста статьи.

Authors' contributions

V.N. Pavlov: analysis of the literature on the topic of the article;

M.F. Urmantsev, Yu.A. Korelov, M.R. Bakiev: analysis of the literature on the topic of the article, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.Н. Павлов / V.N. Pavlov: <https://orcid.org/0000-0003-0132-3269>

М.Ф. Урманцев / M.F. Urmantsev: <https://orcid.org/0000-0002-4657-6625>

Ю.А. Корелов / Yu.A. Korelov: <https://orcid.org/0000-0003-1524-5628>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Перспективы применения статинов в лечении нейрофиброматоза 1-го типа

Р.Н. Мустафин

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 450008 Уфа, ул. Ленина, 3

Контакты: Рустам Наилевич Мустафин ruji79@mail.ru

Нейрофиброматоз 1-го типа развивается вследствие герминальной мутации в гене *NF1*, кодирующем онкосупрессор нейрофибромин. Дефицит данного белка вызывает гиперактивацию протоонкогенов Ras, что ведет к развитию опухолей. Белки Ras подвергаются пренилированию, которое подавляют ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктазы. Поэтому они могут быть предложены как противоопухолевые препараты в комплексном лечении нейрофиброматоза 1-го типа. В клинических исследованиях была доказана эффективность статинов в терапии спорадических злокачественных новообразований, в патогенезе которых большую роль играют мутации в гене *NF1*. Описаны различные пути влияния этих препаратов на развитие опухолей, включая активацию аутофагии, ферроптоза, подавление пролиферации, стимуляцию противоопухолевого иммунитета и воздействие на микроокружение неоплазм. Данных о воздействии статинов на развитие и прогрессирование нейрофибром у больных нейрофиброматозом 1-го типа в научной литературе не представлено. Однако выявлено, что они усиливают действие противоопухолевых препаратов, использование которых в монорежиме при ассоциированных с нейрофиброматозом злокачественных неоплазмах нерезультативно. В связи с этим, несмотря на неэффективность статинов при когнитивных расстройствах у пациентов с нейрофиброматозом 1-го типа, внедрение этих лекарственных средств в клиническую практику в комбинации с другими препаратами могло бы обеспечить плейотропный эффект, воздействовать на различные звенья патогенеза заболевания.

Ключевые слова: злокачественные новообразования, нейрофиброматоз 1-го типа, нейрофибромин, онкосупрессор, опухоли, протоонкогены, статины, холестерин

Для цитирования: Мустафин Р.Н. Перспективы применения статинов в лечении нейрофиброматоза 1-го типа. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(3):15–23. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-15-23

Prospects for the use of statins in the treatment of neurofibromatosis type 1

R.N. Mustafin

Bashkir State Medical University, Ministry of Health of Russia; 3 Lenina St., Ufa 450008, Russia

Contacts: Rustam Nailevich Mustafin ruji79@mail.ru

Neurofibromatosis type 1 is caused by a germline mutation in the *NF1* gene encoding the tumor suppressor neurofibromin. Deficiency of this protein causes hyperactivation of Ras proto-oncogenes. This leads to the development of tumors. Ras proteins undergo prenylation, which is inhibited by inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase. Therefore, statins can be proposed as anticancer drugs in the complex treatment of neurofibromatosis type 1. Clinical studies have proven the effectiveness of statins in the treatment of sporadic malignant neoplasms, in the pathogenesis of which mutations in the *NF1* gene play an important role. Various pathways of the influence of these drugs on the development of tumors are described, including the activation of autophagy, ferroptosis, suppression of proliferation, stimulation of antitumor immunity, and effects on the microenvironment of neoplasms. Data on the effect of statins on the development and progression of neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1 are not presented in the scientific literature. However, it was found that statins enhance the effect of anticancer drugs, the use of which in monotherapy against malignant neoplasms associated with neurofibromatosis is ineffective. In this regard, despite the inefficiency of statins in cognitive disorders in patients with neurofibromatosis type 1, the introduction of these drugs into clinical practice in combination with other drugs could provide a pleiotropic effect, affect various links in the pathogenesis of the disease.

Keywords: malignant neoplasms, neurofibromatosis type 1, neurofibromin, oncosuppressor, tumors, proto-oncogenes, statins, cholesterol

For citation: Mustafin R.N. Prospects for the use of statins in the treatment of neurofibromatosis type 1. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2022;9(3):15–23. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-15-23

ВВЕДЕНИЕ

Нейрофиброматоз 1-го типа (НФ1) — аутосомно-доминантное заболевание, встречающееся в мире с частотой 1 случай на 3000 населения. Болезнь обусловлена мутациями в гене *NF1*, который локализован на 17q11.2 [1]. Продукт гена *NF1* — белок нейрофибромин — является негативным регулятором протоонкогенов Ras. Соответственно, мутации *NF1*, приводящие к дефициту нейрофибромина, вызывают гиперактивацию Ras и развитие опухолей [2]. Нейрофибромин характеризуется наличием нескольких функциональных доменов, благодаря чему оказывает плейотропный эффект [3]. Для больных НФ1 характерны пятна цвета «кофе с молоком», веснушчатость подмышечных и паховых областей, узелки Лиша, множественные кожные нейрофибромы. У 50 % пациентов выявляются плексиформные нейрофибромы, которые обычно развиваются с рождения и неуклонно прогрессируют в течение всей жизни. Около 10 % этих новообразований трансформируются в злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов (malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST) [1]. У 20 % больных НФ1 выявляются глиомы головного мозга, главным образом в области ствола и зрительных нервов [4]. Помимо опухолевого синдрома, у 60 % больных НФ1 развиваются различные скелетные аномалии, среди которых наиболее часто встречаются сколиоз позвоночника и псевдоартроз большеберцовой кости [5]; до 65 % пациентов с НФ1 имеют когнитивный дефицит [6]. Больные НФ1 подвержены высокому риску возникновения патологии сердечно-сосудистой системы. У 91,7 % пациентов обнаруживаются врожденные аномалии сосудов сетчатки, такие как тройное разветвление сосудистой сети или дополнительные сосуды диска зрительного нерва [7]. Эндотелиальные клетки при НФ1 характеризуются аномальной пролиферацией с нарушением формирования сосудов [8].

У 16 % детей с НФ1 выявляют артериальную гипертензию, у 18,8 % — аномалии сердца [9], у 18 % — васкулопатию [10].

Среди всех препаратов, разрабатываемых для лечения опухолевого синдрома при НФ1, достоверная эффективность получена лишь в отношении аденозинтрифосфатнезависимых ингибиторов митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), из которых Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) США одобрило селуметиниб для таргетной терапии. Митоген-активируемая протеинкиназа является ключевым медиатором активации пути RAS/RAF/MER/ERK, который при НФ1 гиперактивирован [1]. Поскольку наиболее тяжелыми проявлениями НФ1 являются плексиформные нейрофибромы, в клинических исследованиях участвовали больные с данными новообразованиями (табл. 1). Полученные результаты свидетельствовали о высокой эффективности селуметиниба в отношении плексиформных нейрофибром и спинальных нейрофибром при НФ1.

Меньшая эффективность препарата отмечалась в отношении опухолей головного мозга. Стойкое сокращение размеров опухолей после 26 курсов лечения по 28 дней выявлено у 9 из 25 больных НФ1 с пилоцитарной астроцитомой и у 10 из 25 — с глиомой низкой степени злокачественности [4].

Таким образом, показана эффективность ингибиторов МАРК, но исследования проводили на малых выборках. Данных о крупных многоцентровых двойных слепых плацебо-контролируемых анализах в отношении селуметиниба не представлено. Использование этого препарата в практической медицине ограничено его высокой стоимостью, в связи с чем он недоступен для большинства больных НФ1. Однако сведения об эффективности препаратов, влияющих на МАРК, позволяют предположить возможность применения

Таблица 1. Клинические исследования противоопухолевой эффективности селуметиниба у больных нейрофиброматозом 1-го типа

Table 1. Clinical trials assessing the antitumor efficacy of selumetinib in patients with neurofibromatosis type 1

Тип опухоли Tumor	Всего пациентов, n Total number of patients, n	Число пациентов, у которых наблюдалось уменьшение размеров опухолей, абс. (%) Number of patients who demonstrated a reduction in the tumor size, abs. (%)	Год исследования, источник Year, reference
Плексиформные нейрофибромы Plexiform neurofibromas	24	17 (71)	2016, [2]
	17	16 (94)	2020, [1]
	19	18 (95)	2020, [11]
Неоперабельные плексиформные нейрофибромы Inoperable plexiform neurofibromas	44	35 (80)	2020, [12]
Спинальные нейрофибромы Spinal neurofibromas	24	18 (75)	2020, [13]

других лекарственных средств, влияющих на данное звено патогенеза опухолевого синдрома при НФ1. К таким препаратам относят ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктазы (ГМГ-КоА-Р) — статины [14], исследований влияния которых на развитие опухолей при НФ1 не проводилось. Однако получены сведения об эффективности статинов при комплексном лечении sporadических злокачественных новообразований [15–19], в инициации и прогрессировании которых участвуют мутации в гене *NF1* [20]. Опубликованы также работы о влиянии данных препаратов на когнитивный дефицит у пациентов с НФ1.

ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ СТАТИНОВ НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ У БОЛЬНЫХ НЕЙРОФИБРОМАТОЗОМ 1-ГО ТИПА

Статины относятся к наиболее часто назначаемым лекарственным средствам: приблизительно каждый четвертый человек старше 40 лет принимает ингибиторы ГМГ-КоА-Р [21] в связи с их эффективностью в отношении сердечно-сосудистых, эндокринных и метаболических заболеваний [14]. Нежелательные явления, возникающие на фоне применения статинов, могут быть связаны с метаболическим блоком путей биотрансформации мевалоната, включая нарушение пренилирования белков, N-гликозилирование, трансляцию матричной РНК, синтез коэнзима Q (рис. 1).

Кроме того, дефицит холестерина влияет на целостность мембран клеток и синтез стероидных гормонов. Нарушение этих путей не оказывает сильного воздействия на функционирование взрослого организма, но серьезно влияет на метаболизм пролиферирующих опухолевых клеток. В частности, коэнзим Q является жизненно важным для образования в них аденозинтрифосфата (АТФ). Посттрансляционные модификации белков (пренилирование) необходимы для их правильного функционирования и локализации. Это свойство характерно для гуанозинтрифосфатаз (ГТФаз), многие из которых вовлечены в туморогенез (Ras и Rho пренилируются) [22]. Поскольку в патогенезе НФ1 ключевым звеном является гиперактивация Ras, логично предположить воздействие статинов на патогенез болезни. Однако практический интерес их применения при НФ1 связан прежде всего с возможной коррекцией когнитивных проблем у пациентов. В эксперименте на мышах показана эффективность ловастатина в восстановлении синаптической пластичности и нормализации внимания [23]. Было выявлено, что в головном мозге NF1+/- мышей ловастатин подавляет гиперактивированные p21Ras-MAPK, восстанавливая клеточные механизмы обучения и памяти [24].

Результаты дальнейших клинических испытаний влияния статинов на восстановление когнитивных нарушений у больных НФ1 оказались противоречивыми

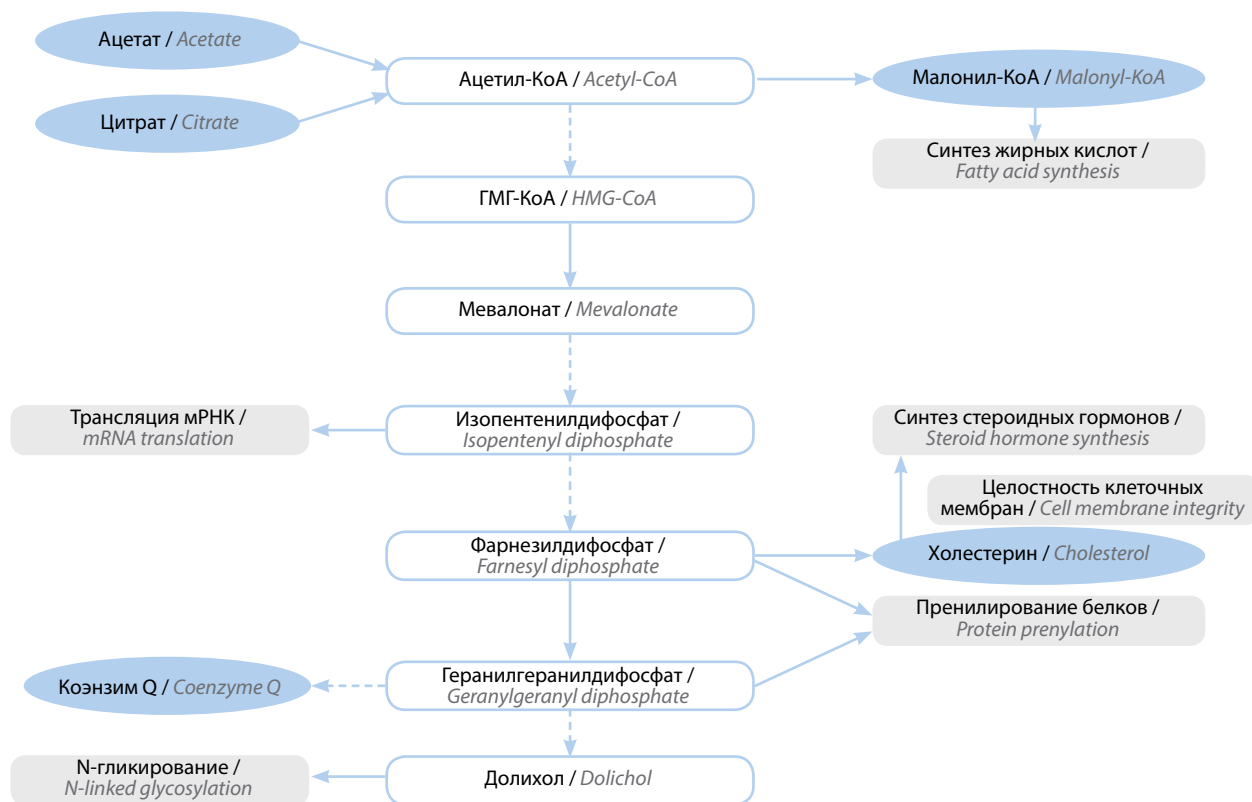


Рис. 1. Схема мевалонатного пути в нормальных клетках человека. ГМГ-КоА — 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А; ацетил-КоА — ацетил-коэнзим А; малонил-КоА — малонилкоэнзим А

Fig. 1. Diagram demonstrating the mevalonate pathway in normal human cells. HMG-CoA — 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase; acetyl-CoA — acetyl-coenzyme A; malonyl-CoA — malonyl coenzyme A

Таблица 2. Клинические исследования влияния статинов на когнитивные функции при нейрофиброматозе 1-го типа

Table 2. Clinical trials assessing the effect of statins on cognitive functions in patients with neurofibromatosis type 1

Препарат Drug	Число исследованных пациентов, принимавших статины, абс. (%) Number of examined patients who received statins, abs. (%)	Эффект препарата Effect of the drug	Год исследования, источник Year, reference
Симвастатин Simvastatin	114 (62)	Отсутствовал None	2008, [25]
	84 (43)	Отсутствовал None	2013, [26]
Ловастатин в высоких дозах High doses of lovastatin	22 (11)	Улучшение синаптической пластичности Improved synaptic plasticity	2013, [23]
Ловастатин в стандартных дозах Standard doses of lovastatin	144 (74)	Отсутствовал None	2016, [27]

(табл. 2). Было проведено несколько двойных слепых рандомизированных плацебо-контролируемых исследований.

Возможной причиной неэффективности статинов в восстановлении нарушенных когнитивных функций может служить сложность механизмов их развития, поскольку в головном мозге больных НФ1 инактивирован лишь 1 аллель *NF1*. То есть сохранение функции нейрофибромина в нормальных тканях может не отражаться на гиперактивации в них RAS, а развитие патологии связано с плейотропным действием гена *NF1* в связи с наличием нескольких функциональных доменов в его белковом продукте [3]. Однако опухоли при НФ1 формируются в соответствии с двухударной моделью Кнудсона, когда происходит инактивация обоих аллелей гена *NF1* с потерей функции контроля RAS-белков. Поэтому наиболее вероятно влияние статинов на развитие нейрофибром при НФ1, поскольку данные препараты подавляют пренилирование белков Ras [22]. Клинические исследования влияния статинов на проявление опухолевого синдрома при НФ1 не проводились, однако получены данные об эффективности ингибиторов ГМГ-КоА-Р в комплексном лечении различных злокачественных новообразований. Поскольку соматические мутации *NF1* в спорадических новообразованиях играют роль в их инициации, прогрессировании и химиорезистентности [20], можно предположить, что статины эффективны в лечении опухолевого синдрома при НФ1.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ СТАТИНОВ

Противоопухолевое воздействие статинов доказано в ряде клинических исследований. Так, согласно результатам лонгитюдного анализа, проведенного в 2012 г. и включившего 18 721 пациентов со злокачественными новообразованиями из Дании, регулярно принимавших эти препараты, показатель смертности

от рака был достоверно ниже, чем у 277 204 онкологических пациентов, которым не назначали ингибиторы ГМГ-КоА-Р [15]. Метаанализ, включавший 76 851 больного колоректальным раком (2015), показал снижение смертности от данного злокачественного новообразования при использовании статинов как до, так и после постановки диагноза [16]. Согласно результатам проведенного в 2016 г. метаанализа с включением в исследование 75 684 больных раком молочной железы женщин, использование ингибиторов ГМГ-КоА-Р улучшает показатели общей выживаемости, в том числе в связи с отсутствием рецидивов [17]. Сходные данные получены при исследовании 20 559 женщин из Швеции в 2019 г. [18]. Метаанализ 99 297 больных раком легкого, выполненный в этом же году, показал ассоциацию употребления статинов с общей, специфичной для рака выживаемостью и отсутствием рецидивов [19]. В развитии вышеописанных типов злокачественных неоплазм большую роль играют соматические мутации *NF1* [20], что позволяет предположить эффективность ингибиторов ГМГ-КоА-Р в комплексном лечении опухолей при НФ1. В 2020 г. проведен метаанализ, обобщающий сведения об ассоциации употребления статинов со смертностью от злокачественных новообразований, а также с их рецидивами и прогрессированием. В исследование были включены 233 322 больных, принимавших эти препараты, и 953 177 пациентов, которым они не назначались. Получены достоверные сведения о снижении смертности от злокачественных новообразований и рецидивов у пациентов, получавших терапию ингибиторами ГМГ-КоА-Р [28].

Применение статинов ассоциировано также с пониженным риском заболеваемости различными злокачественными неоплазмами, что было доказано в лонгитюдном исследовании 17 737 пациентов, принимавших ингибиторы ГМГ-КоА-Р, и 13 412 пациентов, которым они не назначались [29]. Полученные результаты были

подтверждены в ходе последующих исследований. Так, в 2020 г. проведено лонгитюдное когортное исследование 14 067 пациентов, получавших статины, и 56 268 пациентов, которым эти препараты не назначались. Риск развития почечно-клеточного рака оказался значительно ниже у больных, регулярно принимавших ингибиторы ГМГ-КоА-Р [30]. Обратная ассоциация между употреблением статинов и заболеваемостью раком желудка определена в 2020 г. в ходе лонгитюдного анализа (в среднем в течение 12,9 лет) 17 737 пациентов, регулярно принимавших ингибиторы ГМГ-КоА-Р, и 13 412 пациентов из группы контроля [31].

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА СТАТИНОВ

3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктаза контролирует скорость мевалонатного пути [14]. Мевалонат метаболизируется в фарнезилпирофосфат (ФПП) — предшественник холестерина и стеролов [32]. Пути метаболизма мевалоната участвуют в поддержании развития опухолевых клеток [22]. В их пролиферации большую роль играют холестерин и его производные, поэтому в неоплазмах поддерживается высокий внутриклеточный уровень холестерина, который участвует в активном сигналинге и необходим для синтеза мембран. Он напрямую активирует онкогенный путь Hedgehog и индуцирует мишень сигнального пути комплекса рапамицина 1 (mTORC1), способствующего раз-

витию неоплазм [33]. Участие холестерина в развитии опухолевых клеток обеспечивается ядерными рецепторами стерола (печеночными X-рецепторами, LXR) и рецепторами липопротеинов низкой плотности (которые обеспечивают экзогенным стеролом). Кроме того, захват и биосинтез стерола ускоряют онкогенные рецепторы MUC1 (Mucin 1, cell surface associated) и EGFR (epidermal growth factor receptor) [34].

Помимо превращения в холестерин и стеролы, ФПП преобразуется также в геранилгеранилдифосфат, который используется для посттрансляционной модификации белков, вовлеченных в различные аспекты развития и прогрессирования опухолей. Пути мевалоната активируются при лейкозах, лимфоме, множественной миеломе, раке молочной железы, печени, поджелудочной железы, простаты и пищевода. Это обусловлено мутациями генов, кодирующих белки p53, ГМГ-KoA-P, SCAP (sterol-regulatory element binding protein (SREBP) cleavage-activating protein), активацией PKB/Akt и транскрипционных факторов (SREBP, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)) и подавлением AMPK (5'АМФ-активируемой протеинкиназы) [32]. Поскольку статины ингибируют метаболические пути мевалоната, они оказывают многостороннее воздействие на развитие злокачественных новообразований, включая пролиферацию опухолевых клеток (рис. 2). Необходимо отметить, что мутации в гене *TP53*, происходящие

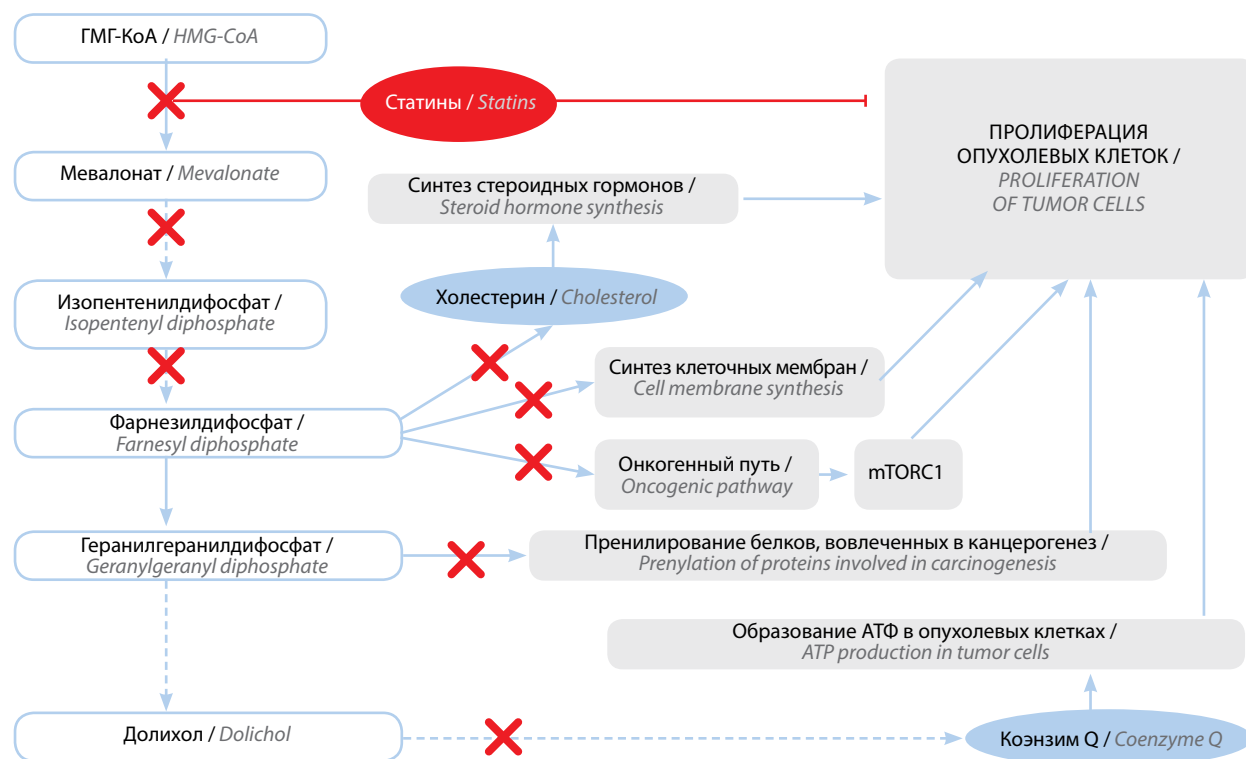


Рис. 2. Схема влияния статинов на пролиферацию опухолевых клеток. ГМГ-КоА – 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктаза; АТФ – аденозинтрифосфат; mTORC1 – мишень рапамицинового комплекса 1

Fig. 2. Diagram demonstrating the effect of statins on tumor cell proliferation. HMG-CoA – 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase; ATP – adenosine triphosphate; mTORC1 – mammalian target of rapamycin

более чем в 50 % всех злокачественных неоплазм, способствуют активации мевалонатного пути в опухолевых клетках. Данный механизм блокируется при помощи ингибиторов ГМГ-КоА-Р. Кроме того, ингибирование пренилирования белков под влиянием статинов вызывает последовательные реакции клеточного стресса, включая отклик неструктурированных белков и аутофагию. Это в конечном счете ведет к инфламмасомозависимой и опосредованной каспазой-1 активации врожденного иммунитета против опухоли. В частности, симвастатин стимулирует выработку интерлейкина 1 и TNF (tumor necrosis factor) эндотелиальными клетками, а также интерлейкина 2 дендритными клетками CD56+. Ловастатин способствует синтезу TNF- α макрофагами, интерлейкином 6 и интерлейкином 12 и TNF- α дендритными клетками костного мозга; аторвастатин — интерферона γ Т-клетками [35]. Поэтому статины оказывают антипролиферативный, проапоптотический и антиинвазивный эффекты, а также повышают чувствительность опухолевых клеток к радиотерапии [14].

Были обнаружены противоопухолевые свойства статинов за счет воздействия на ферроптоз и аутофагию. Так, в эксперименте показано, что симвастатин стимулирует ферроптоз клеток трижды негативного рака молочной железы. Ферроптоз представляет собой зависимую от железа гибель клеток, вызванную чрезмерным окислением липидов. При этом происходит прямое и косвенное ингибирование фермента репарации липидов, глутатионпероксидазы-4 (GPX4), с накоплением гидропероксидов липидов, которые нарушают клеточную структуру и целостность. Статины являются прямыми ингибиторами GPX4 [36]. Показано также, что аторвастатин снижает жизнеспособность клеток рака шейки матки и способствует их апоптозу. Данный эффект опосредован активацией каспазы-3, Bim (Bcl-2-like protein 11) и PARP (Poly(ADP-ribose) polymerase 1). Аторвастатин стимулирует клеточную аутофагию опухолевых клеток, что подтверждено снижением уровня экспрессии p62, конверсией белков аутофагосомы LC3-I в LC3-II и изменением сигнальных путей AMPK (АМФ-активируемой протеинкиназы) и Akt/mTOR [37]. В эксперименте ловастатин эффективно способствовал апоптозу клеток феохромоцитомы мышей и более агрессивных опухолевых клеток, что сопровождалось снижением фосфорилирования компонентов сигнальных путей MAPK. Наибольшую эффективность в данном отношении показали симвастатин и флувастатин [38]. На клеточных линиях рака молочной железы была продемонстрирована способность аторвастатина индуцировать аутофагию [39].

Обнаружено, что ингибиторы ГМГ-КоА-Р индуцируют частичный эпителиально-мезенхимальный переход раковых клеток в солидные опухоли. Статины подавляют клеточную пластичность, усиливая мезенхимально-подобное состояние клеток (подавляя обратный мезенхимально-эпителиальный переход),

что снижает образование вторичных опухолей вследствие гетерогенных реакций на лечение. Экспериментальные исследования моделей аденокарциномы протоков поджелудочной железы, рака легкого и толстой кишки показали, что статины вызывают активацию E-кадгерина, однако это не стимулирует образование метастазов в связи с ингибированием мезенхимально-эпителиального перехода *in vivo* и *in vitro*. Изменения клеточной морфологии обусловлены также изменением цитоскелета в связи с ингибированием путей холестерина, а также стимуляцией выработки и фосфорилирования белка ITSN1 (scaffolding protein Intersectin 1), который регулирует везикулярный транспорт и активный цитоскелет. Помимо воздействия на генные сети гомеостаза холестерина, эффект антимагистатического влияния статинов обусловлен стимуляцией ими экспрессии генов, вовлеченных в апоптоз. Поэтому одновременно с эпителиально-мезенхимальным переходом индуцируется апоптоз при стимуляции сигнальных путей ERK. Индуцированное статинами состояние мезенхимальных клеток обратимо и сохраняется только во время их применения, что свидетельствует о необходимости пожизненного употребления этих препаратов онкологическими больными [21].

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СТАТИНОВ В ЛЕЧЕНИИ НЕЙРОФИБРОМАТОЗА 1-ГО ТИПА

Несмотря на отсутствие клинического эффекта в лечении когнитивных расстройств при НФ1, статины могут быть использованы в комплексном лечении опухолевого синдрома при данном заболевании. Помимо перечисленных выше эффектов воздействия на развитие неоплазм, эти препараты в комбинации с ингибиторами MAPK способствуют окислительному стрессу и апоптозу клеток рака поджелудочной железы, которые нуждаются в пути мевалоната для синтеза коэнзима Q и окислительно-восстановительного гомеостаза [40]. Кроме того, статины: подавляют пути RAF/MAPK/ERK, способствуя апоптозу; ограничивают деградацию ингибиторов циклинзависимых киназ p21 и p27 (которые ингибируют пролиферацию); участвуют в фосфорилировании и активации MYC; оказывают противовоспалительный и антиоксидантный эффекты через пути PI3K/AKT, вызывая снижение экспрессии толл-подобного рецептора 4 в моноцитах крови и снижая концентрацию TNF- α в плазме [41]. В отношении патогенеза опухолевого синдрома при НФ1 важно отметить, что ингибиторы ГМГ-КоА-Р подавляют пренилирование онкогенов Ras [22], которые являются мишенями онкосупрессорного влияния нейрофибромина.

Помимо стимуляции противоопухолевого иммунитета, статины обладают противовоспалительным и иммуносупрессивным эффектами [35], что имеет большое значение в лечении опухолей при НФ1, поскольку в их патогенезе участвуют патологические иммунные реакции [3]. Прогрессирование роста нейрофибром при НФ1 обусловлено стимулирующим влиянием макрофагов

в микроокружении опухолевых клеток. В нейрофибромах обнаруживаются главным образом макрофаги типа M1 [42], которые являются эффекторами воспаления, способствующего росту неоплазм [43]. Ингибиторы ГМГ-КоА-Р воздействуют на данный механизм развития злокачественных новообразований. Выявлено, что аторвастатин ингибирует рекрутирование макрофагов в микроокружение, что частично проявляется подавлением Ras-опосредованной секреции лиганда CCR1 [44]. Кроме того, NF1+/- макрофаги способствуют избыточному образованию неоинтимы артерий. В экспериментах на мышах показано, что данный эффект подавляется розувастатином [45]. Отмечено также непосредственное ингибирующее влияние статинов на сигнальные пути MAPK [38], что позволяет предположить необходимость их внедрения в клиническую практику для лечения опухолевого синдрома при НФ1, особенно в комбинации с другими препаратами.

Некоторые лекарственные средства могут усиливать противоопухолевое воздействие ингибиторов ГМГ-КоА-Р. Например, антиагрегант дипиридамола обладает синергизмом со статинами, потенцируя вызванный ими апоптоз раковых клеток. Сходные свойства проявляют другие соединения (такие как цилостазол), повышающие внутриклеточные уровни циклического аденозинмонофосфата. Дипиридамола и цилостазол ингибируют также статининдуцированную активацию белка-2, связывающего регуляторный элемент стерола (SREBP2), который модулирует чувствительность к статинам независимым от циклического аденозинмонофосфата способом [46]. Больные НФ1 характеризуются повышенной радиочувствительностью и предрасположенностью к образованию злокачественных опухолей при облучении. В эксперименте на клеточных линиях фибробластов пациентов с НФ1 было показано, что комбинированное воздействие статинов и бисфосфонатов снижает чувствительность клеток к облучению в результате нормализации распо-

навания двуцепочечных разрывов ДНК и устранения геномной нестабильности [47].

Важно отметить, что статины потенцируют противоопухолевый эффект других препаратов, применяемых для лечения злокачественных новообразований. Поэтому они являются перспективными лекарственными средствами для комплексного лечения опухолевого синдрома при НФ1. Так, выявлено потенцирующее влияние симвастина на противоопухолевое действие доксорубина [48]. В экспериментах на клеточных линиях из MPNST монотерапия ингибиторами фарнезилтрансферазы или ловастатином оказалась неэффективной. Однако комбинированное применение этих препаратов значительно подавляло пренилирование белков Ras и пролиферацию клеток, а также способствовало их апоптозу [49].

Целесообразность применения статинов в лечении НФ1 обусловлена также их протективным влиянием на сердечно-сосудистую патологию, развитие которой значительно ассоциировано с НФ1. Для больных НФ1 характерно возникновение ранних морфологических и функциональных аномалий периферических артерий и систолического нарушения сердечной деятельности [50], окклюзий артерий, приводящих к ишемии тканей и внезапной смерти (вследствие образования неоинтимы при повреждениях сосудов) [45], васкулопатий [10]. Эксперименты на NF1+/- мышах с моделированным псевдоартрозом большеберцовой кости показали, что введение животным ловастина восстанавливает экспрессию Runx2 (Runt-related transcription factor 2 — транскрипционного фактора, связанного с дифференцировкой остеобластов) и способствует формированию нормальной костной ткани. Данный анаболический эффект коррелировал со снижением активности MAPK [51]. Было также показано, что симвастин стимулирует образование костной ткани за счет индуцирования экспрессии костного морфогенетического белка-2 [52]. Таким образом, применение статинов в комбинированном лечении

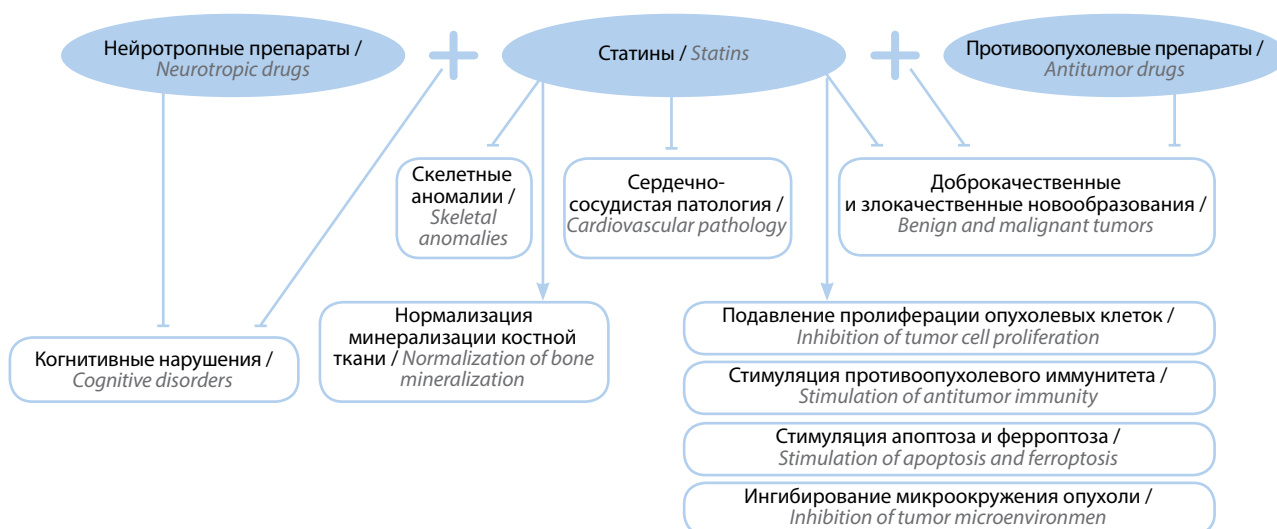


Рис. 3. Схема влияния статинов на патогенез нейрофиброматоза 1-го типа

Fig. 3. Diagram demonstrating the effect of statins on the pathogenesis of neurofibromatosis type 1

НФ1 перспективно в связи с многосторонним воздействием на различные системы и органы, вовлеченные в патогенез НФ1 (рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метаболические пути мевалоната играют большую роль в спорадическом канцерогенезе, в связи с чем статины являются перспективными препаратами для комплексной противоопухолевой терапии. Особенно это касается химиорезистентных неоплазм, в развитии которых участвуют мутации в гене *NF1*. Эффективность ингибиторов МАРК в лечении нейрофибром при НФ1 свидетельствует о перспективах клинического применения статинов, которые также подавляют МАРК. Кро-

ме того, противоопухолевое воздействие ингибиторов ГМГ-КоА-Р при НФ1 обусловлено стимуляцией ферроптоза, апоптоза, изменением микроокружения опухолей и иммуномодуляцией. Применение статинов при НФ1 перспективно для профилактики и лечения скелетных аномалий и сердечно-сосудистой патологии. Несмотря на неэффективность монотерапии статинами когнитивного дефицита при НФ1, возможно комбинированное лечение данной патологии с применением нейротропных лекарственных средств. Об этом свидетельствуют синергизм ингибиторов ГМГ-КоА-Р с другими препаратами в подавлении роста неоплазм, а также потенцирование статинами действия противоопухолевых лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Baldo F, Grasso A.G., Wiel L.C. et al. Selumetinib in the treatment of symptomatic intractable plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1: a prospective case series with emphasis on side effects. *Paediatr Drugs* 2020;22(4):417–23. DOI: 10.1007/s40272-020-00399-y
2. Dombi E., Baldwin A., Marcus L. et al. Activity of selumetinib in neurofibromatosis type 1-related plexiform neurofibromas. *N Engl J Med* 2016;375(26):2550–60. DOI: 10.1056/NEJMoa1605943
3. Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Роль эпигенетических факторов в патогенезе нейрофиброматоза 1-го типа. *Успехи молекулярной онкологии* 2017;4(3):37–49. DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3
Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. The role of epigenetic factors in the pathogenesis of neurofibromatosis type 1. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology*. 2017;4(3):37–49. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3
4. Fangusaro J., Onar-Thomas A., Poussaint T.Y. et al. Selumetinib in paediatric patients with BRAF-aberrant or neurofibromatosis type-1-associated recurrent, refractory, or progressive low-grade gliomas: a multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2019;20(7):1011–22. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30277-3
5. Mladenov K.V., Spiro A.S., Krajewski K.L. et al. Management of spinal deformities and tibial pseudarthrosis in children with neurofibromatosis type 1 (NF1). *Childs Nerv Syst* 2020;36:2409–25. DOI: 10.1007/s00381-020-04775-4
6. Anderson J.L., Gutmann D.H. Neurofibromatosis type 1. *Handb Clin Neurol* 2015;132:75–86. DOI: 10.1016/B978-0-444-62702-5.00004-4
7. Chun B.Y., Yoon J.H., Son B.J. et al. Congenital abnormalities of the retinal vasculature in neurofibromatosis type 1. *Sci Rep* 2020;10(1):12865. DOI: 10.1038/s41598-020-69852-9
8. Bajaj A., Li Q., Zheng Q., Pumiglia K. Loss of NF1 expression in human endothelial cells promotes autonomous proliferation and altered vascular morphogenesis. *PLoS One* 2012;7(11):e49222. DOI: 10.1371/journal.pone.0049222
9. Lama G., Graziano L., Calabrese E. et al. Blood pressure and cardiovascular involvement in children with neurofibromatosis type 1. *Pediatr Nephrol* 2004;19(4):413–8. DOI: 10.1007/s00467-003-1397-5
10. Kaas B., Huisman T.A.G.M., Tekes A. et al. Spectrum and prevalence of vasculopathy in pediatric neurofibromatosis type 1. *J Child Neurol* 2013;28(5):561–9.
11. Santo V.E., Passos J., Nzwalo H. et al. Selumetinib for plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1: a single-institution experience. *J Neurooncol* 2020;147(2):459–63. DOI: 10.1007/s11060-020-03443-6
12. Gross A.M., Wolters P.L., Dombi E. et al. Selumetinib in children with inoperable plexiform neurofibromas. *N Engl J Med* 2020;382(15):1430–42. DOI: 10.1056/NEJMoa1912735
13. Jackson S., Baker E.H., Gross A.M. et al. The MEK inhibitor selumetinib reduces spinal neurofibroma burden in patients with NF1 and plexiform neurofibromas. *Neurooncol Adv* 2020;2(1):vdaa095. DOI: 10.1093/monajnl/vdaa095
14. Zhu P.F., Wang M.X., Chen Z.L., Yang L. Targeting the tumor microenvironment: a literature review of the novel anti-tumor mechanism of statins. *Front Oncol* 2021;11:761107. DOI: 10.3389/fonc.2021.761107
15. Nielsen S.F., Nordestgaard B.G., Bojesen S.E. Statin use and reduced cancer-related mortality. *N Engl J Med* 2012;367(19):1792–802. DOI: 10.1056/NEJMoa1201735
16. Ling Y., Yang L., Huang H. et al. Prognostic significance of statin use in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2015;94(25):e908. DOI: 10.1097/MD.0000000000000908
17. Manthavadi S., Shrestha A., Madhusudhana S. Impact of statin use on cancer recurrence and mortality in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2016;139(6):1281–8. DOI: 10.1002/ijc.30185
18. Borgquist S., Broberg P., Tojjar J., Olsson H. Statin use and breast cancer survival – a Swedish nationwide study. *BMC Cancer* 2019;19:54. DOI: 10.1186/s12885-018-5263-z
19. Chen Y., Li X., Zhang R. et al. Effects of statin exposure and lung cancer survival: a meta-analysis of observational studies. *Pharmacol Res* 2019;141:357–65. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.01.016
20. Мустафин Р.Н. Роль мутаций в гене *NF1* в спорадическом канцерогенезе. *Успехи молекулярной онкологии* 2021;8(3):25–33. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-3-25-33
Mustafin R.N. The role of mutations in *NF1* gene in sporadic carcinogenesis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology*. 2021;8(3):25–33. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-3-25-33
21. Dorsch M., Kowalczyk M., Planque M. et al. Statins affect cancer cell plasticity with consequences for tumor progression and metastasis. *Cell Rep* 2021;37(8):110056. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.110056
22. Mullen P.J., Rosemary Yu., Longo J. et al. The interplay between cell signaling and the mevalonate pathway in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016;16(11):718–31. DOI: 10.1038/nrc.2016.76
23. Mainberger F., Jung N.H., Zenker M. et al. Lovastatin improves impaired synaptic plasticity and phasic alertness in patients with neurofibromatosis type 1. *BMC Neurol* 2013;13:131. DOI: 10.1186/1471-2377-13-131

24. Li W., Cui Y., Kushner S.A. et al. The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin reverses the learning and attention deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Curr Biol* 2005;15(21):1961–7. DOI: 10.1016/j.cub.2005.09.043
25. Krab L.C., de Goede-Bolder A., Aarsen F.K. et al. Effect of simvastatin on cognitive functioning in children with neurofibromatosis type 1: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008;300(3):287–94. DOI: 10.1001/jama.300.3.287
26. Van der Vaart T., Plasschaert E., Rietman A.B. et al. Simvastatin for cognitive deficits and behavioural problems in patients with neurofibromatosis type 1 (NF1-SIMCODA): a randomized, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 2013;12(11):1076–84.
27. Payne J.M., Barton B., Ullrich N.J. et al. Randomized placebo-controlled study of lovastatin in children with neurofibromatosis type 1. *Neurology* 2016;87(24):2575–84.
28. Yang J., Li C., Shen Y. et al. Impact of statin use on cancer-specific mortality and recurrence: a meta-analysis of 60 observational studies. *Medicine (Baltimore)* 2020;99(14):e19596. DOI: 10.1097/MD.00000000000019596
29. Kim J., You N.Y., Lee J.W. et al. Inverse association between statin use and overall cancer incidence in individuals with hypercholesterolemia, based on the Korean health insurance service between 2002 and 2015. *Asia Pac J Public Health* 2019;31(2):136–46. DOI: 10.1177/1010539519830235
30. Chou Y.C., Lin C.H., Wong C.S. et al. Statin use and the risk of renal cell carcinoma: national cohort study. *J Investig Med* 2020;68(3):776–81. DOI: 10.1136/jim-2019-001209
31. You H.S., You N., Lee J.W. et al. Inverse association between statin use and stomach cancer incidence in individuals with hypercholesterolemia, from the 2002–2015 NHIS-HEALS Data. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17(3):1054. DOI: 10.3390/ijerph17031054
32. Bathaie S.Z., Ashrafi M., Azizian M., Tamanoi F. Mevalonate pathway and human cancers. *Curr Mol Pharmacol* 2017;10(2):77–85. DOI: 10.2174/1874467209666160112123205
33. Ding X., Zhang W., Li S., Yang H. The role of cholesterol metabolism in cancer. *Am J Cancer Res* 2019;9(2):219–27.
34. Gabitova L., Gorin A., Astsaturov I. Molecular pathways: sterols and receptor signaling in cancer. *Clin Cancer Res* 2014;20(1):28–34. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0122
35. Thurnher M., Nussbaumer O., Gruenbacher G. Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents. *Clin Cancer Res* 2012;18(13):3524–31. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0489
36. Yao X., Xie R., Cao Y. et al. Simvastatin induced ferroptosis for triple-negative breast cancer therapy. *J. Nanobiotechnology* 2021;19(1):311. DOI: 10.1186/s12951-021-01058-1
37. Sheng B., Song Y., Zhang J. et al. Atorvastatin suppresses the progression of cervical cancer via regulation of autophagy. *Am J Transl Res* 2020;12(9):5252–68.
38. Flidner S.M., Engel T., Lendvai N.K. et al. Anti-cancer potential of MAPK pathway inhibitor in paragangliomas-effect of different statins on mouse pheochromocytoma cells. *PLoS One* 2014;9(5):e97712. DOI: 10.1371/journal.pone.0097712
39. Hu M.B., Zhang J.W., Gao J.B. et al. Atorvastatin induces autophagy in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Ultrastruct Pathol* 2018;42:409–15. DOI: 10.1080/01913123.2018.1522406
40. Cordes T., Metallo C.M. Statins limit coenzyme q synthesis and metabolically synergize with MEK inhibition in pancreatic tumors. *Cancer Res* 2020;80(2):151–2. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3415
41. Ampuero J., Romero-Gomez M. Prevention of hepatocellular carcinoma by correction of metabolic abnormalities: role of statins and metformin. *World J Hepatol* 2015;7(8):1105–11. DOI: 10.4254/wjh.v7.i8.1105
42. Liao C.P., Booker R.C., Brosseau J.P. et al. Contributions of inflammation and tumor microenvironment to neurofibroma tumorigenesis. *J Clin Invest* 2018;128(7):2848–61. DOI: 10.1172/JCI99424
43. Prada C.E., Jousma E., Rizvi T.A. et al. Neurofibroma-associated macrophages play roles in tumor growth and response to pharmacological inhibition. *Acta Neuropathol* 2013;125(1):159–68. DOI: 10.1007/s00401-012-1056-7
44. Kamata T., Dujaili E.A., Alhamad S. et al. Statins mediate anti- and pro-tumorigenic functions in lung adenocarcinoma development by remodeling the tumour microenvironment. *Dis Model Mech* 2022;15(2):dmm049148. DOI: 10.1242/dmm.049148
45. Stansfield B.K., Bessler W.K., Mali R. et al. Heterozygous inactivation of the NF1 gene in myeloid cells enhances neointima formation via a rosuvastatin-sensitive cellular pathway. *Hum Mol Genet* 2013;22(5):977–88. DOI: 10.1093/hmg/ddt502
46. Longo J., Pandya A.A., Stachura P. et al. Cyclic AMP-hydrolyzing phosphodiesterase inhibitors potentiate statin-induced cancer cell death. *Mol Oncol* 2020;14(10):2533–45. DOI: 10.1002/1878-0261.12775
47. Combemale P., Sonzogni L., Devic C. et al. Individual response to radiation of individuals with neurofibromatosis type I: role of the ATM protein and influence of statins and bisphosphonates. *Mol Neurobiol* 2022;59(1):556–73. DOI: 10.1007/s12035-021-02615-3
48. Mangelinck A., Habel N., Mohr A. et al. Synergistic anti-tumor effect of simvastatin combined to chemotherapy in osteosarcoma. *Cancer (Basel)* 2021;13(22):5869. DOI: 10.3390/cancers13225869
49. Wojtkowiak J.W., Fouad F., LaLonde D.T. et al. Induction of apoptosis in neurofibromatosis type 1 malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines by a combination of novel farnesyl transferase inhibitors and lovastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;326(1):1–11. DOI: 10.1124/jpet.107.135830
50. Cutruzzola A., Irace C., Frazzetto M. et al. Functional and morphological cardiovascular alterations associated with neurofibromatosis 1. *Sci Rep* 2020;10(1):12070. DOI: 10.1038/s41598-020-68908-0
51. Kolanczyk M., Kuhnisch J., Kossler N. et al. Modelling neurofibromatosis type 1 tibial dysplasia and its treatment with lovastatin. *BMC Med* 2008;6:21.
52. Bostan B., Gunes T., Asci M. et al. Simvastatin improves spinal fusion in rats. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2011;45(4):270–5. DOI: 10.3944/AOTT.2011.2526

ORCID автора / ORCID of author

Р.Н. Мустафин / R.N. Mustafin: <https://orcid.org/0000-0002-4091-382X>

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Funding.

Статья поступила: 14.12.2021. **Принята к публикации:** 20.06.2022.
Article submitted: 14.12.2021. **Accepted for publication:** 20.06.2022.

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-24-37



Методы детекции специфических для опухолевой ткани однонуклеотидных соматических мутаций в препаратах цДНК из плазмы крови

Л.М. Дьяков¹, О.М. Кривцова¹, П.А. Хесина^{1,2}, И.Ф. Кустова¹, Н.А. Дьякова¹, Н.С. Мюге^{3,4}, Н.Е. Кудашкин¹, Ю.И. Патютко¹, Н.Л. Лазаревич^{1,2}

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

²биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12;

³ФГБНУ «Всероссийский научный научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»; Россия, 105187 Москва, Окружной проезд, 19;

⁴ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук»; Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

Контакты: Наталия Леонидовна Лазаревич lazarevich.nl@gmail.com

Введение. Жидкостная биопсия рассматривается как малоинвазивный способ проведения молекулярно-генетического анализа, который может быть использован для ранней диагностики, прогноза течения заболевания, мониторинга остаточной болезни или результатов лечения, а также выбора оптимальных для пациента схем лекарственной терапии. Наряду с разработкой тестов, основанных на исследовании панелей онкологически значимых генов или их участков, для различных форм генетически гетерогенных опухолей перспективным подходом может стать использование в качестве объекта жидкостной биопсии индивидуального спектра соматических мутаций конкретного больного, которые могут быть выявлены с помощью высокопроизводительного секвенирования опухолевой ткани.

Цель исследования – определить возможность использования различных методов детекции однонуклеотидных соматических мутаций, выявленных в опухолевой ткани конкретного пациента, в препаратах циркулирующей ДНК (цДНК) из плазмы крови, полученных до хирургического удаления опухоли, и выявить возможность количественной оценки доли альтернативного варианта в общем пуле цДНК.

Материалы и методы. В работе использованы препараты нормальной и опухолевой тканей, плазмы крови пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой, а также различные методы детекции однонуклеотидных соматических мутаций: полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени с интеркалирующим красителем или с зондами TaqMan, капельная цифровая ПЦР и высокопроизводительное секвенирование таргетных ампликонов.

Результаты. На примере соматической мутации в гене *TN1*, выявленной в опухолевой ткани пациента с гепатоцеллюлярной карциномой, разработаны и апробированы методы, каждый из которых позволяет специфично детектировать мутантный вариант в малых количествах (2 нг) цДНК из плазмы крови того же пациента. Использование капельной ПЦР и секвенирования таргетных ампликонов позволило провести количественную оценку долей мутантного варианта в общем пуле цДНК, которые составили 19,7 и 23,5 % соответственно.

Заключение. Капельная цифровая ПЦР и таргетное секвенирование ампликонов позволяют не только надежно детектировать мутантные варианты в малых количествах цДНК, но и адекватно проводить их количественную оценку, что особенно важно для разработки способов мониторинга опухолевого роста в процессе лечения. Близкие значения доли мутантного варианта в цДНК, детектированной этими методами, свидетельствуют о точности количественного анализа и возможности их использования для кросс-валидации получаемых результатов.

Ключевые слова: гепатоцеллюлярная карцинома, циркулирующая ДНК, соматические мутации, жидкостная биопсия

Для цитирования: Дьяков Л.М., Кривцова О.М., Хесина П.А. и др. Методы детекции специфических для опухолевой ткани однонуклеотидных соматических мутаций в препаратах цДНК из плазмы крови. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(3):24–37. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-24-37

Methods for the detection of tumor-specific single nucleotide somatic mutations in plasma cDNA samples

L.M. Dyakov¹, O.M. Krivtsova¹, P.A. Khesina^{1,2}, I.F. Kustova¹, N.A. Dyakova¹, N.S. Muge^{3,4}, N.E. Kudashkin¹, Yu.I. Patyutko¹, N.L. Lazarevich^{1,2}

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

²biological faculty of the M.V. Lomonosov Moscow State University; Bld. 12, 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia;

³Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography; 19 Okruzhnoy proezd, Moscow 105187, Russia;

⁴N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences; 26 Vavilova St., Moscow 119334, Russia

Contacts: Natalia Leonidovna Lazarevich lazarevich.nl@gmail.com

Introduction. Liquid biopsy is considered as a minimally invasive method of molecular genetic analysis that can be used for early diagnosis, prognosis of disease development, monitoring of residual disease or treatment outcomes, and selection of optimal drug therapy schemes for a patient. Along with the development of tests based on the study of panels of oncologically significant genes or their regions, for various forms of genetically heterogeneous tumors a promising approach could be the use as an object of liquid biopsy of an individual spectrum of somatic mutations of a particular patient that can be detected on the basis of high-throughput sequencing of tumor tissue.

Aim. To determine the applicability of different methods for detecting single-nucleotide somatic mutations detected in tumor tissue of a particular patient in cDNA preparations from blood plasma obtained before surgical removal of the tumor and to evaluate the possibility of quantifying the proportion of the alternative variant in the total pool of cDNA.

Materials and methods. We used normal and tumor tissue, as well as blood plasma samples from patients with hepatocellular carcinoma, and various methods for detecting single-nucleotide somatic mutations: real-time polymerase chain reaction (PCR) with intercalating dye or with TaqMan probes, droplet digital PCR and high-throughput sequencing of target amplicons.

Results. Using the example of a somatic mutation in the *TLN1* gene detected in tumor tissue of a patient with hepatocellular carcinoma, methods were developed and tested, each of which allows specific detection of the mutant variant in small amounts (2 ng) of cDNA from the blood plasma of the same patient. The use of droplet PCR and target amplicon sequencing methods allowed us to quantify the proportion of the mutant variant in the total cDNA pool, which was 19.7 and 23.5 %, respectively.

Conclusion. Among the methods investigated, droplet digital PCR and targeted amplicon sequencing allow not only reliable detection of mutant variants in small amounts of cDNA, but also adequate quantification, which is particularly important for the development of ways to monitor tumor growth during treatment. The close values of the proportion of mutant variants in cDNA detected by these methods indicate the accuracy of quantitative analysis and the possibility of their use for cross-validation of the results obtained.

Keywords: hepatocellular carcinoma, circulating DNA, somatic mutations, liquid biopsy

For citation: Dyakov L.M., Krivtsova O.M., Hesina P.A. et al. Methods for the detection of tumor-specific single nucleotide somatic mutations in plasma cDNA samples. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(3):24–37. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-24-37

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время жидкостная биопсия рассматривается как перспективный способ проведения малоинвазивного молекулярно-генетического анализа, который может быть использован для ранней диагностики, прогноза течения заболевания, мониторинга остаточной болезни или результатов лечения, а также для выбора оптимальных для пациента схем лекарственной терапии [1–3]. Наиболее значимых успехов в этом направлении удалось достичь с помощью использования методов, направленных на выявление в крови и других жидкостях организма циркулирующих ДНК (цДНК), которые образуются в результате программируемой/некротической гибели нормальных или опухолевых клеток или направленно секретируются клетками. К несомненным преимуществам этого подхода относятся возможность неинвазивного получения материала для анализа и динамического наблюдения, обеспечиваемая ограниченным сроком жизни макромолекул в биологических жидкостях, а также «сглаживание» эффекта внутриопухолевой гетерогенности и различий в профиле генетических нарушений между разными участками опухоли за счет тестирования общего пула исследуемых маркеров в кровотоке.

За последние годы перспективность использования методов жидкостной биопсии для детекции опухоли-специфических нарушений в цДНК была продемонстрирована не только в фундаментальных, но и в клинических исследованиях [4, 5]. Ярким примером возможности применения такого подхода при выборе тактики лечения пациентов с немелкоклеточным раком легкого стала разработка на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени теста Cobas EGFR Mutation Test v2, позволяющего выявлять клинически значимые мутации в экзонах 18–21 гена *EGFR*, определяющие чувствительность опухолевых клеток к таргетным препаратам [6]. Разработаны и проходят клиническую апробацию в качестве средств вспомогательной диагностики для оценки чувствительности пациентов с некоторыми типами солидных опухолей к таргетным препаратам мультигенные панели онкологически значимых генов или их участков для высокопроизводительного секвенирования цДНК из плазмы крови.

Безусловно, одним из критических факторов для дальнейшего развития и клинической адаптации таких технологий является выбор спектра молекулярных нарушений, характерных для конкретных типов опухолей.

Эта проблема особенно актуальна для генетически гетерогенных типов опухолей, характеризующихся высоким межопухолевым разнообразием спектра функционально значимых соматических нарушений.

К таким типам опухолей, в частности, относится гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) — преобладающая форма первичных опухолей печени, которая является 6-й по распространенности и 3-й по уровню смертности формой рака в мире [7]. Для ГЦК характерны поздняя диагностика, быстрая бессимптомная прогрессия опухоли, высокая устойчивость к химиотерапевтическим препаратам и крайне высокая гетерогенность драйверных генетических нарушений [8].

Наиболее часто встречающимися геномными нарушениями при гепатоканцерогенезе являются мутации промоторной области гена *TERT*, а также кодирующих участков генов бета-катенина (*CTNNB1*) (около 25 % случаев, чаще всего в вирус-ассоциированных ГЦК) и опухолевого супрессора *TP53* (25–40 % случаев), которые в большинстве случаев являются взаимоисключающими [9, 10]. Однако даже эти гены могут быть повреждены в разных участках своей кодирующей последовательности, что существенно затрудняет детекцию нарушений с помощью стандартизованных лабораторных тестов, не использующих мультигенные таргетные панели и технологии высокопроизводительного секвенирования. Одним из вариантов решения этой проблемы является разработка панелей для выявления в цДНК эпигенетических маркеров опухоли (например, сайтов аномального метилирования), которые могут иметь более универсальный характер [11, 12].

Для ГЦК и других форм генетически гетерогенных опухолей в качестве альтернативного подхода рассматривается применение в качестве объекта жидкостной биопсии индивидуального спектра мутаций конкретного пациента, которые могут быть выявлены на основании высокопроизводительного секвенирования опухолевой ткани. Определение таких мутаций в цДНК можно использовать для определения минимальной остаточной болезни, мониторинга рецидивирования опухолевого процесса у больных, перенесших резекцию, или эффективности лечения при терапии таргетными препаратами [12].

К настоящему времени в научной литературе можно найти единичные исследования, посвященные детекции соматических мутаций в отдельных генах в образцах цДНК конкретных пациентов с ГЦК. Для выявления таких нарушений применяют ПЦР в реальном времени, капельную цифровую ПЦР или высокопроизводительное таргетное секвенирование целевых ампликонов с высоким покрытием. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки, однако стандартизованных подходов, которые могли бы быть использованы для чувствительной детекции персонализированного спектра мутаций методом жид-

костной биопсии, к настоящему времени не предложено.

Цель настоящей работы — определить возможность использования различных методов детекции однонуклеотидных соматических мутаций, выявленных в опухолевой ткани конкретного пациента, таких как ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем или зондами TaqMan, капельная цифровая ПЦР и высокопроизводительное секвенирование таргетных ампликонов в препаратах цДНК из плазмы крови, полученных до хирургического удаления опухоли, а также оценить возможность количественной оценки доли альтернативного варианта в общем пуле цДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические образцы. В работе использованы образцы нормальной и опухолевой тканей печени пациентов с гистологически верифицированным диагнозом «гепатоцеллюлярная карцинома», полученные при резекции опухолей в хирургическом отделении опухолей гепатопанкреатобилиарной зоны Научно-исследовательского института клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также образцы плазмы крови, полученные от тех же пациентов до начала лечения. Сбор образцов проводили после подписания больными информированного согласия на использование биологического материала. Образцы тканей помещали в стерильные криопробирки, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре не менее -70°C .

Для получения препаратов плазмы крови использовали венозную кровь, собранную в вакуумные пробирки, содержащие $\text{K}_3\text{-ЭДТА}$, объемом 9 мл (Greiner Bio-One, Германия). Осаждение форменных элементов крови проводили путем центрифугирования в горизонтальном роторе в течение 20 мин на скорости 1300 g не позднее 2 ч после взятия крови. Слой плазмы, находящийся в верхней части пробирки, отбирали, не задевая промежуточный слой, и повторно центрифугировали в течение 10 мин на скорости 1300 g. Плазму разливали по 1 мл в криопробирки и хранили при температуре не выше -70°C , не размораживая.

Выделение ДНК. Выделение геномной ДНК проводили из замороженных в жидком азоте образцов неопухолевых и опухолевых тканей печени, масса которых не превышала 30 мг, с помощью набора для выделения геномной ДНК PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Циркулирующую ДНК выделяли из 1 мл плазмы крови с использованием набора QIAamp ccfDNA/RNA kit (Qiagen, США). Концентрацию препаратов ДНК определяли на спектрофотометре Qubit с помощью набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo FS, США).

Дизайн праймеров и зондов. Для анализа нуклеотидных последовательностей в референсном геноме человека (версия hg19/GRCh37) использовали

платформу Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>). Дизайн праймеров и зондов проводили с использованием программ и сервисов для подбора и анализа олигонуклеотидных праймеров Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), Primer3Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). Синтез праймеров и зондов осуществляли в ООО «ДНК-Синтез» (Россия). Последовательности праймеров представлены в табл. 1.

Методы полимеразной цепной реакции в реальном времени. Все варианты ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX Connect (Bio-Rad Laboratories, США) в 96-луночных планшетах. Реакционная смесь одной пробы объемом 25 мкл содержала 2,5 мкл 10-кратного реакционного буфера, 0,4 мкМ специфических праймеров, 1,5 ед. SynTaq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами, 0,25 мМ дезоксинуклозид-трифосфатов, 2,5 мМ MgCl₂; 2 нг геномной или цДНК, деионизованную воду (ООО «Синтол», Россия). Все эксперименты проводили не менее чем в 3 независимых повторах.

Алель-специфическую ПЦР с интеркалирующим красителем проводили с использованием набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии красителя EvaGreen, R-441 (ООО «Синтол», Россия) согласно рекомендациям производителя. Для детекции альтернативного варианта ПЦР выполняли при следующих режимах: начальная денатурация — 5 мин при 95 °С; 40 циклов — 30 с при 95 °С, 30 с при 67 °С, 30 с при 72 °С, регистрация сигнала — 10 с при 87 °С. Для детекции референсного варианта отжиг проводили при 65 °С, регистрацию флуоресценции — при 72 °С.

Для постановки *аллель-специфической ПЦР с зондами TaqMan* использовали набор реагентов для проведения ПЦР в реальном времени R-412 (ООО «Синтол», Россия) согласно рекомендациям производителя. Детекцию альтернативного варианта проводили при следующих режимах: начальная денатурация — 3 мин при 95 °С, 40 циклов — 30 с при 95 °С, 30 с при 63,7 °С, 30 с при 72 °С. Для детекции референсного варианта отжиг проводили при 61,7 °С. Анализ данных по каждому маркеру проводили с помощью программы Bio-Rad CFX Maestro (версия 1.1) в режиме количественной оценки.

Капельная цифровая полимеразная цепная реакция. Для проведения цифровой капельной ПЦР с зондами TaqMan использовали генератор капель Bio-Rad QX200 Droplet Generator, амплификатор C1000 Touch Thermal Cycler и счетчик капель Bio-Rad QX200 Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories, США). Реакционная смесь одной пробы объемом 20 мкл содержала: 2 нг геномной или цДНК; 250 нМ зондов TaqMan; 900 нМ праймеров; 10 мкл 2х реакционной смеси Bio-Rad Supermix for probes (Bio-Rad Laboratories, США). Анализ результатов проводили в программе QuantaSoft (Bio-Rad Laboratories, США) по протоколу SNV. При анализе результатов оценивали соотношение количества капель, флуоресцирующих в каналах FAM (референсный или альтернативный вариант *TLN1*), к количеству капель, флуоресцирующих в канале HEX (*ACTB*).

При проведении амплификации использовали следующий температурный режим: начальная денатурация — 10 мин при 95 °С, 40 циклов — 30 с при 95 °С, 30 с при 62 °С, 30 с при 72 °С.

Таблица 1. Используемые в работе праймеры и зонды

Table 1. Primers and probes used in the study

Праймер Primer	Последовательность (5'-3') Subsequence (5'-3')	Метод Method	Температура отжига, °С Annealing temperature, °C	Размер ампли- кона, п. н. Amplicon size, bp
TLN1-NM прямой TLN1-NM forward	GGGAGGGCATCC TGAAGA7TG	Алель-специфиче- ская ПЦР с интеркалирующим красителем Allele-specific PCR with intercalating dye	65,0	205
TLN1-AM прямой TLN1-AM forward	AGGGAGGGCAT CCTGAAGA7TA		67,0	206
TLN1-R обратный TLN1-R reverse	TAGGGGCATCA GGTCACTACC		—	—
TLN1Pr-LMRef прямой TLN1Pr-LMRef forward	CCTCAGGGAGGG CATCCTGAAGA7TG	Алель-специфи- ческая ПЦР с зондом TaqMan, капельная цифровая ПЦР Allele-specific PCR with TaqMan probe, droplet digital PCR	61,7	154
TLN1Pr-LMAlt прямой TLN1Pr-LMAlt forward	AGGGAGGGCA TCCTGAAGA7TA		63,7	150
TLN1Pr-R обратный TLN1Pr-R reverse	ACCCAGCTTG ACCACATCAG		—	—
TLN1Pr-Probe TaqMan-зонд TLN1Pr-Probe TaqMan probe	FAM- TGCAAAACGCAGCTG GGAGCCA-BHQ1		—	—

Окончание табл. 1

The end of table 1

Праймер Primer	Последовательность (5'-3') Subsequence (5'-3')	Метод Method	Температура отжига, °C Annealing temperature, °C	Размер ампли- кона, п. н. Amplicon size, bp
ACTB-DNA-F прямой ACTB-DNA-F forward	GCAAGTCTTC TGGACTGTGA	Алель-специфиче- ская ПЦР с TaqMan- зондом, капельная цифровая ПЦР Allele-specific PCR with TaqMan probe, droplet digital PCR	63,5	96
ACTB-DNA-R обратный ACTB-DNA-R reverse	CTCCCTTGAA GGTTGCAGAG			
ACTB-DNA-probe TaqMan-зонд ACTB-DNA-probe TaqMan probe	HEX- AGCCACTGTGTGCTG GGTGGTGGT-BHQ1			
16-YAP1-F	TGACATGGAGT CTGTTTTGGCTG	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	72,0	124
16-YAP1-R	TCCGGTGCA TGTGTCTCCTT			
16-LTA4H-F	GGA CTCTTAAG GTTCTTAAGTTT	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	62,0	150
16-LTA4H-R	ATGACCTATTG GTCCTGCCA			
16-MCCC2-F	TGTGGGGCCGT CCTGAGGTTA	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	72,0	127
16-MCCC2-R	TGGTAGAGG GCAGAGCCCA			
16-HNRNPA0-F	GCTTTCTTCAC CTCCACGCGA	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	72,0	126
16-HNRNPA0-R	CGACAAGCAG TCCGGCAAGA			
16-INTS1-F	CATGAAGAGCG TGCGCAGAAAG	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	61,0	126
16-INTS1-R	ATGAGCAGACC ACGTGTGAGG			
16-STK3-F	AATTCCTAGTGGTT TCTTGGTCTCCA	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	62,0	122
16-STK3-R	ACTGCGAAAAGA CAGCCCATTCT			
16-TLN1-F	CAGCTGCGTTT TGCACCAGGA	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	67,0	109
16-TLN1-R	AGCGGGTAGGGG AGATCTGACTAA			
16-CNPY3-F	ACACAAAGGGGT CAAGGTGGTG	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	68,0	126
16-CNPY3-R	ACTGGGCACA GCAACCCTTC			

Примечание. Жирным шрифтом выделены позиции, соответствующие заменам, курсивом — дополнительные мисмэтчи. Последовательности праймеров, использованных для таргетного секвенирования, имеют дополнительную последовательность ctacacgacgctcttccgac (для прямых праймеров) или cagacgtgtgctcttccgac (для обратных) на 5'-конце. ПЦР — полимеразная цепная реакция.

Note. Positions corresponding to substitutions are in bold type, additional mismatches are in italics. The primer sequences used for targeted sequencing have an additional sequence ctacacgacgctcttccgac (for forward primers) or cagacgtgtgctcttccgac (for reverse primers) at the 5'-end. PCR — polymerase chain reaction.

Секвенирование целевых ампликонов на платформе Illumina. Для подготовки библиотек для секвенирования на MiSeq целевые участки, содержащие однонуклеотидные соматические мутации, специфические для опухолевой ткани пациента 16, амплифицировали из общего пула геномной или цДНК с помощью фланкирующих праймеров (см. табл. 1), содержащих на 5'-конце адаптерные последовательности, комплементарные 3'-участкам P5 и P7 адаптеров Truseq Illumina. Амплификацию проводили на приборе C1000 Touch Thermal Cycler с помощью SNPdetect полимеразы (PK022, ЗАО «Евроген», Россия) и используя в качестве матрицы 2 нг геномной ДНК или цДНК каждого образца. Мониторинг эффективности ПЦР проводили по результатам параллельных реакций, проводимых в присутствии красителя EvaGreen. После завершения реакции выполняли анализ размера и количества ампликонов в 2 % агарозном геле. Программа и условия ПЦР: начальная денатурация — 3 мин при 95 °C, 37 циклов — 30 с при 95 °C, 30 с при температуре, подобранной для каждой пары праймеров индивидуально, 30 с при 72 °C.

Продукты ПЦР очищали переосаждением с этиловым спиртом и ацетатом аммония, концентрацию определяли на спектрофотометре Qubit и доводили до 5 нг/мкл. К очищенным ампликонам в ходе дополнительной ПЦР (5 циклов) пришивали TruSeq-адаптеры с индивидуальной комбинацией прямого и обратного индексов для каждого образца. Результат реакции контролировали на агарозном электрофорезе (добавление адаптеров приводит к увеличению длины продукта на ~90 п. н.).

Очистку продукта проводили на магнитных частицах AMPure Beads (Beckman Coulter, США). После определения концентрации каждого ампликона библиотеки объединяли в эквимольном соотношении, доводили до концентрации 5 нМ и денатурировали. Полученный образец разводили до 10 концентрации пМ, добавляли 5 % контрольной библиотеки PhiX, наносили на картридж MiSeq Reagent Kit v2 Nano и секвенировали на приборе MiSeqDX (Illumina, США). Демультимплексирование библиотек проводили с помощью программного обеспечения, предустановленного на приборе. Полученные fq-файлы анализировали с помощью программы fastQC, проводили объединение встречных ридов в программе usearch fastq-mergепairs, картировали на референсные последовательности ампликонов и создавали индексированные bam-файлы для каждого локуса в программе SeqMan Ngen 12.0.1 (DNASTAR, США). Анализ изменчивости выполняли по результатам визуализации ридов в программе Integrative Genomics Viewer (IGV) v. 2.4.4. [13] относительно референсных последовательностей ампликонов.

Секвенирование по Сэнгеру. Секвенирование продуктов ПЦР проводили с обеих цепей ДНК методом Сэнгера на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems

3730 DNA Analyzer в Центре коллективного пользования «Геном» при Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для того чтобы сопоставить возможности и ограничения различных методов детекции однонуклеотидных мутаций, мы использовали одни и те же препараты геномной ДНК из нормальной и опухолевой тканей печени и цДНК тех же пациентов. В работе были применены образцы ткани и плазмы крови больных с гистологически верифицированным диагнозом «гепатоцеллюлярная карцинома». Случай 16 представляет собой крупную опухоль трабекулярного строения низкой степени дифференцировки, стадия П1В (T4N0M0), с признаками сосудистой инвазии, цирроза и очагами некроза. Возраст пациента — 68 лет, пол — женский. Случай 28 — опухоль трабекулярного строения умеренной степени дифференцировки, стадия II (T2N0M0), без признаков сосудистой инвазии, со слабо выраженным фиброзом. Возраст пациента — 77 лет, пол — мужской. Оба случая не ассоциированы с хронической инфекцией вирусами гепатита В или С. Среднее количество цДНК, выделяемое из 1 мл плазмы крови, для пациента 16 составило 70 нг, для пациента 28 — 110 нг.

В качестве модельной системы для разработки методов детекции однонуклеотидных замен, выявленных в опухолевой ткани, в цДНК тех же пациентов была использована однонуклеотидная соматическая мутация в гене талин 1 (*TLN1*) — замена С/Т в положении chr9:35704152 по сборке генома человека hg19 (NM_006289.3: c.6067G>A; NP_006280.3: p.Ala2023Thr), определенная нами ранее на основании полно-транскриптомного секвенирования в опухолевой ткани пациента 16 и подтвержденная секвенированием по Сэнгеру (мутация выявляется в геномной ДНК из опухолевой ткани и не выявляется в неопухолевой ткани печени пациента 16). Эта мутация приводит к аминокислотной замене Ala2023Thr в цитоскелетном белке талин 1, который концентрируется в областях межклеточных контактов и играет важную роль в сборке актиновых филаментов и регуляции подвижности клеток. По данным, полученным с помощью различных алгоритмов предсказания функциональной значимости мутаций, эта замена является потенциально патогенной и расценивается нами как возможный драйвер опухолевого роста.

Для выявления этой мутации в нормальной и опухолевой тканях печени, а также в препаратах цДНК было использовано несколько экспериментальных подходов.

1. *Алель-специфическая ПЦР в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen* проводилась с использованием 2 прямых (аллель-специфических) и 1 обратного (общего для аллель-специфических) праймеров в режиме реального времени. Аллель-специфические (прямые) праймеры на референсный (Ref) и мутантный

(Alt) варианты подобраны таким образом, чтобы их 3'-концевой нуклеотид был комплементарен нуклеотиду, находящемуся в точке мутации, что дестабилизирует связывание ДНК-полимеразы с матрицей, препятствуя образованию неспецифического ПЦР-продукта. Кроме того, были созданы соответствующие описанным аллель-специфические праймеры с неполной комплементарностью, обеспечиваемой за счет внесения дополнительных мисмэтчей в 3-й позиции от 3'-конца, которые, по данным литературы, повышают эффективность распознавания искомого аллеля по сравнению с альтернативным вариантом [14].

Для каждой пары аллель-специфических праймеров были проведены подбор температуры, калибровка и определение оптимальных условий ПЦР с использованием последовательных двукратных разведений геномной ДНК из нормальной (16N) и опухолевой (16T) тканей пациента, последняя из которых содержит как мутантную, так и нормальную копию *TLN1*. Результаты исследования показали, что только праймеры с дополнительным мисмэтчем в 3-й позиции обеспечивают специфичную дифференциальную детекцию мутантного и нормального аллелей в ДНК из опухолевых и нормальных тканей соответственно.

Дальнейшие исследования проводили путем постановки независимых реакций с праймерами на референсный и альтернативный варианты на препаратах геномной ДНК нормальной и опухолевой тканей печени, а также цДНК пациента 16 (16N, 16T и 16C соответственно) и на аналогичных образцах пациента 28, в нормальной и опухолевой тканях которого исследуемая мутация отсутствовала (28N, 28T и 28C соответственно).

Мы установили, что разработанный метод позволяет детектировать мутантный аллель даже в небольшом

количестве (2 нг) опухолевой ДНК и цДНК пациента 16, но не в образцах геномной или цДНК пациента 28 и ДНК из неопухолевой ткани пациента 16. Типичный результат эксперимента представлен на рис. 1.

Использованный метод не позволяет провести точное количественное определение доли мутантного варианта, однако с применением калибровочных кривых, построенных на основании последовательных двукратных разведений ДНК, был выполнен приблизительный расчет количества нормального и мутантного аллелей в исследованных образцах. При использовании допущения, что в геномной ДНК из опухолевой ткани содержится равное количество копий мутантного и нормального аллелей, по усредненным данным нескольких экспериментов доля мутантного варианта среди суммарного количества ампликонов *TLN1* в цДНК пациента 16 составила 11 %.

2. Более точная оценка доли мутантного аллеля может быть достигнута при использовании метода *аллель-специфической ПЦР в реальном времени с зондами TaqMan*.

В этом случае могут быть использованы 2 варианта дизайна праймеров и зондов: когда альтернативный нуклеотид расположен в одном из праймеров, а зонд *TaqMan* для детекции является общим (1-й вариант), либо когда альтернативный нуклеотид расположен в последовательности зонда, а праймеры являются универсальными (2-й вариант).

Для разработки 1-го варианта ПЦР с зондами *TaqMan* были использованы модификации праймеров к референсной (*TLN1Pr-MRef*) и альтернативной (*TLN1Pr-MAlt*) последовательности *TLN1*, разработанных для ПЦР с *EvaGreen* (с дополнительными мисмэтчами), которые совместимы с универсальным зондом *TaqMan*, меченным флуорофором FAM, расположенным внутри ампликона. Для нормализации количества

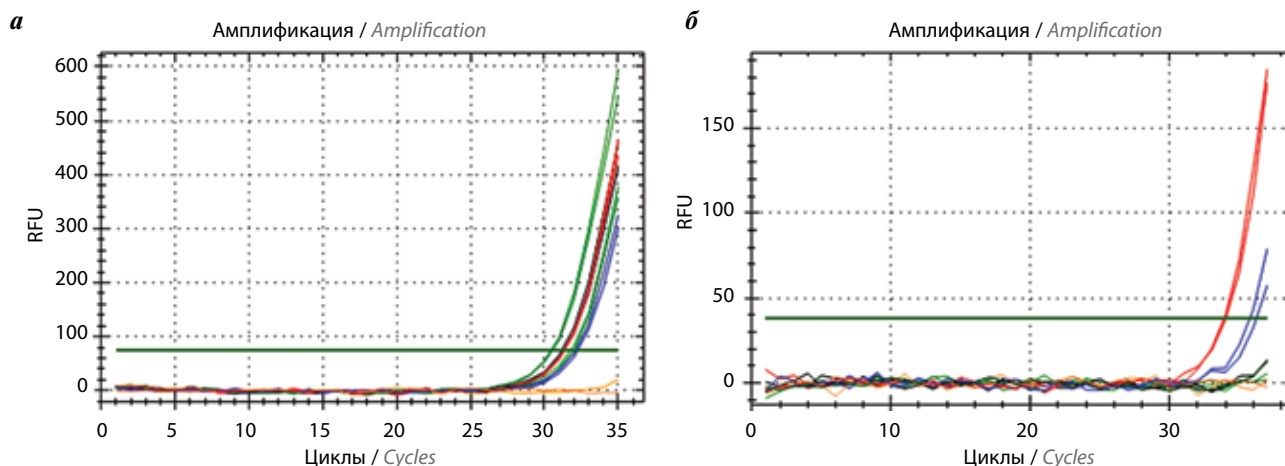


Рис. 1. Результат определения референсного (а) и альтернативного (б) аллелей гена *TLN1* в образцах ДНК пациентов 16 и 28 методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции с красителем *EvaGreen*. Образец 16Т обозначен красным цветом, 16С — синим, 16N — черным, образцы пациента 28 — зеленым, контрольный образец без ДНК — оранжевым. RFU — относительные единицы флуоресценции

Fig. 1. The result of determining the reference (a) and alternative (b) allele of the *TLN1* gene in the DNA samples of patients 16 and 28 by allele-specific polymerase chain reaction with *EvaGreen* dye. Sample 16T in red, 16C in blue, 16N in black, patient 28 samples in green, no DNA control in orange. RFU — relative fluorescence units

ДНК, внесенной в реакцию, были использованы праймеры и меченный флуорофором HEX TaqMan-зонд к геномной последовательности гена бета-актина (*ACTB*). При таком дизайне праймеров и зондов оценка присутствия в образце референсного и мутантного вариантов происходит на основании постановки 2 независимых реакций с референсными или мутантными праймерами соответственно, а нормировка результатов осуществляется по данным ПЦР с праймерами и зондом к *ACTB*, входящими в каждую реакцию. Для каждого набора праймеров и зондов были проведены подбор температуры, калибровка и определение оптимальных условий ПЦР для выявления референсного или альтернативного вариантов с использованием геномной ДНК из опухолевой ткани пациента 16 (16T) и продемонстрирована возможность анализа ампликонов *TLN1* и *ACTB* в режиме мультиплексной ПЦР.

В результате исследований, проведенных на описанной выше панели геномной и цДНК пациентов 16 и 28, было установлено, что, как и в предыдущем случае, праймеры и зонд к альтернативному варианту гена *TLN1* специфически детектируют мутантный аллель только в препаратах геномной ДНК из опухолевой ткани и цДНК из плазмы крови пациента 16 (табл. 2). Анализ результатов реакции проводили по относительному количеству ДНК мутантного или нормального аллелей с использованием калибровочных кривых, исходя из допущения, что доля мутантного аллеля в опухолевой ткани составляет 50 %, и нормализовали на количество ДНК *ACTB* в той же реакции. Относительная доля мутантного аллеля среди суммарного количества ампликонов *TLN1* в цДНК пациента 16 при таком анализе составила 36 %. Проведенный таким же образом анализ результатов реакции с праймерами к референсному варианту (калибровка построена по последовательным разведениям геномной ДНК из нормальной ткани) свидетельствует о том, что этот способ является адекватным (так, например, доля нормального аллеля в опухолевой ткани составила около 50 %), но не количественным (сумма долей мутантного и нормального вариантов в препаратах цДНК далека от 100 %).

Второй вариант с использованием общих праймеров и 2 вариантов зондов TaqMan, комплементарных участку с мутацией, проведенный на аналогичной панели образцов, не позволил достичь специфического разделения мутантного и нормального вариантов (данные не представлены). Это прежде всего связано с тем, что для коротких ампликонов, длина которых ограничена малой размерностью основного пула цДНК (около 160 п. н.), существует крайне небольшое количество вариантов олигонуклеотидов, удовлетворяющих условиям подбора эффективных и специфичных праймеров и зондов.

Таким образом, среди методов, основанных на ПЦР в реальном времени, наиболее перспективным для детекции однонуклеотидных соматических мутаций

представляется вариант с аллель-специфическими праймерами и универсальным зондом TaqMan. Внесение дополнительных мисмэтчей в районе 3'-конца аллель-специфического праймера помогает повысить специфичность распознавания референсного и альтернативного вариантов, а использование калибровочных кривых — провести приблизительную оценку доли мутантного ампликона в образце.

Капельная цифровая полимеразная цепная реакция.

В экспериментах на основе капельной цифровой ПЦР, которая позволяет выполнять количественную детекцию независимо амплифицированных в отдельных каплях эмульсии единичных молекул ДНК, были применены праймеры и зонды, апробированные при постановке аллель-специфической ПЦР с зондами TaqMan. Реакцию проводили с использованием системы для капельной цифровой ПЦР QX0200 (BioRad, США). На 1-м этапе с использованием препаратов ДНК из нормальной и опухолевой тканей печени пациента 16 проводили подбор температуры, которая обеспечивает специфическую амплификацию с праймерами к референсной или альтернативной последовательности гена *TLN1*. Дальнейшие исследования выполняли на описанной выше панели образцов геномной и циркулирующей ДНК пациентов 16 (есть мутация *TLN1*) и 28 (нет мутации). В каждую реакцию брали 2 нг ДНК. Эксперименты проводили в мультиплексном режиме с праймерами и зондами к *TLN1* (референсный или альтернативный вариант — канал FAM) и *ACTB* (канал HEX) для контроля количества ДНК. Типичные результаты эксперимента представлены на рис. 2 а–г.

Представленные результаты наглядно демонстрируют, что референсный вариант *TLN1* детектируется во всех пробах, содержащих ДНК, а мутантный — только в образцах геномной ДНК из опухоли и в цДНК пациента 16, у которого данная мутация выявлена независимыми методами в опухолевой ткани. Для количественной оценки доли альтернативного аллеля в этих образцах была проведена нормализация рассчитанного программой QuantaSoft (Biorad) количества копий вариантов *TLN1* по количеству копий *ACTB* в каждой из реакций. Согласно проведенным расчетам, доля альтернативного варианта в геномной ДНК из опухолевой ткани составила 42 %, в цДНК — 19,7 % (рис. 2д).

Глубокое секвенирование ампликонов участка ДНК, содержащего таргетную мутацию, на платформе Illumina (MiSeq). Для создания и отработки протокола в целях получения и глубокого секвенирования библиотек ампликонов на платформе Illumina (MiSeq) использовали 7 однонуклеотидных соматических мутаций, выявленных на основании транскриптомного секвенирования в опухоли пациента 16. Соматический статус мутаций подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру (табл. 3). Кроме того, в качестве внутреннего негативного контроля была исследована последовательность гена *STK3*, не содержащая соматических мутаций.

Таблица 2. Результаты определения мутантного (TLN1Pr-MAlt) и нормального (TLN1Pr-MRef) вариантов гена TLN1 в препаратах геномной и циркулирующей ДНК 16 и 28 методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции с праймерами TaqMan

Table 2. Results of detection of mutant (TLN1Pr-MAlt) and normal (TLN1Pr-MRef) TLN1 gene variants in genomic and cDNA preparations 16 and 28 by allele-specific polymerase chain reaction with TaqMan primers

Образец Sample	Вариант гена Variant of the gene		АСТВ		Доля варианта гена, нормированного по АСТВ, % Proportion of variant of the gene normalized by АСТВ, %
	Пороговый цикл Threshold cycle	Относительное количество Relative amount	Пороговый цикл Threshold cycle	Относительное количество Relative amount	
Панель А – мутантный вариант гена TLN1 Panel A – mutant variant of the TLN1 gene					
16N	—	0	29,7	2,74	0
16T	36,34	2	30,25	2,00	50
16C	35,17	4,08	28,62	5,66	36
28N	—	0	30,47	1,63	0
28T	—	0	30,14	2,03	0
28C	—	0	28,93	4,6	0
H ₂ O	—	0	—	0	0
Панель Б – референсный вариант гена TLN1 Panel B – reference variant of the TLN1 gene					
16N	33,01	2,00	30,74	2,00	100
16T	34,31	0,94	30,81	1,94	48,0
16C	33,79	1,27	29,30	4,37	29,1
28N	32,02	3,50	31,23	1,55	226,0
28T	33,06	1,93	30,56	2,22	87,0
28C	32,99	2,00	29,67	3,61	55,0
H ₂ O	—	0	—	0	0

Для создания библиотек ампликонов, содержащих исследуемые мутации, были использованы фланкирующие праймеры, амплифицирующие участки ДНК размером от 109 до 150 п. н. и содержащие во внутренних районах участки соматических мутаций. На 5'-конце праймеры содержали адаптерные последовательности, комплементарные 3'-участкам P5 и P7 адаптеров TruSeq Illumina. Для каждой из полученных пар праймеров были подобраны оптимальные условия, обеспечивающие специфическую амплификацию исследуемых ампликонов. Для амплификации исследуемых участков в качестве матрицы использовали по 2 нг геномной (нормальной или опухолевой) ДНК или цДНК пациента 16. Мониторинг эффективности ПЦР проводили по результатам параллельных реакций в присутствии красителя EvaGreen. После завершения реакции, анализа размера и количества ампликонов в агарозном геле и их очистки к ампликонам путем дополнительной ПЦР пришивали TruSeq-адаптеры с индивидуальными индексами. Очищенные на маг-

нитных частицах ПЦР-продукты для каждого из районов объединяли в общий пул в эквимоллярных количествах и секвенировали на платформе Illumina MiSeq. После секвенирования и биоинформатической обработки данных определяли число ридов с нормальным или мутантным вариантом каждого из исследуемых генов в каждом из образцов и определяли процент мутантного аллеля в общем пуле цДНК. Результаты анализа представлены в табл. 3.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что все 7 мутаций определяются в геномной ДНК пациента 16, выделенной из опухолевой, но не из нормальной ткани, и являются соматическими (доля альтернативного аллеля составила от 45,7 до 60,9 %). Для всех исследованных ампликонов мутантная ДНК была выявлена и в препаратах цДНК, выделенных из плазмы крови этого больного перед операцией; доля альтернативного варианта составила от 5,1 до 29,6 % от общего количества проанализированных прочтений. Соматических мутаций в негативном контрольном

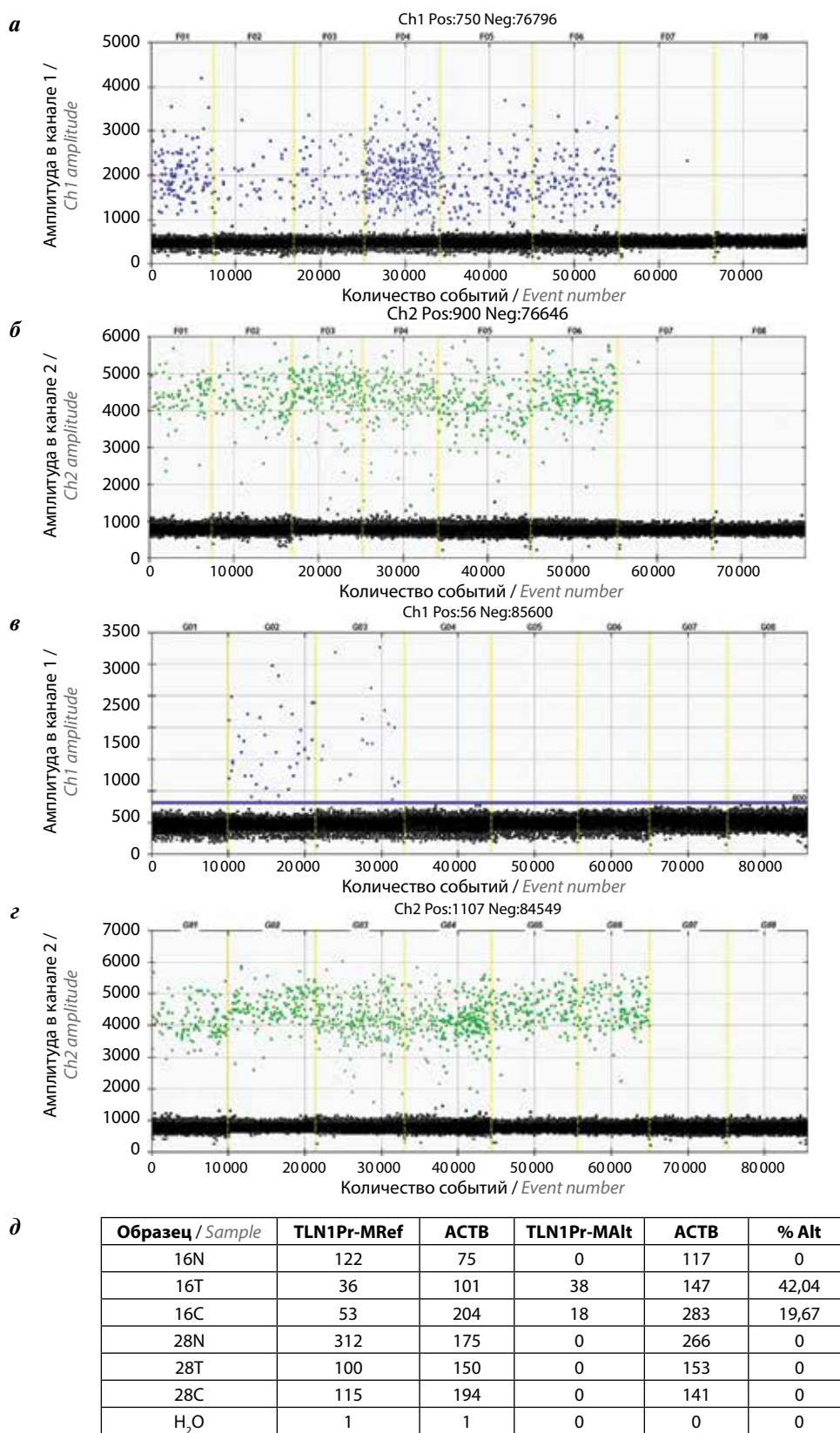


Рис. 2. Результаты цифровой полимеразной цепной реакции с праймерами и зондами к референсному (а) и мутантному (в) вариантам *TLN1* и соответствующие им реакции с праймерами к бета-актину (б, г); количество положительных капель в каждой реакции и доля мутантного варианта в препаратах (д). Порядок нанесения образцов ДНК в каждой панели: 1 – 16N, 2 – 16T, 3 – 16C, 4 – 28N, 5 – 28T, 6 – 28C, 7, 8 – вода

Fig. 2. Results of digital polymerase chain reaction with primers and probes for reference (a) and mutant (v) *TLN1* variants and corresponding reactions with primers for beta-actin (б, г); number of positive drops in each reaction and the proportion of the mutant variant in the samples (д). The order of applying DNA samples in each panel is 1 – 16N, 2 – 16T, 3 – 16C, 4 – 28N, 5 – 28T, 6 – 28C, 7, 8 – water

Таблица 3. Результаты исследования ампликонов, содержащих мутации, выявленные в опухолевой ткани пациента 16

Table 3. The results of the study of amplicons containing mutations detected in the tumor tissue of patient 16

Номер ампликона ?	Ген Gene	Хромосома Chromosome	Положение (hg 19) Position (hg 19)	Нуклеотидная замена (Ref/Alt) Nucleotide substitution (Ref/Alt)	Тип замены Type of substitution	% альтернативного варианта, РНК % of alternative variant, RNA	Тип мутации (секвенирование по Сэнгеру) Type of mutation (Sanger sequencing)	Доля альтернативного аллеля (глубокое секвенирование), % Proportion of alternative allele (deep sequencing), %		
								Печень Liver	Опухоль Tumor	цДНК cDNA
1	<i>TLN1</i>	9	35704152	C/T	Миссенс Missense	40,7	Соматическая Somatic	0,4	47,7	23,5
2	<i>YAP1</i>	11	102100656	T/G	Миссенс Missense	43,8	Соматическая Somatic	0,6	46,8	25,3
3	<i>LTA4H</i>	12	96412588	C/T	Миссенс Missense	43,1	Соматическая Somatic	1,0	53,0	29,6
4	<i>MCCC2</i>	5	70883332	C/A	«Стоп»-кодон "Stop"-codon	59,3	Соматическая Somatic	0,5	49,8	16,6
5	<i>HNRNPA0</i>	5	137089294	C/G	Миссенс Missense	58,3	Соматическая Somatic	0,3	47,1	5,1
6	<i>INTS1</i>	7	1526278	G/A	Миссенс Missense	70,4	Соматическая Somatic	0,7	60,7	14,1
7	<i>CNPY3</i>	6	42905542	G/T	«Стоп»-кодон "Stop"-codon	33,3	Соматическая Somatic	0,6	45,1	16,8
8	<i>STK3</i>	8	99468083	T	—	—	Нет мутации No mutation	0,2	0,1	0,1

ампликоне *STK3* не было выявлено ни в одном из образцов. Доля мутантных аллелей в образцах нормальной ткани ни в одном из случаев не превысила 1 %.

ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени в научной литературе опубликован ряд исследований, посвященных выявлению мутаций, характерных для опухолевой ткани конкретных пациентов, в соответствующих препаратах цДНК и продемонстрирована принципиальная возможность мониторинга течения заболевания в отдельных случаях. Аналогичные исследования выполнены и в отношении генетически гетерогенных типов опухолей, таких как ГЦК [15]. Например, при ультраглубоком (5500×) секвенировании образцов цДНК, полученных из плазмы и сыворотки 8 пациентов с ГЦК, подвергнутых хирургическому лечению, с использованием специально разработанной для ГЦК таргетной панели на 58 генов [16] достоверное присутствие мутантного аллеля хотя бы одного из исследованных генов было выявлено лишь в 4 (50 %) случаях ГЦК, причем все они были ассоциированы с инфекцией вирусами гепатита В или С. В 2 случаях «диагностических» мутаций не было обнаружено даже при секвенировании опухолевой ткани тех же пациентов.

Возможной альтернативой исследованию таргетных панелей, включающих ограниченное число онкологически значимых генов, является выполнение полноэкзомного секвенирования опухолевой ДНК для выявления индивидуальных мутаций, присущих конкретной опухоли. На основании анализа обнаруженных нарушений проводятся выбор клональных соматических мутаций и изготовление индивидуальных праймеров для проведения мультиплексной ПЦР и высокопроизводительного секвенирования полученных библиотек ампликонов. Этот подход активно используется в настоящее время, например, американской компанией Natera в тесте Signatera [17]. Помимо необходимости биоинформатического анализа данных и их функциональной интерпретации, такой подход требует разработки надежных методов, позволяющих уверенно проводить детекцию и качественную оценку доли мутантной опухоль-специфической ДНК в общем пуле цДНК из биологических жидкостей организма.

В настоящей работе мы исследовали возможность применения различных методов детекции однонуклеотидных соматических мутаций, выявленных в опухолевой ткани пациента с ГЦК при высокопроизводительном транскриптомном секвенировании, и возможность количественной оценки доли мутантного варианта

в цДНК. Полученные результаты свидетельствуют о том, что все использованные нами методы позволяют детектировать мутации, специфические для опухолевой ткани, в цДНК того же пациента, но обладают различными ограничениями и потенциалом для применения в жидкостной биопсии.

Важно отметить, что в исследованном нами случае при сравнении методов ГЦК при полнотранскриптомном высокопроизводительном секвенировании не было выявлено мутаций, затрагивающих «канонические» гены, задействованные в канцерогенезе, в том числе в участках, включенных в основные таргетные панели для выявления драйверных или терапевтически значимых нарушений (например, набор AmpliSeq Cancer HotSpot Panel v2 (Illumina, США), включающий горячие участки мутаций 50 опухоль-ассоциированных генов). Успешное выявление идентифицированных на основании транскриптомных данных уникальных для конкретного пациента и малоизученных вариантов свидетельствует о том, что такой подход может быть использован для поиска персонализированных маркеров для жидкостной биопсии.

Среди методов, основанных на ПЦР в реальном времени, наиболее перспективным для детекции одонуклеотидных соматических мутаций представляется вариант с аллель-специфическими праймерами, несущими дополнительные замены в районе 3'-конца аллель-специфического праймера, и универсальным зондом TaqMan. Такой подход обеспечивает специфичность распознавания референсного и альтернативного вариантов, однако количественная оценка доли мутантного варианта в этом случае ограничена необходимостью использования калибровочных кривых и при отсутствии специально разработанных стандартных образцов позволяет провести лишь приблизительную оценку доли мутантного ампликона в образце. Несмотря на это, можно признать, что описанный метод, более дешевый и простой, чем капельная ПЦР и таргетное секвенирование ампликонов, имеет явный потенциал для использования в качестве экспресс-метода, например, для отбора наиболее перспективных персонализированных маркеров для мониторинга динамики изменения опухолевого роста в ходе лечения.

Метод капельной цифровой ПЦР с аллель-специфическими праймерами и зондами TaqMan обеспечивает не только уверенную детекцию мутантных вариантов в небольших количествах цДНК, но и адекватную количественную оценку доли мутантного варианта в общем пуле цДНК без использования калибровочных кривых. Это свидетельствует о значительном потенциале применения такого подхода для жидкостной биопсии даже в случае невысокого содержания цДНК в препаратах плазмы крови, а также исследования опухолей небольшого размера или ранних стадий. Ограничением метода является лимитируемое количеством

каналов в приборе, малое количество маркеров, которые могут быть изучены в каждой реакции.

Глубокое таргетное секвенирование ампликонов, содержащих мутации, на платформе Illumina является более дорогостоящим методом и требует более продолжительной пробоподготовки. Однако этот подход позволяет существенно расширить количество анализируемых мутаций, что особенно важно, учитывая значительную внутриопухолевую гетерогенность злокачественных новообразований. Таргетное секвенирование также дает возможность провести корректную количественную оценку доли мутантного варианта в образцах.

Важно отметить, что для соматической мутации в гене *TLN1* доли альтернативного варианта в цДНК пациента 16, детектированные методами цифровой ПЦР и таргетного секвенирования ампликонов (19,7 и 23,5 % соответственно), очень близки. Это свидетельствует о точности количественного анализа, проведенного с помощью данных методов, и о возможности их использования для кросс-валидации полученных результатов. Согласно данным литературы, у пациентов с ГЦК доля альтернативного аллеля в цДНК для драйверных мутаций может достигать 12–37 %, что отражает, по-видимому, ключевую роль этих мутаций в возникновении опухоли у конкретного пациента, и, соответственно, высокую представленность альтернативного варианта в подавляющем большинстве опухолевых клонов [18].

В проведенном исследовании мы использовали препараты ДНК от пациентов с крупными клинически детектируемыми опухолями. В то же время необходимо отметить, что в описанных экспериментах была применена лишь небольшая часть цДНК, выделенная из 1 мл плазмы крови. В последующих исследованиях мы планируем не только повысить точность детекции методов, но и апробировать их на образцах, полученных от пациентов с ранними стадиями опухолевого процесса, и при возникновении рецидивов, и в ходе терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, среди исследованных подходов к детекции индивидуальных опухоль-специфичных соматических одонуклеотидных мутаций капельная цифровая ПЦР и таргетное секвенирование ампликонов позволяют не только надежно детектировать мутантные варианты в малых количествах цДНК из плазмы крови, но и адекватно проводить их количественную оценку, что особенно важно для разработки способов мониторинга опухолевого роста в процессе лечения. Близкие значения доли мутантного варианта в цДНК, детектированной этими методами, свидетельствуют о точности количественного анализа и возможности их использования для кросс-валидации получаемых результатов.

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

1. Siravegna G., Marsoni S., Siena S., Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(9):531–48. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.14
2. Wan J.C.M., Massie C., Garcia-Corbacho J. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 2017;17(4):223–38. DOI: 10.1038/nrc.2017.7
3. Cescon D.W., Bratman S.V., Chan S.M., Siu L.L. Circulating tumor DNA and liquid biopsy in oncology. *Nat Cancer* 2020;1(3):276–90. DOI: 10.1038/s43018-020-0043-5
4. Kilgour E., Rothwell D.G., Brady G., Dive C. Liquid biopsy-based biomarkers of treatment response and resistance. *Cancer Cell* 2020;37(4):485–95. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.012
5. Cisneros-Villanueva M., Hidalgo-Pérez L., Rios-Romero M. et al. Cell-free DNA analysis in current cancer clinical trials: a review. *Br J Cancer* 2022;126(3):391–400. DOI: 10.1038/s41416-021-01696-0
6. Keppens C., Palma J.F., Das P.M. Detection of EGFR variants in plasma: a multilaboratory comparison of a Real-Time PCR EGFR Mutation test in Europe. *J Mol Diagn* 2018;20(4):483–94. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2018.03.006
7. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660
8. Llovet J.M., Zucman-Rossi J., Pikarsky E. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16018. DOI: 10.1038/nrdp.2016.18
9. Zucman-Rossi J., Villanueva A., Nault J.C. et al. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2015;149(5):1226–39. PMID: 26099527. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.05.061
10. Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma. *Cell* 2017;169(7):1327–41. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.046
11. Кустова И.Ф., Макарова А.С., Лазаревич Н.Л. Потенциал использования биомаркеров метилирования для диагностики и прогноза гепатоцеллюлярной карциномы методом жидкостной биопсии. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(4):8–19. DOI: 10.17650/2313-805X-2018
12. Kustova I.F., Makarova A.S., Lazarevich N.L. Potential of the use of methylation biomarkers for diagnostics and prognosis of hepatocellular carcinoma in liquid biopsy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):8–19. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2018
13. Tran N.H., Kisiel J., Roberts L.R. Using cell-free DNA for HCC surveillance and prognosis. *JHEP Rep* 2021;3(4):100304. DOI: 10.1016/j.jhepr.2021.100304
14. Thorvaldsdottir H., Robinson J.T., Mesirov J.P. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 2013;14(2):178–92. DOI: 10.1093/bib/bbs017
15. Liu J., Huang Sh., Sun M. et al. An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods* 2012;8(1):34. DOI: 10.1186/1746-4811-8-34
16. Ng C.K.Y., Di Costanzo G.G., Terracciano L.M., Piscuoglio S. Circulating cell-free DNA in hepatocellular carcinoma: current insights and outlook. *Front Med (Lausanne)* 2018;5:78. DOI: 10.3389/fmed.2018.00078
17. Labgaa I., Villacorta-Martin C., D'Avola D. et al. A pilot study of ultra-deep targeted sequencing of plasma DNA identifies driver mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2018;37:3740–52. DOI: 10.1038/s41388-018-0206-3
18. Bratman S.V., Yang S.Y.C., Iafolla M.A.J. et al. Personalized circulating tumor DNA analysis as a predictive biomarker in solid tumor patients treated with pembrolizumab. *Nat Cancer* 2020;1(9):873–81. DOI: 10.1038/s43018-020-0096-5
19. Ikeda S., Tsigelny I., Skjerveik Å. et al. Next-generation sequencing of circulating tumor DNA reveals frequent alterations in advanced hepatocellular carcinoma. *The Oncologist* 2018;23(5):586–93. DOI: 10.1634/theoncologist.2017-0479

Вклад авторов

Л.М. Дьяков: разработка и оптимизация методов, проведение ПЦР, подготовка библиотек и проведение высокопроизводительного секвенирования;

О.М. Кривцова: анализ данных, дизайн праймеров, разработка и оптимизация методов, проведение ПЦР, подготовка библиотек и проведение высокопроизводительного секвенирования;

П.А. Хесина: подготовка библиотек и проведение высокопроизводительного секвенирования;

И.Ф. Кустова: разработка и оптимизация методов, проведение ПЦР, сбор клинических образцов, выделение нуклеиновых кислот;

Н.А. Дьякова: сбор клинических образцов, выделение нуклеиновых кислот;

Н.С. Мюге: подготовка библиотек и проведение высокопроизводительного секвенирования, разработка концепции исследования, метода таргетного секвенирования;

Н.Е. Кудашкин, Ю.И. Патютко: получение клинических образцов, сбор клинических данных;

Н.Л. Лазаревич: разработка концепции исследования, интерпретация данных, написание текста статьи, анализ данных, дизайн праймеров.

Authors' contributions

L.M. Dyakov: development and optimization of methods, PCR, library preparation and high-performance sequencing;

O.M. Krivtsova: data analysis, primer design, development and optimization of methods, PCR, library preparation and high-performance sequencing;

P.A. Khesina: library preparation and high-performance sequencing;

I.F. Kustova: development and optimization of methods, PCR, collection of clinical samples, isolation of nucleic acids;

N.A. Dyakova: collection of clinical samples, isolation of nucleic acids;

H.S. Muge: preparing libraries and conducting high-performance sequencing, developing a research concept, a targeted sequencing method;

N.E. Kudashkin, Yu.I. Patyutko: obtaining clinical samples, collecting clinical data;

N.L. Lazarevich: development of the research concept, interpretation of data, writing the text of the article, data analysis, design of primers.

ORCID авторов / ORCID of authors

Л.М. Дьяков / L.M. Dyakov: <https://orcid.org/0000-0002-1972-5138>

О.М. Кривцова / O.M. Krivtsova: <https://orcid.org/0000-0002-0207-2724>

П.А. Хесина / P.A. Khesina: <https://orcid.org/0000-0002-4208-5917>

И.Ф. Кустова / I.F. Kustova: <https://orcid.org/0000-0001-6480-0793>

Н.А. Дьякова / N.A. Dyakova: <https://orcid.org/0000-0002-7431-7129>

Н.С. Мюге / N.S. Muge: <https://orcid.org/0000-0001-8957-1931>

Н.Е. Кудашкин / N.E. Kudashkin: <https://orcid.org/0000-0003-0504-585X>

Ю.И. Патютко / Yu.I. Patyutko: <https://orcid.org/0000-0002-5995-4138>

Н.Л. Лазаревич / N.L. Lazarevich: <https://orcid.org/0000-0001-9560-1383>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда научных исследований (грант № 18-29-09164).

Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 18-29-09164).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по этике 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 local ethics committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia approved the protocol of the study.

All patients signed an informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 01.03.2022. **Принята к публикации:** 17.07.2022.

Article submitted: 01.03.2022. **Accepted for publication:** 17.07.2022.

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-38-48



Матриксные металлопротеиназы и белки теплового шока на внеклеточных везикулах у больных колоректальным раком: связь с метаболическим статусом

Н.В. Юнусова^{1,2}, Д.А. Сваровский², Е.Э. Дандарова², Д.Н. Костромицкий¹, А.А. Димча¹, О.В. Черемисина¹, С.Г. Афанасьев¹, А.И. Коновалов¹, Ж.А. Старцева¹, И.В. Кондакова¹, М.Р. Патышева¹, А.Е. Григорьева³, Л.В. Спирина^{1,2}

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

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

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук; Россия, 630090 Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8

Контакты: Дмитрий Андреевич Сваровский svarovsky.d.a@gmail.com

Введение. У большинства больных колоректальным раком (КРР) опухоль возникает на фоне метаболически здорового ожирения, или метаболического синдрома (более чем в 60 % случаев), ключевым патогенетическим моментом которого является развивающаяся гиперинсулинемия. Метаболические изменения также характерны для больных с полипами толстой кишки (ПТК), которые в настоящее время рассматриваются как наиболее значимые предраковые заболевания. Показано, что фракции малых внеклеточных везикул (ВВ) адипоцитарного происхождения специфически обогащены белками внеклеточного матрикса, включая матриксные металлопротеиназы (ММПs), шаперонами, а также некоторыми метаболическими ферментами, участвующими в синтезе липидов и углеводов. Это послужило причиной выбора экзосомальных маркеров в нашем исследовании. Сравнение экспрессии протеинов на CD9- и FABP4-позитивных ВВ будет полезно для объяснения некоторых клинических моментов, например эффективности терморадикотерапии или радиотерапии у больных КРР с ожирением, а также для более обоснованного поиска везикулярных прогностических маркеров у онкологических пациентов с ожирением. Цель исследования была сформулирована с учетом отсутствия в литературе данных об уровне экспрессии ММПs и белков теплового шока (HSPs) в составе тотального пула ВВ и в FABP4-позитивных ВВ у пациентов с ПТК и КРР.

Цель исследования – изучение уровня ММПs и HSPs на CD9- и FABP4-позитивных ВВ у пациентов с ПТК и КРР во взаимосвязи с метаболическим статусом.

Материалы и методы. В исследование были включены 12 больных КРР (T2–4N0–2M0; средний возраст 59,6 ± 1,6 года), проходивших лечение в отделении абдоминальной онкологии Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук с 2019 по 2021 г. В группу сравнения вошли 10 пациентов с ПТК. Уровень белков на поверхности CD9- и FABP4-позитивных ВВ был изучен с помощью проточной цитометрии.

Результаты. ММП9-позитивные ВВ чаще выявлялись у больных КРР по сравнению с пациентами с ПТК, однако ММП9+ММП2+TIMP-позитивные ВВ достоверно чаще обнаруживались у последних. Из изученных белков теплового шока на поверхности ВВ наиболее часто экспрессировался HSP60, причем HSP60-позитивные ВВ выявлялись на поверхности CD9-позитивных экзосом при ПТК гораздо чаще, чем при КРР. У больных КРР по сравнению с пациентами с ПТК среди FABP4-позитивных ВВ наблюдалось существенное увеличение доли трипл-позитивных ВВ и ВВ с фенотипом ММП9+ММП2+TIMP1+, что в целом может свидетельствовать о гиперэкспрессии ММП9 и TIMP1 адипоцитами или макрофагами жировой ткани у больных КРР. Корреляционный анализ выявил множественные связи отдельных фенотипов CD9-позитивных ВВ у больных КРР с индексом массы тела и уровнем холестерина липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови, в то время как фенотипы FABP4-позитивных ВВ были ассоциированы в основном с уровнем триглицеридов.

Заключение. Фенотипы CD9-позитивных и FABP4-позитивных циркулирующих ВВ перспективны в качестве предикторов для уточнения онкологического риска у больных с полипами толстой кишки, а также в плане объяснения эффективности лечения больных КРР с ожирением или метаболическим синдромом.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы, белки теплового шока, жировая ткань, внеклеточные везикулы, FABP4, колоректальный рак

Для цитирования: Юнусова Н.В., Сваровский Д.А., Дандарова Е.Э. и др. Матриксные металлопротеиназы и белки теплового шока на внеклеточных везикулах у больных колоректальным раком: связь с метаболическим статусом. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(3):38–48. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-38-48

Matrix metalloproteinases and heat shock proteins on extracellular vesicles in colorectal cancer patients: association with metabolic status

N.V. Yunusova^{1,2}, D.A. Svarovsky², E.E. Dandarova², D.N. Kostromitsky¹, A.A. Dimcha¹, O.V. Cheremisina¹, S.G. Afanasiev¹, A.I. Konovalov¹, Z.A. Startseva¹, I.V. Kondakova¹, M.R. Patysheva¹, A.E. Grigor'eva³, L.V. Spirina^{1,2}

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

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

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian branch of Russian Academy of Sciences; 8 Prospekt Akademika Lavrent'eva, Novosibirsk 630090, Russia

Contacts: Dmitry Andreevich Svarovski svarovsky.d.a@gmail.com

Introduction. In most patients with colorectal cancer (CRC), the tumor develops against the background of metabolically healthy obesity or metabolic syndrome (more than 60 % of patients), the key pathogenetic moment of which is developing hyperinsulinemia. Metabolic changes are also characteristic of patients with colon polyps (CP), which are currently considered as the most significant precancerous diseases. It has been shown that fractions of small extracellular vesicles (EVs) of adipocyte origin are specifically enriched in extracellular matrix proteins, including matrix metalloproteinases (MMPs), chaperones, and some metabolic enzymes involved in the synthesis of lipids and carbohydrates. This was the reason for choosing exosomal markers in our study. Comparison of protein expression on CD9- and FABP-4 positive vesicles will be useful to explain some clinical issues, such as the effectiveness of thermoradiotherapy or radiotherapy in obese CRC patients; for a more substantiated search for vesicular prognostic markers in obese cancer patients. However, taking into account the lack of data in the literature on the level of MMPs and HSPs expression in the composition of the total pool of EVs and in the composition of FABP4-positive EVs in patients with PTC and CRC patients, the aim of the work was formulated.

Aim. Study of the level of MMPs and heat shock proteins (HSPs) on CD9- and FABP4-positive EVs in patients with CP and CRC in relation to metabolic status.

Materials and methods. The study included 12 patients with CRC (T2–4N0–2M0; mean age 59.6 ± 1.6 years) who were treated at the Department of Abdominal Oncology of the Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center from 2019 to 2021. The comparison group included 10 patients with CP. The level of proteins on the surface of CD9- and FABP4-positive EVs was studied using flow cytometry.

Results. MMP9-positive EVs were detected more often in CRC patients than in CP patients, however, MMP9+MMP2+TIMP-positive EVs were significantly more frequently detected in CP patients. Among the studied heat shock proteins, HSP60 was most often expressed on the surface of EVs, and HSP60-positive EVs were detected on the surface of CD9-positive exosomes in patients with PTC much more often than in CRC. In patients with CRC, compared with patients with CP, among FABP4-positive EVs, the proportion of triple-positive EVs and EVs with the MMP9+MMP2-TIMP1+ phenotype significantly increases, which in general may indicate overexpression of MMP9 and TIMP1 by adipocytes or macrophages of adipose tissue in patients with CRC. Correlation analysis revealed multiple correlations of individual phenotypes of CD9-positive EVs in patients with CRC with body mass index and serum high density lipoprotein cholesterol levels, while the phenotypes of FABP4-positive EVs were associated mainly with triglyceride levels.

Conclusions. The phenotypes of CD9-positive and FABP4-positive circulating EVs are promising as predictors for clarifying cancer risk in patients with colon polyps, as well as in terms of explaining the effectiveness of the treatment of CRC patients with obesity or metabolic syndrome.

Keywords: matrix metalloproteinases, heat shock proteins, adipose tissue, extracellular vesicles, FABP4, colorectal cancer

For citation: Yunusova N.V., Svarovsky D.A., Dandarova E.E. et al. Matrix metalloproteinases and heat shock proteins on extracellular vesicles in colorectal cancer patients: association with metabolic status. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(3):38–48. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-38-48

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным литературы, а также на основании проведенных нами ранее исследований [1, 2] у большинства пациентов с колоректальным раком (КРР) опухоль возникает на фоне метаболически здорового ожирения, или метаболического синдрома

(более чем в 60 % случаев), ключевым патогенетическим моментом которого является развивающаяся гиперинсулинемия. Метаболические изменения также характерны для больных с полипами толстой кишки (ПТК), которые в настоящее время рассматриваются как наиболее значимые предраковые заболевания.

Адиipoциты продуцируют матриксные металлопротеиназы (MMPs) MMP-2, MMP-9 и их ингибитор TIMP1. Полученные из жировой ткани MMPs играют значительную роль в адипогенезе, ангиогенезе и ремоделировании внеклеточного матрикса, что может ускорить метастатический каскад [3, 4].

Известно, что жировая ткань имеет сложный клеточный состав, и везикулы с разной функциональностью могут секретироваться как адипоцитами, так и стромальными клетками. Среди резидентных в жировой ткани иммунных клеток макрофаги являются наиболее распространенным типом клеток: они составляют почти 50 % от общего числа клеток жировой ткани [5]. Предлагаемые кандидаты-маркеры везикул адипоцитарного происхождения (рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (PPAR-γ), белок, связывающий жирные кислоты 4 (FABP4), фактор 1 преадипоцитов (PREF-1)) не являются строго специфичными для клеток жировой ткани, могут секретироваться некоторыми иммунными клетками, в основном макрофагами, а также найдены в составе внеклеточных везикул (ВВ) эндотелиального происхождения [6–8]. Кроме того, в исследовании V. DeClercq и соавт. (2015) было показано, что адипонектин в экзосомах составляет лишь небольшую часть общего количества адипонектина, секретируемого клетками 3T3-L1, и поэтому не может быть надежным маркером ВВ плазмы [9]. FABP4 является маркером адипоцитов. Кроме того, ранее было показано, что этот белок гиперэкспрессирован в клеточных линиях дифференцированных адипоцитов мыши 3T3-L1, а также обнаружен в составе секретируемых в культуральную жидкость ВВ, что делает его наиболее привлекательным для изучения [10]. Мы не рассматриваем FABP4-позитивные ВВ как исключительно ВВ адипоцитарного происхождения. Однако детектируемые методом проточной цитометрии FABP4-позитивные циркулирующие ВВ могут быть представлены ВВ адипоцитарного и макрофагального происхождения, которые и формируют жировую ткань.

Показано, что фракции малых ВВ адипоцитарного происхождения специфически обогащены белками внеклеточного матрикса, включая MMPs, шаперонами, а также некоторыми метаболическими ферментами, участвующими в синтезе липидов и углеводов [11]. Это обусловило выбор экзосомальных маркеров в нашем исследовании. Мы также полагаем, что сравнение экспрессии протеинов на CD9- и FABP4-позитивных ВВ, возможно, будет полезно для объяснения некоторых клинических моментов, например эффективности терморadiотерапии или радиотерапии у больных KPP с ожирением, а также для более обоснованного поиска везикулярных прогностических маркеров у онкологических больных с ожирением. Цель работы была сформулирована с учетом отсутствия в литературе данных об уровне экспрессии MMPs и белков теплового шока (HSPs) в составе тотального пула ВВ и циркулирующих

ВВ, имеющих происхождение из жировой ткани, у пациентов с полипами толстой кишки (ПТК) и KPP.

Цель работы — изучение уровня MMPs и белков теплового шока (HSPs) на CD9- и FABP4-позитивных ВВ плазмы крови у пациентов с ПТК и KPP во взаимосвязи с метаболическим статусом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 12 больных KPP (T2–4N0–2M0; средний возраст $59,6 \pm 1,6$ года), проходивших лечение в отделении абдоминальной онкологии Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук с 2019 по 2021 г. В группу сравнения вошли 10 пациентов, обследованных в условиях поликлинического отделения Института, у которых в ходе видеокколоноскопии была исключена злокачественная опухоль толстой кишки. У этих больных выявлены аденоматозные ПТК. Критериями включения пациентов в исследование являлись согласие на участие в нем и колоректальный рак T2–4N0–2M0. Критериями исключения при формировании группы KPP были первично-множественные формы KPP и KPP Ia стадии (T1N0M0).

В подгруппы метаболических нарушений были включены пациенты с ПТК и KPP, имеющие метаболический синдром, или так называемое метаболически здоровое ожирение, в соответствии с критериями Международной диабетической федерации (International Diabetes Federation, IDF; 2005), под которым подразумевается наличие абдоминального ожирения (по критериям IDF), индекс массы тела (ИМТ) ≥ 30 в сочетании с одним из дополнительных критериев метаболического синдрома или изолированное ожирение [1, 2].

Измерение антропометрических параметров и метаболических маркеров плазмы крови. Измеряли окружность талии (посередине между нижним ребром и гребнем подвздошной кости) и бедер (в точке максимальной окружности ягодиц). Индекс массы тела рассчитывали по формуле:

$$\text{ИМТ} = \frac{\text{масса тела (кг)}}{\text{рост (м)}^2}.$$

Исследование уровней общего холестерина (ХС), ХС липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), ХС липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) и триглицеридов проводили на многоканальном биохимическом анализаторе Konelab-20 (Финляндия) после 16-часового голодания с использованием реактивов фирм Human (Германия) и ThermoScientific (Финляндия).

Выделение внеклеточных везикул из плазмы крови. Внеклеточные везикулы были выделены из плазмы крови методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием. Венозную кровь (около 27 мл) от пациентов с ПТК и KPP собирали в пробирки с K3-ЭДТА (BD Vacutainer Plus Tubes, Becton Dickinson,

Великобритания). Ультрацентрифугирование выполняли на ультрацентрифуге Optima XPN 80 (Beckman Coulter, США). Выделенные ВВ ресуспендировали в 600 мкл фосфатно-солевого буфера. Аликвоты ВВ замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C [12, 13].

Типирование внеклеточных везикул плазмы крови.

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных везикул проводили электронную микроскопию, а также определяли уровень тетраспанинов CD9, CD63 и CD81. Трансмиссионная электронная микроскопия выполнена на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук. Для проточной цитометрии 10 мкл (3×10^5) альдегид-сульфатных латексных частиц диаметром 4 мкм (4 %, A37304, Invitrogen, США) отмывали дважды по 100 мкл 0,1 М MES-буфером pH 5,5 (3000g, 15 мин) и ресуспендировали в 25 мкл MES-буфера. Затем к 12,5 мкл частиц вносили по 3 мкг моноклональных антител против CD9 (ab134375, Abcam, Великобритания) при комнатной температуре в течение 14 ч при осторожном перемешивании. Аликвоты ВВ (около 30 мкг белка) инкубировали с комплексами антитело — латексные частицы в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) при 4°C в течение 14 ч при осторожном перемешивании. Реакцию блокировали 0,2 М глицином в течение 30 мин при 4°C . Комплексы ВВ-антитело — латексные частицы инкубировали с FITC-конъюгированными антителами против тетраспанинов (CD63, CD81 и CD24) при 4°C в течение 30 мин. Цитометрия комплексов выполнена на цитометре Cytoflex (Beckman Coulter, США). Данные анализировали с помощью программы CytExpert 2.0 Software. Медиана интенсивности флуоресценции (MFI) комплексов была проанализирована в сравнении с изотипическим контролем и отрицательными контролями.

Количественная оценка белка. Для оценки концентрации белка во ВВ использовали набор количественного определения NanoOrange Protein (Molecular Probes, CIP) в соответствии с рекомендациями производителя.

Анализ сочетания экспрессии HSP60, HSP27 и HSP90 на поверхности CD9-позитивных внеклеточных везикул. Аликвоты ВВ (около 30 мкг белка) инкубировали с 3×10^5 анти-CD9-латексными частицами в 150 мкл PBS при 4°C в течение ночи при осторожном перемешивании и блокировали в 0,2 М глицине в течение 30 мин. Затем, после отмывки комплексов PBS, для блокирования неспецифического связывания использовали human BD Fc Block (564219, BD, США), далее их окрашивали комплексом антител (анти-HSP60-PE (2 мкл на тест, FAA822Hu41, Cloud-Clone Corp., Китай), анти-HSP27-FITC (2 мкл на тест, FAA693Hu81, Cloud-Clone Corp., Китай) и анти-HSP90-APCF (2 мкл на тест, FAA863Hu51, Cloud-Clone Corp., Китай)) в течение 20 мин при комнатной температуре. Отдельные комплексы были гейтированы и исследованы на цитометре Cytoflex (Beckman Coulter, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения CytExpert 2.0.

Анализ сочетания экспрессии MMP9, MMP2 и TIMP-1 на поверхности CD9-позитивных ВВ. Анализ выполняли аналогично методике, представленной выше. Использовали антитела анти-TIMP1-APC (2 мкл на тест, FAA522Hu51, Cloud-Clone Corp., Китай), анти-MMP2-PE (2 мкл на тест, FAA100Hu41, Cloud-Clone Corp., Китай) и анти-MMP9-FITC (2 мкл на тест, FAA553Hu81, Cloud-Clone Corp., Китай).

Анализ сочетания экспрессии HSP60, HSP27, HSP90, MMP9, MMP2 и TIMP-1 на поверхности FABP4-позитивных экзосом. Анализ выполняли аналогично представленной выше методике. Использовали моноклональные антитела против FABP4 (ab134375, Abcam, Великобритания).

Статистическая обработка результатов. Данные были обработаны с помощью пакета программ Statistica 10.0. Для оценки различий между группами использовали критерий Манна–Уитни. Для выявления корреляционных связей рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экзосомальная природа выделенных везикул была подтверждена трансмиссионной электронной микроскопией. В препаратах, выделенных из плазмы крови пациентов с ПТК и КРР, малые ВВ (экзосомы) визуализировались как четко структурированные частицы чашеобразной формы низкой электронной плотности с сохранной мембраной. Кроме того, в препаратах присутствовали частицы, не соответствующие ВВ по морфологии («не-везикулы»), их размер не превышал 100 нм (рис. 1). Выделенные ВВ больных ПТК и КРР, как было показано и для других локализаций рака, экспрессировали типичные экзосомальные маркеры (CD9, CD81, CD63) (рис. 2) [12, 13]. Общая стратегия гейтирования, а также состав MMPs и HSPs на поверхности CD9-позитивных экзосом у пациентов с ПТК и КРР представлены на рис. 3 и в табл. 1. В таблице приведены только статистически значимые связи (с уровнем значимости $p < 0,05$).

Представленные результаты согласуются с полученными нами ранее данными о преимущественной экспрессии MMP9 на поверхности CD9-позитивных ВВ по сравнению с MMP2 и TIMP1, причем MMP9-позитивные экзосомы чаще обнаруживались у больных КРР [14]. Трипл-позитивные по данным маркерам ВВ достоверно выявлялись у больных ПТК. Из изученных HSPs на поверхности ВВ наиболее часто экспрессировался HSP60, при этом HSP60-позитивные ВВ наблюдались при ПТК гораздо чаще, чем при КРР. Однако циркулирующие ВВ, экспрессирующие как HSP60, так и HSP27, встречались в 4 раза чаще при КРР (см. рис. 3 а–д). Состав матриксных MMPs и HSPs на поверхности FABP4-позитивных экзосом у больных ПТК и КРР с метаболическими нарушениями представлен в табл. 2.

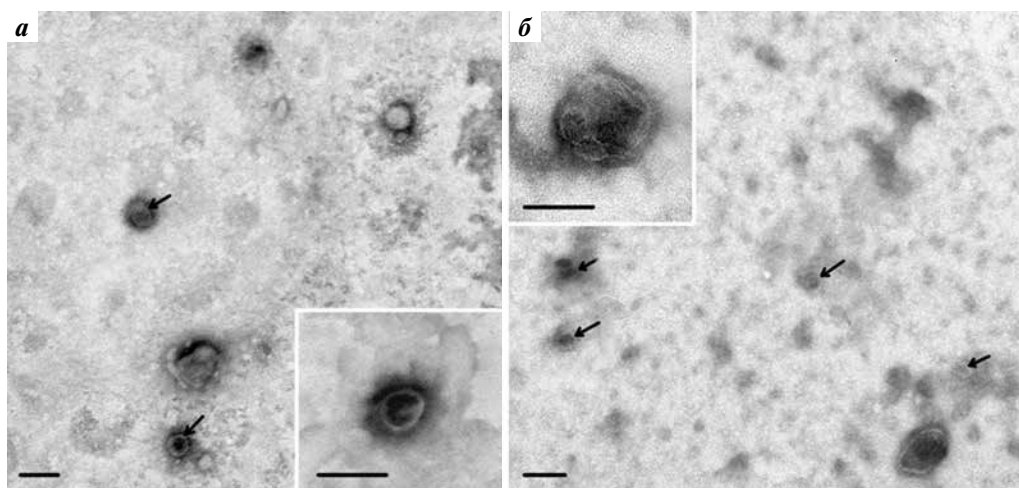


Рис. 1. Внеклеточные везикулы, выделенные из плазмы: а — пациентов с полипами толстой кишки; б — пациентов с колоректальным раком. Стрелками обозначены везикулы, по морфологии соответствующие экзосомам. Длина масштабной линии соответствует 200 нм, на врезках — 100 нм. Электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой

Fig. 1. Plasma extracellular vesicles isolated from: а — of patients with colon polyps; б — patients with colorectal cancer. Arrows indicate the vesicles that have the morphology of exosomes. The length of the scale line equals 200 nm; in the insets, 100 nm. Electron microscopy; negative staining with phosphotungstic acid

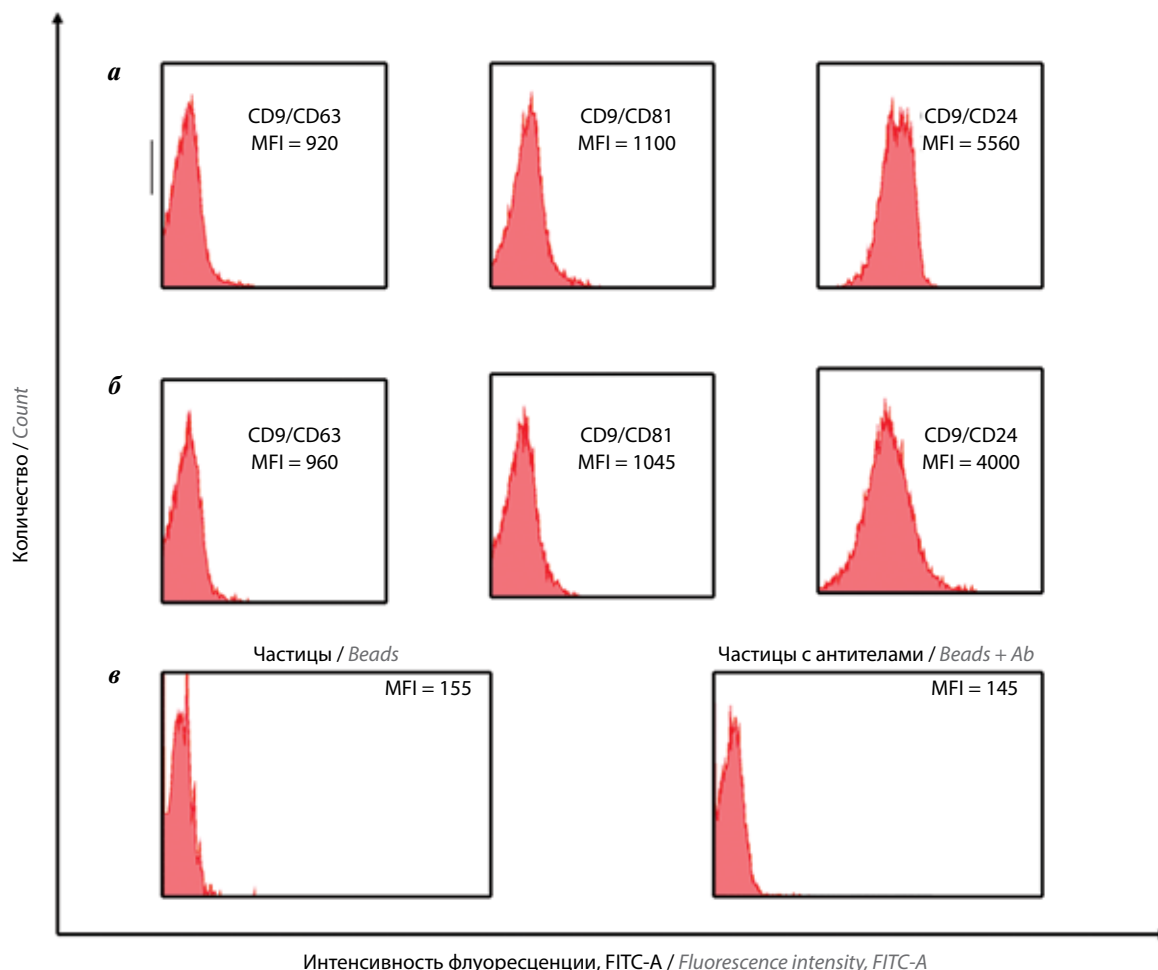


Рис. 2. Экспрессия CD63, CD81 и CD24 на CD9-позитивных внеклеточных везикулах плазмы крови пациентов с полипами толстой кишки (а) и колоректальным раком (б). Изотипический и отрицательный контроль (латексные частицы с FITC-меченными антителами против CD9 и CD81) (в). Приведены средние значения медианы интенсивности флуоресценции (MFI)

Fig. 2. Expression of CD63, CD81, and CD24 on CD9-positive plasma extracellular vesicles of patients with colon polyps (а) and colorectal cancer (б). Isotype and negative control (latex beads with FITC-labeled anti-CD9 and anti-CD81 antibodies) (в). Mean fluorescence intensity (MFI) is shown

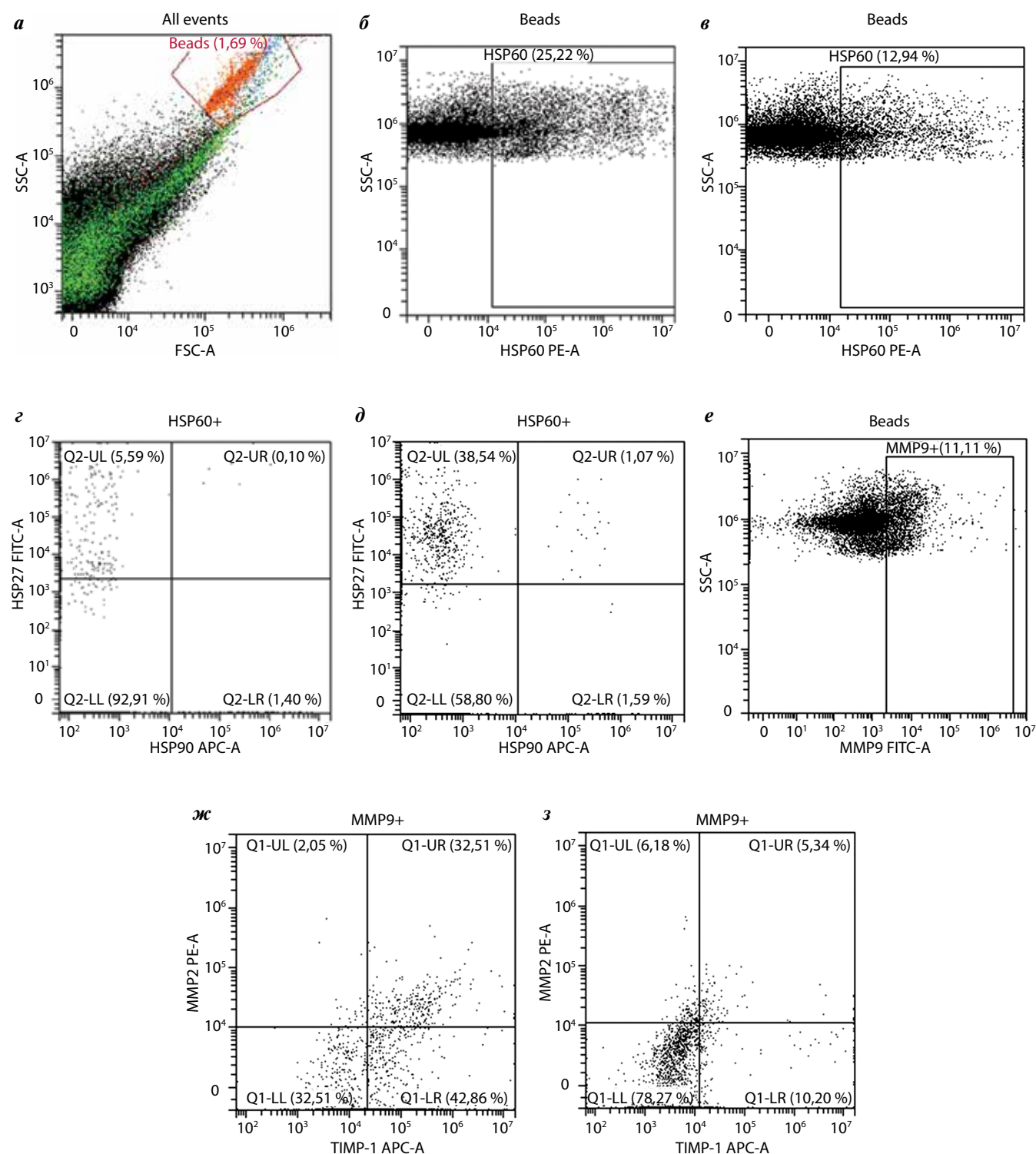


Рис. 3. Проточная цитометрия внеклеточных везикул (ВВ) плазмы крови: а — прямое (FSC-A) и боковое светорассеяние (SSC-A) комплексов ВВ с альдегид-сульфатными латексными частицами; б — HSP60-позитивные ВВ в составе CD9-позитивных ВВ у пациентов с полипами толстой кишки (ПТК); в — HSP60-позитивные ВВ в составе CD9-позитивных ВВ у пациентов с колоректальным раком (КРР). Тройное мечение антителами против HSP60, HSP27, HSP90 ВВ плазмы крови больных ПТК (г) и КРР (д); е — MMP9-позитивные ВВ в составе FABP4-позитивных ВВ у больных КРР. Тройное мечение антителами против MMP9, MMP2, TIMP1 ВВ плазмы крови больных КРР (ж) и ПТК (з)

Fig. 3. Flow cytometry of plasma extracellular vesicles (EVs): а — forward (FSC-A) and side scatter (SSC-A) of EV complexes with aldehyde/sulfate latex beads; б — HSP60-positive EVs among CD9-positive EVs from patients with colon polyps (CPs); в — HSP60-positive EVs among CD9-positive EVs from patients with colorectal cancer (CRC). Triple labeling with anti-HSP60, -HSP27, and -HSP90 antibodies of serum EVs from CP patients (г) and CRC patients (д); е — MMP9-positive EVs among FABP4-positive EVs from CRC patients. Triple labeling with anti-MMP9, -MMP2, and -TIMP1 antibodies of serum EVs from CRC patients (ж) and CP patients (з)

Таблица 1. Состав матричных металлопротеиназ и белков теплового шока на поверхности CD9-позитивных внеклеточных везикул (BB) плазмы крови у пациентов с полипами толстой кишки (ПТК) и колоректальным раком (КРР), %

Table 1. Composition of matrix metalloproteinases and heat shock proteins on the surface of CD9-positive plasma extracellular vesicles (EVs) in patients with colon polyps (CPs) and colorectal cancer (CRC), %

Фенотип BB Phenotype of EVs	ПТК (n = 10) CPs (n = 10)	КРР (n = 12) CRC (n = 12)	p
HSP60+	19,4 ± 1,86	11,10 ± 1,21	<0,05
HSP60+HSP27+HSP90–	6,30 ± 3,26	26,5 ± 3,01	<0,05
HSP60+HSP27–HSP90–	91,7 ± 3,52	73,0 ± 2,91	<0,05
HSP60+HSP27–HSP90+	1,35 ± 0,55	1,49 ± 0,25	–
MMP9+	6,45 ± 1,82	11,00 ± 1,02	<0,05
MMP9+MMP2+TIMP1+	8,70 ± 1,02	5,80 ± 0,93	<0,05
MMP9+MMP2+TIMP1–	11,00 ± 0,92	9,70 ± 1,37	–
MMP9+MMP2–TIMP1–	71,75 ± 10,20	75,25 ± 4,50	–
MM9+MMP2–TIMP1+	11,45 ± 3,71	10,40 ± 2,85	–

Таблица 2. Состав матричных металлопротеиназ и белков теплового шока на поверхности FABP4-позитивных внеклеточных везикул (BB) плазмы крови у пациентов с полипами толстой кишки (ПТК) и колоректальным раком (КРР) с метаболическими нарушениями, %

Table 2. Composition of matrix metalloproteinases and heat shock proteins on the surface of FABP4-positive plasma extracellular vesicles (EVs) in patients with colon polyps (CPs) and colorectal cancer (CRC) with metabolic disorders, %

Фенотип BB Phenotype of EVs	ПТК (n = 6) CPs (n = 6)	КРР (n = 8) CRC (n = 8)	p
HSP60+	18,90 ± 3,10	19,56 ± 2,21	–
HSP60+HSP27+HSP90–	24,10 ± 3,90	23,73 ± 3,22	–
HSP60+HSP27–HSP90–	74,75 ± 5,55	75,03 ± 5,35	–
HSP60+HSP27–HSP90+	0,95 ± 0,35	1,05 ± 0,24	–
MMP9+	8,33 ± 1,15	11,2 ± 2,00	–
MMP9+MMP2+TIMP1+	3,33 ± 1,71	10,85 ± 2,40	<0,05
MMP9+MMP2+TIMP1–	10,63 ± 2,53	10,38 ± 1,77	–
MMP9+MMP2–TIMP1–	82,33 ± 5,83	61,34 ± 6,38	<0,05
MMP9+MMP2–TIMP1+	3,73 ± 0,65	17,36 ± 3,10	<0,05

При анализе экспрессии MMPs, TIMP1 и HSPs на поверхности BB адипоцитарного происхождения статистически значимых различий в отношении HSPs между группами выявлено не было. Доля FABP4-позитивных BB, экспрессирующих MMP9, MMP2 и их ингибитор TIMP1, была значительно выше у больных КРР ($p < 0,05$). Аналогично BB адипоцитарного происхождения, экспрессирующие MMP9 и TIMP1, но не экспрессирующие MMP2, чаще выявлялись у больных КРР. Полученные

результаты свидетельствуют, что экспрессия HSP90 как на CD9-позитивных, так и на FABP4-позитивных BB плазмы крови больных КРР и ПТК встречается редко (см. рис. 3а, 3е–з).

Корреляционные связи (коэффициенты ранговой корреляции Спирмена) между фенотипами CD9-позитивных BB и возрастом, ИМТ, окружностью талии, уровнем триглицеридов, ХС, ХС ЛПВП у больных КРР представлены в табл. 3, а между фенотипами

FABP4-позитивных ВВ и возрастом, ИМТ, обхватом талии, уровнем триглицеридов, ХС, ХС ЛПВП у больных КРР — в табл. 4. Проведенный корреляционный анализ не выявил статистически значимых взаимосвязей в группе ПТК как для CD9-, так и для FABP4-позитивных экзосом.

Проведенный корреляционный анализ выявил множественные связи фенотипов CD9-позитивных ВВ у больных КРР с ИМТ и уровнем ХС ЛПВП сыворотки крови, в то время как фенотипы FABP4-позитивных ВВ были ассоциированы в основном с уровнем триглицеридов (рис. 4).

Таблица 3. Корреляционные связи между фенотипами CD9-позитивных внеклеточных везикул (ВВ) и возрастом, индексом массы тела, окружностью талии, уровнем триглицеридов, общим холестерином (ХС), ХС липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) у больных колоректальным раком

Table 3. Correlation between the phenotypes of CD9-positive extracellular vesicles (EVs) and colorectal cancer patients' age, body mass index, waist circumference, levels of triglycerides, total cholesterol (CL), and high-density lipoprotein CL (HDL CL)

Фенотип ВВ Phenotype of EVs	Возраст Age	Индекс массы тела Body mass index	Окружность талии Waist circumference	Уровень триглицеридов Level of triglycerides	Уровень ХС CL level	Уровень ХС ЛПВП HDL CL level
60+	—	—	—	—	—	—
60+27+90—	—	—	—	—	—	0,61
60+27—90—	—	—	—	—	—	—0,61
60+27—90+	—	—0,61	—	—	—	—0,68
9+	—	0,53	0,60	—	—	—
9+2+TIMP+	—	—	—	—	—	—
9+2+TIMP—	0,57	—	—	—	—	—
9+2—TIMP—	—	—	—	—	—	—
9+2—TIMP+	—	0,56	—	—	—	0,62

Примечание. Представлены только значимые коэффициенты корреляции с уровнем значимости $p < 0,05$.

Note. Only significant correlation coefficients with $p < 0.05$ are shown.

Таблица 4. Корреляционные связи между фенотипами FABP4-позитивных внеклеточных везикул (ВВ) и возрастом, индексом массы тела, окружностью талии, уровнем триглицеридов, общим холестерином (ХС), ХС липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) у больных колоректальным раком

Table 4. Correlation between the phenotypes of FABP4-positive extracellular vesicles (EVs) and colorectal cancer patients' age, body mass index, waist circumference, levels of triglycerides, total cholesterol (CL), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL CL)

Фенотип ВВ Phenotype of EVs	Возраст Age	Индекс массы тела Body mass index	Окружность талии Waist circumference	Уровень триглицеридов Level of triglycerides	Уровень ХС CL level	Уровень ХС ЛПВП HDL CL level
60+	—	—	—	—	—	—0,59
60+27+90—	—	—	—	—	—	—
60+27—90—	—	—	0,53	0,54	—	—
60+27—90+	—	—0,68	—0,79	—	—	—
9+	—	—	—	—	—0,74	—
9+2+TIMP+	—	—	—	0,67	—	—
9+2+TIMP—	—	—	—	—	—	—
9+2—TIMP—	—	—	—	—	—	—
9+2—TIMP+	—	—	—	0,52	—	—

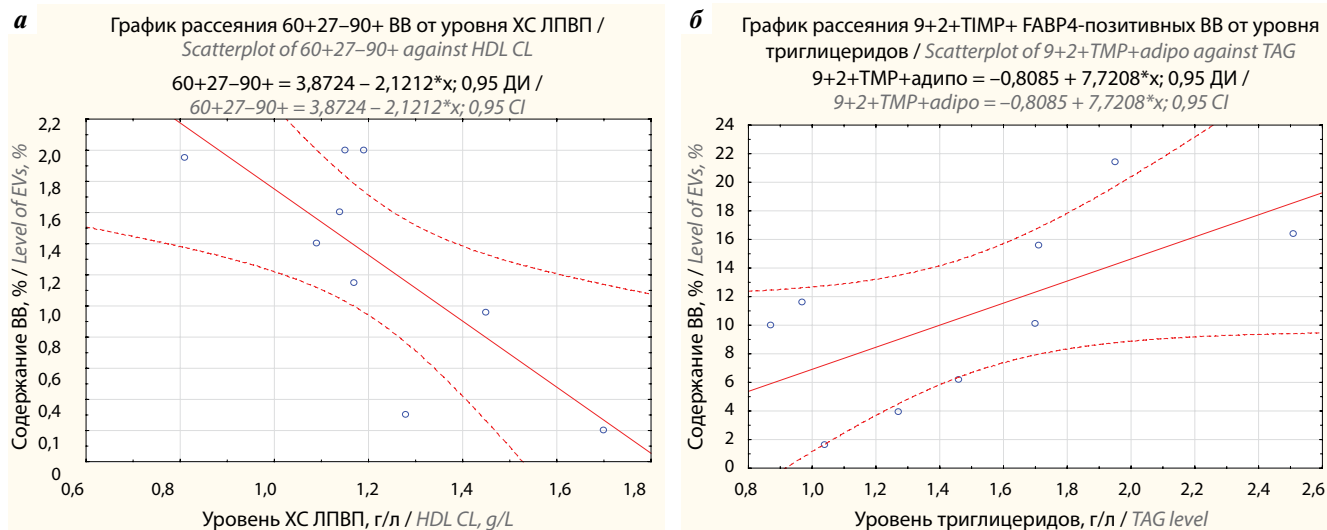


Рис. 4. Графики рассеяния. Зависимость содержания CD9-позитивных внеклеточных везикул (BB) с фенотипом HSP60+HSP27–HSP90+ от уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) в сыворотке крови (а), FABP4-позитивных BB с фенотипом MMP9+MMP2+TIMP1+ от уровня триглицеридов в сыворотке крови (б) у больных колоректальным раком. Сплошная линия – линия тренда, пунктирная линия – 95 % доверительный интервал (ДИ)

Fig. 4. Scatter plots. Correlation between the level of CD9-positive extracellular vesicles (EVs) with the HSP60+HSP27–HSP90+ phenotype and serum level of high-density lipoprotein cholesterol (HDL CL) (a); correlation between the level of FABP4-positive EVs with the MMP9+MMP2+TIMP1+ phenotype and serum level of triglycerides (TAG) (b). Solid line – trend line; dotted line – 95% confidence interval (CI)

ОБСУЖДЕНИЕ

Мембрана экзосом наряду с тетраспанинами и интегринами содержит комплекс протеаз (ADAM-протеазы, MMPs). Секретируемые (MMP1, MMP13, MMP2, MMP9, MMP3, MMP10, MMP7) и мембрано-связанные (MMP14, MMP24, MMP25) MMPs выявлены в экзосомах. Наиболее изучены желатиназы MMP2 и MMP9. В составе BB выявлены ингибиторы MMPs: TIMP1, TIMP2, TIMP3 [15–19]. Полагают, что перенос BB MMP2, MMP3 и MMP9 увеличивает их содержание в отдаленных от первичной опухоли участках, в частности в лимфатических узлах и ткани легкого, однако роль конкретно везикулярных металлопротеиназ и их ингибиторов в формировании и прогрессировании злокачественных опухолей изучена недостаточно.

Белки теплового шока, находящиеся внутри клеток, являются молекулярными шаперонами, необходимыми для фолдинга белков и поддержания определенного баланса между синтезом и протеолизом белков, а также мощными антиапоптотическими агентами [20–22]. Для большинства солидных опухолей высокий уровень свободных HSPs в сыворотке крови ассоциирован с неблагоприятным прогнозом [21]. Внеклеточные везикулы несут HSPs, причем как на своей поверхности, так и внутри. Показано, что HSPs на поверхности клеток и BB могут распознаваться CD91+ опухолевыми клетками, CD91+ фибробластами, CD91+SREC1+TLR+ антигенпрезентирующими клетками и CD94+ цитолитическими иммунными клетками. Обсуждается иммуностимулирующая и иммуносупрессивная роль экстраклеточных HSPs [21, 22]. В работе С.С. Bavisotto и соавт. (2019) показано, что

профиль HSPs в ткани папиллярного рака щитовидной железы и соответствующих циркулирующих экзосомах идентичен, преобладают HSP27 и HSP60, в то время как HSP90 и HSP70 слабо экспрессированы [23]. Хотя в данной работе для определения уровня HSPs в экзосомах был использован Вестерн-блоттинг, а в нашей работе – проточная цитометрия, мы получили принципиально сходные данные о распределении HSPs в малых BB пациентов с предопухолевыми заболеваниями и КРР, свидетельствующие о преобладании на поверхности как CD9-позитивных BB, так и FABP4-позитивных BB HSP60 и HSP27.

FABP4 является популярным и часто используемым маркером BB адипоцитарного происхождения, имеющим определенные преимущества перед другими кандидатными маркерами (адипонектином, PPAR-γ), такие как высокая концентрация маркера на поверхности BB, известный механизм секреции маркера в составе BB [10, 24]. О том, что FABP4 локализован на поверхности BB плазмы крови человека и может быть с успехом использован для визуализации BB адипоцитарного происхождения и BB макрофагов жировой ткани методом проточной цитометрии, свидетельствует исследование С.М. Gustafson и соавт. [25]. Полученные нами результаты показали, что уровни поверхностных MMPs и TIMP1 значительно различаются на CD9- и FABP4-позитивных BB: на FABP4-позитивных BB у больных КРР по сравнению с пациентами с ПТК существенно увеличивается доля трипл-позитивных BB и везикул с фенотипом MMP9+MMP2–TIMP1+. В целом это может свидетельствовать о гиперэкспрессии MMP9 и TIMP1 адипоцитами или макрофагами

жировой ткани у пациентов с КРР. Фенотипы CD9-позитивных и FABP4-позитивных циркулирующих ВВ перспективны в качестве предикторов для уточнения онкологического риска у больных с полипами толстой кишки, а также в плане объяснения эффективности лечения больных КРР с ожирением или метаболическим синдромом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ММР9-позитивные ВВ чаще обнаруживались у больных КРР по сравнению с больными ПТК, однако ММР9+ММР2+ТИМР-позитивные ВВ достоверно чаще выявлялись у пациентов с ПТК. Из изученных HSPs на поверхности ВВ наиболее часто экспрессировался

HSP60, причем HSP60-позитивные ВВ при ПТК выявлялись на поверхности CD9-позитивных экзосом гораздо чаще, чем при КРР. У больных КРР по сравнению с больными ПТК на FABP4-позитивных ВВ существенно увеличивается доля трипл-позитивных ВВ и ВВ с фенотипом ММР9+ММР2–ТИМР1+, что в целом может свидетельствовать о гиперэкспрессии ММР9 и ТИМР1 адипоцитами или макрофагами жировой ткани у пациентов с КРР. Проведенный корреляционный анализ выявил множественные связи отдельных фенотипов CD9-позитивных ВВ у больных КРР с ИМТ и уровнем ХС ЛПВП сыворотки крови, в то время как фенотипы FABP4-позитивных ВВ были ассоциированы в основном с уровнем триглицеридов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A. et al. The role of metabolic syndrome variant in the malignant tumors progression. *Diabetes Metab Syndr* 2018;12(5):807–12. DOI: 10.1016/j.dsx.2018.04.028
2. Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A. et al. Molecular targets for the therapy of cancer associated with metabolic syndrome (transcription and growth factors). *Asia Pac J Clin Oncol* 2018;14(3):134–40. DOI: 10.1111/ajco.12780
3. Wang J., Wu Y., Guo J. et al. Adipocyte-derived exosomes promote lung cancer metastasis by increasing MMP9 activity via transferring MMP3 to lung cancer cells. *Oncotarget* 2017;8(47):81880–91. DOI: 10.18632/oncotarget.18737
4. Bouloumié A., Sengenès C., Portolan G. et al. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes* 2001;50(9):2080–6. DOI: 10.2337/diabetes.50.9.2080
5. Weisberg S.P., McCann D., Desai M. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112(12):1796–808. DOI: 10.1172/JCI19246
6. Gao X., Salomon C., Freeman D.J. et al. Extracellular vesicles from adipose tissue — a potential role in obesity and type 2 diabetes? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;8:202. DOI: 10.3389/fendo.2017.00202
7. Furuhashi M. Fatty Acid-binding protein 4 in cardiovascular and metabolic diseases. *J Atheroscler Thromb* 2019;26(3):216–32. DOI: 10.5551/jat.48710
8. Eguchi A., Lazic M., Armando A.M. et al. Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress. *J Mol Med (Berl)* 2016;94(11):1241–53. DOI: 10.1007/s00109-016-1446-8
9. DeClercq V., d'Eon B., McLeod R.S. Fatty acids increase adiponectin secretion through both classical and exosome pathways. *Biochim Biophys Acta* 2015;1851(9):1123–33. DOI: 10.1016/j.bbailip.2015.04.005
10. Kralisch S., Ebert T., Lossner U. et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism. *Int J Obes (Lond)* 2014;38(9):1251–4. DOI: 10.1038/ijo.2013.232
11. Durcin M., Fleury A., Taillebois E. et al. Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2017;6(1):1305677. DOI: 10.1080/20013078.2017.1305677
12. Тамкович С.Н., Юнусова Н.В., Стахеева М.Н. и др. Выделение и характеристика экзосом плазмы крови больных раком молочной железы и колоректальным раком. *Биомедицинская химия* 2017;63(2):165–9. DOI: 10.18097/PBMC20176302165
13. Тамкович С.Н., Юнусова Н.В., Сомов А.К. и др. Сравнительный субпопуляционный анализ экзосом плазмы крови больных злокачественными новообразованиями. *Биомедицинская химия* 2018;64(1):110–4. DOI: 10.18097/PBMC20186401110
14. Tamkovich S.N., Yunusova N.V., Somov A.K. et al. Comparative sub-population analysis of exosomes from blood plasma of cancer patients. *Biomedicinskaya Khimiya = Biomedical Chemistry* 2018;64(1):110–4. (In Russ.). DOI: 10.18097/PBMC20186401110
15. Yunusova N.V., Zambalova E.A., Patysheva M.R. et al. Exosomal protease cargo as prognostic biomarker in colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2021;22(3):861–9. DOI: 10.31557/APJCP.2021.22.3.861
16. Matthews A.L., Noy P.J., Reyat J.C. Regulation of A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17: the emerging role of tetraspanins and rhomboids. *Platelets* 2017;28(4):333–41. DOI: 10.1080/09537104.2016.1184751
17. Gutwein P., Stoeck A., Riedle S. Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2005;11(7):2492–501. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1688
18. Buzás E.I., Tót E.A., Sódar B.V. Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles. *Semin Immunopathol* 2018;40(5):453–64. DOI: 10.1007/s00281-018-0682-0
19. Shimoda M., Khokha R. Metalloproteinases in extracellular vesicles. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017;1864(11 Pt. A):1989–2000. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.027
20. Ginestra A., Monea S., Seghezzi G. Urokinase plasminogen activator and gelatinases are associated with membrane vesicles shed by human HT1080 fibrosarcoma cells. *J Biol Chem* 1997;272(27):17216–22. DOI: 10.1074/jbc.272.27.17216
21. Kaur P., Hurwitz M.D., Krishnan S. et al. Combined hyperthermia and radiotherapy for the treatment of cancer. *Cancers (Basel)* 2011;3(4):3799–823. DOI: 10.3390/cancers3043799
22. Taha E.A., Ono K., Eguchi T. Roles of extracellular HSPs as biomarkers in immune surveillance and immune evasion. *Int J Mol Sci* 2019;20(18):4588. DOI: 10.3390/ijms20184588
23. Lv L.H., Wan Y.L., Lin Y. et al. Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular

carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses in vitro. *J Biol Chem* 2012;287(19):15874–85. DOI: 10.1074/jbc.M112.340588

23. Bavisotto C.C., Cipolla C., Graceffa G. et al. Immunophological pattern of molecular chaperones in normal and pathological thyroid tissues and circulating exosomes: potential use in clinics. *Int J Mol Sci* 2019;20(18):4496. DOI: 10.3390/ijms20184496
24. Hubal M.J., Nadler E.P., Ferrante S.C. et al. Circulating adipocyte-derived exosomal MicroRNAs associated with decreased insulin resistance after gastric bypass. *Obesity (Silver Spring)* 2017;25(1):102–10. DOI: 10.1002/oby.21709
25. Gustafson C.M., Shepherd A.J., Miller V.M., Jayachandran M. Age- and sex-specific differences in blood-borne microvesicles from apparently healthy humans. *Biol Sex Differ* 2015;6:10. DOI: 10.1186/s13293-015-0028-8

Вклад авторов

Н.В. Юнусова: идея, написание текста статьи, анализ и интерпретация результатов;
Д.А. Сваровский, Е.Э. Дандарова, А.И. Коновалов, М.Р. Патышева, А.Е. Григорьева: выполнение экспериментов, статистическая обработка данных;

Д.Н. Костромицкий, А.А. Димча, О.В. Черемисина, С.Г. Афанасьев, Ж.А. Старцева: анализ клинических данных;

Л.В. Спирина, И.В. Кондакова: научное консультирование и финансовая поддержка.

Authors' contribution

N.V. Yunusova: idea, article writing, analysis and interpretation of results;

D.A. Swarovsky, E.E. Dandarova, A.I. Konovalov, M.R. Patysheva, A.E. Grigor'eva: performing experiments, statistical data processing;

D.N. Kostromitsky, A.A. Dimcha, O.V. Cheremisina, S.G. Afanasiev, Z.A. Startseva: analysis of clinical data;

L.V. Spirina and I.V. Kondakova: scientific consulting and financial support.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.В. Юнусова / N.V. Yunusova: <https://orcid.org/0000-0003-4595-4177>

О.В. Черемисина / O.V. Cheremisina: <https://orcid.org/0000-0001-7234-4708>

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

С.Г. Афанасьев / S.G. Afanasiev: <https://orcid.org/0000-0002-4701-0375>

Ж.А. Старцева / Z.A. Startseva: <https://orcid.org/0000-0002-4345-7719>

И.В. Кондакова / I.V. Kondakova: <https://orcid.org/0000-0002-0947-8778>

А.Е. Григорьева / A.E. Grigor'eva: <https://orcid.org/0000-0001-9853-223X>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено в рамках гранта ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России «Молекулярные и биохимические механизмы развития инфекционных и неинфекционных соматических заболеваний на основе регуляции протеолиза и формирования метаболических нарушений».

При выполнении данного исследования использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» (ФГБНУ «Томский национальный медицинский исследовательский центр Российской академии наук»).

Funding. The study was conducted within the framework of the grant of the Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia “Molecular and biochemical mechanisms of the development of infectious and non-infectious somatic diseases based on the regulation of proteolysis and the formation of metabolic disorders”.

When performing this study, the equipment of the Center for Collective Use “Medical Genomics” (Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences) was used.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (протокол № 4 от 05.02.2019 г.).

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 of Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences.

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

Статья поступила: 09.03.2022. **Принята к публикации:** 19.06.2022.

Article submitted: 09.03.2022. **Accepted for publication:** 19.06.2022.

Вирус Эпштейна–Барр у адыгейцев и славян в России: типы вируса, варианты *LMP1* и злокачественные новообразования

К.В. Смирнова^{1,2}, Н.Б. Сенюта¹, А.К. Лубенская¹, И.В. Ботезату¹, Т.Е. Душенькина¹, А.В. Лихтенштейн¹, В.Э. Гурцевич¹

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

²ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

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

Введение. Известно, что структурные особенности вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) влияют на проявление его биологических свойств. На основе различий в последовательностях генов *EBNA2*, *EBNA3A*, *-B* и *-C* идентифицированы 2 типа вируса, 1-й (ВЭБ-1) и 2-й (ВЭБ-2), обладающие разной способностью трансформировать В-клетки *in vitro* и, возможно, играющие определенную роль в возникновении ВЭБ-ассоциированных новообразований.

Цель исследования – изучение распространенности ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у 2 этносов, адыгейцев и славян, а также вклад ассоциированных с ВЭБ случаев в общую заболеваемость злокачественными новообразованиями определенных органов и тканей.

Материалы и методы. Из 59 смывов полости рта этнических адыгейцев Республики Адыгея и 40 таковых этнических славян Москвы экстрагировали образцы ДНК. Эти образцы использовали для амплификации ДНК ВЭБ, определения концентрации копий вирусной ДНК на 1 клетку смыва, а также для амплификации *LMP1* ВЭБ с последующим секвенированием полученных образцов гена и выявления их белкового варианта (*LMP1*).

Результаты. Исследования показали, что у представителей адыгейцев преобладает ВЭБ-2, а у славян – ВЭБ-1. Изоляты ВЭБ у представителей 2 этносов также различались по структуре его *LMP1*: у славян выявлен целый набор его белковых вариантов (В95.8/А, China, Med– и NC), а у адыгейцев – единственный вариант – В95.8 и его подтип – В95.8/А. Доминирующий у представителей славян ВЭБ-1, обладающий способностью трансформировать В-клетки, проецировался на более высокую у населения Москвы, чем у населения Республики Адыгея, заболеваемость опухолями глотки, желудка, лимфомой Ходжкина и неходжкинскими лимфомами, в которых встречаются ВЭБ-ассоциированные случаи. Однако различия между показателями заболеваемости для указанных патологий (за исключением данных для желудка) были статистически недостоверными ($p > 0.5$). Более высокий и статистически достоверно отличающийся показатель заболеваемости раком желудка у жителей Москвы по сравнению с таковым у жителей Республики Адыгея, по нашему мнению, не обусловлен ВЭБ-1 и/или вариантами *LMP1*, а скорее связан с генетической предрасположенностью к этой опухоли населения Москвы.

Заключение. Факт обнаружения у 2 этносов России преобладания различных типов ВЭБ поднимает вопрос об их этногеографической ассоциации и роли в индукции ВЭБ-ассоциированных новообразований. Для решения этого вопроса необходимо проведение дополнительных исследований в других географических регионах России у представителей разных этносов.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, типы вируса Эпштейна–Барр, латентный мембранный белок 1, сиквенсный анализ, адыгейцы, славяне, полимеразная цепная реакция в реальном времени, онкозаболеваемость

Для цитирования: Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Лубенская А.К. и др. Вирус Эпштейна–Барр у адыгейцев и славян в России: типы вируса, варианты *LMP1* и злокачественные новообразования. Успехи молекулярной онкологии 2022; 9(3):49–59. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-49-59

Epstein–Barr virus in Adygeans and Slavs in Russia: virus types, *LMP1* variants, and malignant tumors

K.V. Smirnova^{1,2}, N.B. Senyuta¹, A.K. Lubenskaya¹, I.V. Botezatu¹, T.E. Dushenkina¹, A.V. Lichtenstein¹, V.E. Gurtsevich¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, of the N.N. Blokhin National Medical Russian Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

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

Introduction. It is known that the structural features of the Epstein–Barr virus (EBV) affect the manifestation of its biological properties. Based on differences in the sequences of the *EBNA2*, *EBNA3A*, *-B*, and *-C* genes, two types of the virus, EBV-1 and EBV-2, have been identified that have different ability to transform B cells *in vitro* and possibly playing certain role in the development of EBV-associated neoplasms.

Aim. To study the prevalence of EBV-1 and EBV-2 in two ethnic groups, Adygeans and Slavs, as well as the contribution of EBV-associated tumors to the overall incidence of malignant neoplasms certain organs and tissues.

Materials and methods. DNA samples were extracted from 59 oral lavages of ethnic Adygeans from Republic of Adygea and 40 such from oral cavity of ethnic Slavs of Moscow city. These samples were used for amplification of EBV DNA, determination of the concentration of viral DNA copies per 1 cell washout, as well as for amplification of EBV *LMP1* followed by sequencing of the resulting gene samples and determination of their protein variant (*LMP1*).

Results. Studies have shown that among the representatives of the Adygeans the 2nd EBV type prevails, and among the Slavs, the 1st one. Epstein–Barr virus isolates in representatives of the two ethnic groups also differed in the structure of *LMP1*. Among the Slavs, a set of its *LMP1* variants (B95.8/A, China, Med– and NC) was identified. However, among the Adygeans, the only variant – B95.8 and its subtype – B95.8/A was identified. EBV-1, which prevails among the representatives of the Slavs and has the ability to transform B-cells, was projected onto a higher incidence of tumors of the pharynx, stomach, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas (where EBV-associated cases can occur) in the population of Moscow than in the population of the Republic of Adygea. However, the differences between incidence rates for these neoplasms (with the exception for the stomach tumors) were not statistically significant ($p > 0.5$). A higher and statistically significantly different incidence rate of stomach cancer in residents of Moscow city, compared with that in residents of the Republic of Adygea, in our opinion, is not due to EBV-1 type and/or *LMP1* variants, but rather is associated with a genetic predisposition the population of Moscow city to this tumor.

Conclusion. The fact that two ethnic groups of Russia were found to be prevails by different types of EBV raises the question of their ethno-geographical association and their role in the induction of EBV-associated tumors. To resolve this issue additional studies in other geographical regions of Russia among representatives of different ethnic groups are required.

Keywords: Epstein–Barr virus, Epstein–Barr virus types, latent membrane protein 1, sequencing, Adygeans, Slavs, real-time polymerase chain reaction, cancer incidence

For citation: Smirnova K.V., Senyuta N.B., Lubenskaya A.K. et al. Epstein–Barr virus in Adygeans and Slavs in Russia: virus types, *LMP1* variants, and malignant tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(3):49–59. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-49-59

ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) среди населения планеты, как правило, не приводит к развитию каких-либо патологий у инфицированных лиц. В некоторых же случаях возникают опухоли. Для их формирования необходим ряд дополнительных факторов, благодаря которым трансформирующий потенциал вируса может быть включен в патологический процесс, приводящий к развитию опухоли. Для различных патологий, связанных с ВЭБ, эти факторы могут существенно различаться. Наиболее частыми из них являются неблагоприятные воздействия окружающей среды (канцерогенные, химические, радиационные и др.), снижение функциональной активности иммунной системы, а также генетическая предрасположенность к возникновению той или иной опухоли [1].

К числу злокачественных опухолей, ассоциированных с ВЭБ, относятся определенные морфогистологические случаи рака носоглотки и желудка, лимфомы Ходжкина (ЛХ) и неходжкинских лимфом (НХЛ), показатели заболеваемости для которых существенно различаются в разных популяциях и географических регионах. В частности, в России доля рака носоглотки в общей онкологической заболеваемости составляет 0,1–0,2 % (0,29 случая на 100 тыс. насе-

ния) [2]. Среди них плоскоклеточный некератинизирующий недифференцированный рак более чем в 97 % случаев ассоциирован с ВЭБ [3]. По результатам наших исследований из 206 образцов рака желудка, полученных от больных из российских клиник, в 18 (8,7 %) случаях была подтверждена ассоциация с ВЭБ [4]. Среди определенных по классификации Всемирной организации здравоохранения наиболее часто встречающихся лимфом, так называемых посттрансплантационных лимфопролиферативных заболеваний, в качестве ассоциированных с ВЭБ были зарегистрированы следующие нозологические формы:

- ранние (неразрушающие) поражения в виде плазмочитарной гиперплазии, инфекционного мононуклеозоподобного посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания и цветущей гиперплазии (практически 100 % случаев);
- полиморфные (деструктивные) поликлональная и моноклональная пролиферации (≥ 90 % случаев);
- полиморфные (деструктивные) моноклональные НХЛ, включая диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (~60 %), а также лимфому Беркитта, плазмочлеточную миелому и Т-клеточную лимфому, как ВЭБ+, так и ВЭБ– (ВЭБ– в 10–48 % случаев);

- ЛХ (деструктивная) моноклональная (>90 % случаев) [5].

Нельзя исключить, что различная частота возникновения опухолей у разных этносов в определенной степени связана с циркулирующими штаммами ВЭБ, обладающими неодинаковым онкогенным потенциалом.

Успехи молекулярной технологии позволили осуществлять полногеномное секвенирование образцов ВЭБ различного происхождения, чтобы охарактеризовать географическое разнообразие вируса и его связь с конкретным заболеванием. Проведенные исследования доказали, что в мире персистируют 2 типа ВЭБ: 1-й (ВЭБ-1, или А) и 2-й (ВЭБ-2, или В) типы [6]. К ВЭБ-1 относятся штаммы B95.8, GD1 и Akata. Он является основным типом ВЭБ, широко распространенным в мире, преимущественно в Европе, Азии, Северной и Южной Америке. К ВЭБ-2 относятся штаммы AG876 и P3HR-1. Этот тип чаще встречается на Аляске, в Папуа — Новой Гвинее и в странах Центральной Африки [7], например в Кении [8]. В регионах широкого распространения ВЭБ-2 также зарегистрированы случаи одновременного инфицирования 2 типами вируса [8].

Типы ВЭБ сначала были дифференцированы на основе различий аминокислотных последовательностей EBNA-2: ВЭБ-1 обладает более длинной, чем ВЭБ-2, рамкой считывания у белка EBNA-2 [7]. Дальнейший анализ геномов ВЭБ показал, что у 2 типов вируса большинство изменений локализуется не только в последовательностях EBNA-2, но и в последовательностях EBNA-3A, -B и -C. В частности, было показано, что у ВЭБ-1 EBNA-3C на 77 аминокислот меньше, чем у ВЭБ-2, и, таким образом, ВЭБ-1 и ВЭБ-2 могут быть идентифицированы на основе их различий в ORF EBNA-3C [6]. Фенотипическое же различие между типами вируса состоит в том, что ВЭБ-1 способен трансформировать В-лимфоциты *in vitro*, а ВЭБ-2 — нет [9]. Используя эту информацию, некоторые авторы пытались выяснить, не связаны ли определенные штаммы вируса с конкретными ВЭБ-ассоциированными заболеваниями. Поиски такой корреляции продолжаются, и уже показано, что ВЭБ-2 чаще обнаруживается у больных с ВЭБ-ассоциированными формами лимфом и здоровых лиц с выраженной иммуносупрессией [10].

Изучение изолятов ВЭБ различного географического и этнического происхождения позволило выявить существенные изменения в многочисленных локусах вирусного генома, влияющих на трансформирующий потенциал вируса. Этот потенциал прежде всего связан с полиморфизмом основного онкогена ВЭБ, латентного мембранного белка 1, *LMP1*, и кодируемого им белка, *LMP1*. При этом С-терминальная область *LMP1* для его функции считается принципиально важной. В ней выявлена делеция 30 пар оснований (п. о.), что соответствует делеции 10 аминокислот (346–355 а. к.),

а также делеция 69 п. о., повтор 33 п. о., делеция 5 а. к. и другие аминокислотные замены, влияющие на биологическую активность вируса [11].

На основе сиквенсного анализа С-концевой области *LMP1* были предложены несколько классификаций, объединяющих в отдельные группы его белковые варианты с наиболее характерными аминокислотными мутациями. В одну из широко представленных в литературе классификаций *LMP1* вошли варианты белка, обозначение которых (China 1 (Ch1), China 2 (Ch2), China 3 (Ch3), Mediterranean+ (Med+), Mediterranean– (Med–) и Northern Carolina (NC)) отражает их географическое происхождение [12]. Каждый представитель из 6 вариантов *LMP1* был детально охарактеризован по его способностям трансформировать клетки млекопитающих (Rat-1), вызывать активацию транскрипционного фактора NF-κB, а также связывать один из клеточных белков из семейства E3-убиквитин лигаз (HOS/β-TrCP) [13]. При этом варианты с незначительным полиморфизмом белка (3–4 а. к. замены) по отношению к *LMP1*-B95.8, например *LMP1*-B95.8/A, по классификации D.M. Walling и соавт. [14], относят к низко трансформирующим вариантам, а высокополиморфные, т.е. варианты с большим числом а. к. замен, делеций и вставок, — к высокотрансформирующим. Из всех вышеперечисленных вариантов *LMP1* наиболее изученным является *LMP1*-Cao/China1. Кроме указанной ранее характерной делеции 10 аминокислот (*LMP1*-del), этот белок дополнительно содержит 26 аминокислотных замен [15]. *LMP1*-Cao/China1 по сравнению с *LMP1*-B95.8 обладает более выраженным трансформирующим потенциалом *in vitro* [16], а также повышенной туморогенностью у бестимусных мышей, сниженной иммуногенностью и усиленной сигнальной активностью [17–19].

С учетом того, что последовательности С-терминального домена *LMP1* проявляют высокую степень гетерогенности по сравнению с другими генами ВЭБ, исследования, основанные на прямом секвенировании этого домена, позволили обнаружить в изучаемых типах биологического материала (кровь, слюна и опухолевая ткань) больных и здоровых лиц из разных географических регионов несовпадающие варианты *LMP1*. Так, новые варианты *LMP1*, являющиеся рекомбинантами вариантов Raji и China, выявлены в Аргентине [20]. Три варианта *LMP1* (CG-1-3), отличающиеся от европейских и африканских вариантов, были идентифицированы у китайских больных ЛХ. При этом как у пациентов с ВЭБ-ассоциированными случаями ЛХ, так и у здоровых лиц преобладали варианты *LMP1*-CG-1, содержащие делецию 30 п. н. [21]. Два новых варианта *LMP1*, обозначенные как Юго-Восточная Азия 1 (SEA 1) и Юго-Восточная Азия 2 (SEA 2), были выявлены в Южном Таиланде [22].

Анализ изолятов ВЭБ от этнических татар, выполненный нами в ранее проведенных исследованиях, позволил обнаружить кроме 3 известных белковых

вариантов LMP1 (95.8/A, Med— и Cao/China1) моногруппу LMP1, обозначенную как Tat^K (LMP1-Tat^K) и характеризующуюся сочетанным содержанием 2 делеций 5 а. к. в кодонах 312–316 и 382–386 [23]. Образцы LMP1-Tat^K отличались по своей генетической структуре не только от образцов LMP1 славян, жителей европейской части России, но и от других образцов LMP1 казанских татар, не обладающих «глубокой» татарской родословной. При этом можно было предположить, что ген, кодирующий LMP1-Tat^K, принадлежит к древнему штамму ВЭБ монголо-татарских племен, сформировавших в XIII в. Казанское ханство в Поволжье. Однако, по нашему предположению, этот вирусный штамм привязан либо к этническим татарам, либо географически к территории Поволжья и может быть обнаружен у других этносов этого региона. Дальнейшие исследования с использованием увеличенного числа образцов LMP1 татар, а также представителей других этносов Поволжья, вероятно, позволят выяснить вопрос о происхождении штамма ВЭБ с вариантом LMP1-Tat^K.

В последние годы растет интерес к исследованиям, направленным на выяснение существования штаммов ВЭБ, специфически связанных с конкретным этносом, географическим регионом или определенным заболеванием. Настоящее исследование находится в русле этих поисков. Как известно, Россия — многонациональное многоконфессиональное государство, расположенное в различных географических и климатических зонах. Населяющие страну многочисленные этносы различаются генетически, вероисповеданием, воздействием окружающей среды, укладом быта, кулинарными предпочтениями и т. д. Нельзя исключить, что штаммы ВЭБ, циркулирующие у разных этносов в одном и том же географическом регионе, могут вести себя по-разному в плане проявления своих инфицирующих и/или трансформирующих свойств. Взаимодействие циркулирующих штаммов вируса с различающимися главными комплексами гистосовместимости (МНС) разных этносов может отразиться на уровнях инфицированности этих этносов и/или заболеваемости ВЭБ-ассоциированными патологиями.

Изучение распространенности ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у представителей древних адыгейцев и славян, а также уровней заболеваемости у 2 этносов злокачественными новообразованиями, в состав которых входят случаи, ассоциированные с этим вирусом, является **целью** настоящего **исследования**. Сиквенсный анализ онкогена *LMP1* позволит также вести поиски уникальных штаммов ВЭБ, персистирующих у представителей древних адыгейцев и славян, аборигенов Республики Адыгея (см. приложение) и Москвы соответственно.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Изучению были подвергнуты смывы полости рта 59 жителей Майкопа (столицы Республики Адыгея), являющихся не менее чем

в 3-м поколении этническими адыгейцами. Изучаемая группа адыгейцев состояла из 25 здоровых мужчин и 34 женщин, жителей Майкопа; их средний возраст был равен 42,0 года. Аналогичные смывы получены от 40 здоровых коренных жителей Москвы (21 мужчины и 19 женщин), этнических славян (славян не менее чем в 3-м поколении), средний возраст которых составил 47,5 года. Смывы полости рта представляли собой суспензию клеток, полученных индивидуально от каждого изучаемого лица после полоскания полости рта в течение 30 с 15 мл стерильного физиологического раствора. Образцы смывов, собранные в герметично закрывающиеся пластиковые пробирки, хранились при температуре +4 °C не более 2 сут до исследования. От всех обследуемых лиц получено информированное согласие.

Экстракция ДНК и амплификация гена *LMP1*.

Из собранных смывов полости рта выделяли тотальную ДНК методом фенол-хлороформной депротеинизации. Наличие и концентрацию ДНК ВЭБ в выделенных образцах анализировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, описанным нами ранее [24]. Амплификацию *LMP1* проводили в 2 этапа с внешними и внутренними праймерами по принятой нами методике [25]. Каждый ПЦР-продукт очищали на мини-колонке QIAGEN согласно инструкции производителя. На реакцию брали примерно 100–200 нг ПЦР-продукта, а концентрацию ДНК оценивали визуально в агарозном геле. В качестве положительного контроля использовали 1 мкг ДНК, выделенной из используемой в качестве стандарта клеточной линии В95.8, а в качестве отрицательного контроля — воду.

Типирование вируса Эпштейна–Барр. Метод гнездовой ПЦР был использован для определения ДНК ВЭБ-1 и ВЭБ-2. Используемые праймеры продемонстрировали высокую специфичность и отсутствие перекрестной реактивности с геномом человека, другими вирусами или микроорганизмами [26]. В исследованиях использовали следующие пары праймеров: 5-AGG GATG CCT GGA CAC AAG A-3 и 5-TGG TGC TGC TGG TGG TGG CAA-3; для ВЭБ-1 — 5-TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA-3 и 5-ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT C-3; для ВЭБ-2 — 5-CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA-3 и 5-AGA CTT AGT TGA TGC TGC CCT AG-3.

Первый раунд ПЦР проводили в смеси общим объемом 24 мкл, которая включала 3 мкл матрицы; 2,5 мкл 10x буфера для ПЦР (pH 8,3); 0,2 мкл ДНК-полимеразы; по 0,2 мМ каждого дезоксинуклеотида трифосфата общим объемом 0,2 мкл; 0,6 мкл внешних праймеров (в разведении 5 пкмоль на 100 мкл) и 17,9 мкл стерильной H₂O. Проводимая в амплификаторе для ДНК Mastercycler Personal (Eppendorf, Германия) ПЦР-амплификация включала этап начальной денатурации при 94 °C в течение 5 мин, затем 30 циклов: денатурация при 94 °C — 30 с, отжиг праймеров при

60 °C — 30 с, элонгация при 72 °C — 1 мин с заключительным шагом элонгации при 72 °C в течение 5 мин.

Второй раунд амплификации выполняли в другой пробирке с 3 мкл ПЦР-продукта 1-го раунда в качестве матрицы. Состав ПЦР-смеси был следующим: 2,5 мкл 10х буфера для ПЦР (pH 8,3); 0,2 мкл ДНК-полимеразы; по 0,2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата общим объемом 0,2 мкл; 0,6 мкл внутренних праймеров (в разведении 5 пкМ на 100 мкл) и 17,9 мкл стерильной воды; ПЦР-амплификацию проводили также на приборе Mastercycler Personal (Eppendorf, Германия). Программа для 2-го раунда ПЦР состояла из 35 циклов денатурации при 94 °C в течение 30 с, отжига при 55 °C — 30 с, элонгации при 72 °C — 1 мин 30 с и заключительной стадии элонгации при 72 °C на протяжении 7 мин. Положительные контроли включали очищенную ДНК из клеток Namalwa. Ампликоны обнаруживали с помощью электрофореза, используя 12 мкл образца в 1,5 % агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия. Ожидаемые размеры целевых фрагментов ВЭБ-1 и ВЭБ-2 составляли 497 п. н. и 165 п. н. соответственно. Полимеразную цепную реакцию повторяли 1 раз для каждого клинического образца.

Количественное измерение вирусной ДНК. Число копий ДНК ВЭБ в смывах полости рта изучаемых лиц определяли с помощью ПЦР в реальном времени, следуя методике, описанной в работе К. Ло и соавт. [27]. Для построения калибровочных кривых использовали ДНК диплоидных клеток Namalwa, содержащих 2 интегрированных вирусных генома; при этом исходили из соотношения 3,3 пг геномной ДНК — 1 копия вирусной ДНК. Детали проведения реакции описаны нами ранее [28].

Секвенирование продуктов полимеразной цепной реакции *LMP1*. Ампликоны *LMP1* секвенировали в обоих направлениях. Секвенирование проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant. Для обработки данных секвенирования использовали программы Chromas 230 и Vector NTI.

Классификация *LMP1*. Нуклеотидные последовательности образцов *LMP1*, амплифицированные из смывов ротоглотки и транслированные в аминокислотные последовательности, подверглись анализу с помощью известной в литературе классификации R.H. Edwards и соавт. [12]. Классификация сформирована на базе сиквенсного анализа транслированных последовательностей гена *LMP1*, полученных от больных с ВЭБ-ассоциированной патологией и здоровых вирусоносителей из различных географических регионов мира.

Статистический анализ. Число копий ДНК ВЭБ в смывах полости рта лиц в исследуемых группах оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медиан с межквартильным интервалом (25-й и 75-й процентиля). С помощью

точного теста Фишера (Fisher's exact test) рассчитывали точное значение p при сравнении числа лиц, инфицированных ВЭБ-1 и ВЭБ-2; различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Инфицированность вирусом Эпштейна–Барр полости рта адыгейцев и славян. Плохое состояние полости рта, особенно у пожилых лиц, может стать серьезным фактором риска возникновения разнообразных новообразований пищеварительного тракта [29]. Хронические воспалительные процессы в полости рта, связанные с периодонтитом, утратой значительного количества зубов и другими патологиями, как правило, сопровождаются активным размножением бактерий. Бактерии, как известно, участвуют в производстве нитрозаминов (канцерогенов), а также стимулируют репликацию ВЭБ. Оба этих фактора могут быть вовлечены в процесс канцерогенеза с развитием новообразований, в том числе ассоциированных с данным вирусом [30].

Показатели инфицированности полости рта ВЭБ у адыгейцев и славян представлены в табл. 1. Из данных таблицы следует, что адыгейцы и славяне широко инфицированы ВЭБ. Копии ДНК ВЭБ у представителей обоих этносов были обнаружены в каждом миллилитре смыва полости рта, что свидетельствует об их практически 100 % инфицированности этим вирусом. Медиана чисел копий ДНК ВЭБ на 1 мл смыва полости рта у адыгейцев (мужчин и женщин) была несколько выше, чем у славян (мужчин и женщин) (1055 и 833 копий/мл соответственно), возможно, за счет большего числа клеток, содержащих ВЭБ, в адыгейских образцах. Однако различия между значениями медиан оказались статистически недостоверными ($p \leq 0,05$). Объединенные для мужчин и женщин значения медиан чисел копий вирусной ДНК на 1 клетку смыва, определяемую делением числа копий вирусной ДНК на число клеток в 1 мл смыва у представителей каждой этнической группы, равнялись практически нулю (0 и 0,01 соответственно). Эти данные, как и значения межквартильных интервалов, указывают на примерно равную и невысокую степени инфицированности полости рта адыгейцев и славян ВЭБ.

Типы и концентрация вируса Эпштейна–Барр у адыгейцев и славян. Изучение 2 популяций показало, что по процентному содержанию типов ВЭБ они различаются принципиально (рис. 1, а–в). Оказалось, что у адыгейцев доминировал ВЭБ-2, не обладающий способностью трансформировать В-лимфоциты *in vitro* (рис. 1, а), а у представителей славянской популяции — ВЭБ-1 (рис. 1, б), обладающий такой способностью. Так, из 59 образцов смывов полости рта адыгейцев ВЭБ-2 обнаружен в 45 случаях, а ВЭБ-1 — в 11 (76,3 и 18,6 % соответственно). В 3 случаях не выделена ДНК, в 1 случае тип вируса не определен. Из 38 образцов смывов полости рта славян ВЭБ-2 выявлен лишь

Таблица 1. Инфицированность вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ) полости рта адыгейцев и славян

Table 1. Epstein–Barr virus (EBV) infection of the oral cavity of the Adygeans and Slavs

Обследованные лица Examined persons (number)	Средний возраст, лет Average age, years	Число копий ДНК ВЭБ в 1 мл смыва, М (МКИ) Number of EBV DNA copies in 1 ml washout, IQR (M)	Число клеток в 1 мл смыва, М (МКИ) Number of cells in 1 ml washout, IQR (M)	Число копий ВЭБ на 1 клетку, М (МКИ) Number of EBV copies per 1 cell, IQR (M)
Этнические адыгейцы Республики Адыгея: Ethnic Adygeans people of the Republic of Adygea:				
мужчины ($n = 25$) men ($n = 25$)	37,4	592 (0–12 000)	4 154 809 (2 471 036–17 370 332)	0 (0–0,009)
женщины ($n = 34$) women ($n = 34$)	45,3	120 (0–32 673)	9 891 649 (3 191 503–24 091 712)	0 (0–0,00)
всего ($n = 59$) total ($n = 59$)	41,4	1055 (0–32 673)	5 440 174 (2 511 809 – 22 060 750)	0 (0–0,004)
Этнические славяне Москвы: Ethnic Slavs of the Moscow:				
мужчины ($n = 19$) men ($n = 19$)	56,4	437 (0–10 986)	3 954 721 (1 174 063–16 731 431)	0 (0–0,007)
женщины ($n = 21$) women ($n = 21$)	38,6	105 (0–23 367)	3 531 403–25 637 521 (12 978 894)	0 (0–0,002)
всего ($n = 38$) total ($n = 38$)	47,5	833 (0–3 281 025)	34 711 817 (23 065 080–69 397 634)	0,01 (0–0,257)

Примечание. МКИ – межквартильный интервал; М – медиана.

Note. IQR – interquartile range; M – median.

в 7 случаях, ВЭБ-2 – в 30 (18,4 и 78,9 % соответственно), в 1 случае тип вируса не определен. Различие в содержании ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у представителей адыгейской и славянской популяций статистически было высоко достоверным ($p < 0,001$).

О концентрации вирусной ДНК (числе ее копий на 1 мл смыва) можно судить по высоте столбцов на рис. 1. Отсутствие столбцов свидетельствует о том, что в данном смыве концентрацию вирусной ДНК установить не удалось, несмотря на возможность ее присутствия и определение типа. На это указывают соответствующие каждому вирусному изоляту подрисовочные квадратики, окрашенные в красный или синий цвет, обозначающие тип вируса. Согласно данным, представленным на рис. 1, а, б, показатели чисел копий ДНК ВЭБ/мл (отражаемые высотой столбцов) на 1 мл смыва полости рта адыгейцев в целом превышают таковые в смывах полости рта славян, по-видимому, за счет большего числа вирусосодержащих клеток в смывах полости рта адыгейцев по сравнению со славянами (см. табл. 1).

Таким образом, статистически высоко достоверное различие в содержании ВЭБ-1 и ВЭБ-2 ($p < 0,001$), обнаруженное у представителей адыгейцев и славян (см. рис. 1, в), свидетельствует о том, что этнический, а возможно, и географический факторы могут существенно влиять на распространенность типов ВЭБ в России.

Полиморфизм гена *LMP1* вируса Эпштейна–Барр у адыгейцев и славян. О полиморфизме гена *LMP1*

в вирусных штаммах, циркулирующих среди этнических адыгейцев и славян, свидетельствуют данные, представленные в табл. 2. Анализ нуклеотидных и дедуктивных аминокислотных последовательностей 29 ампликонов *LMP1*, полученных из 59 смывов полости рта адыгейцев и 40 ампликонов *LMP1*, полученных из 40 аналогичных смывов славян, выявил их существенное различие. Если у представителей славян кроме подавляющего числа белковых образцов *LMP1*, относящихся к подтипу прототипного варианта *LMP1*, B95.8/A (82,5 %), обнаружены и другие варианты белка (China (7,5 %), Med– (2,5 %) и NC (7,5 %)), то у представителей адыгейцев выявлен только 1 вариант *LMP1*, B95.8 (96,6 %) и его подтип – B95.8/A (3,4 %).

Сиквенсный анализ амплифицированных образцов *LMP1* адыгейского происхождения позволил в области STAR2 обнаружить САО-ассоциированные делеции S366T, а в области STAR3 – делеции S309T и S309N. Стоит отметить, что ни один образец *LMP1* адыгейского происхождения не содержал делеции 30 п. н. (346–355), что характерно для варианта del-*LMP1* [13]. Насколько подобные мутации типичны для адыгейцев, вероятно, можно будет судить, существенно увеличив число наблюдений.

Заболеваемость адыгейцев и славян новообразованиями, в состав которых входят ассоциированные с вирусом Эпштейна–Барр случаи. Доминирование нетрансформирующего типа ВЭБ (ВЭБ-2) у представителей адыгейцев позволило предположить наличие более низкого уровня заболеваемости ВЭБ-ассоциированными

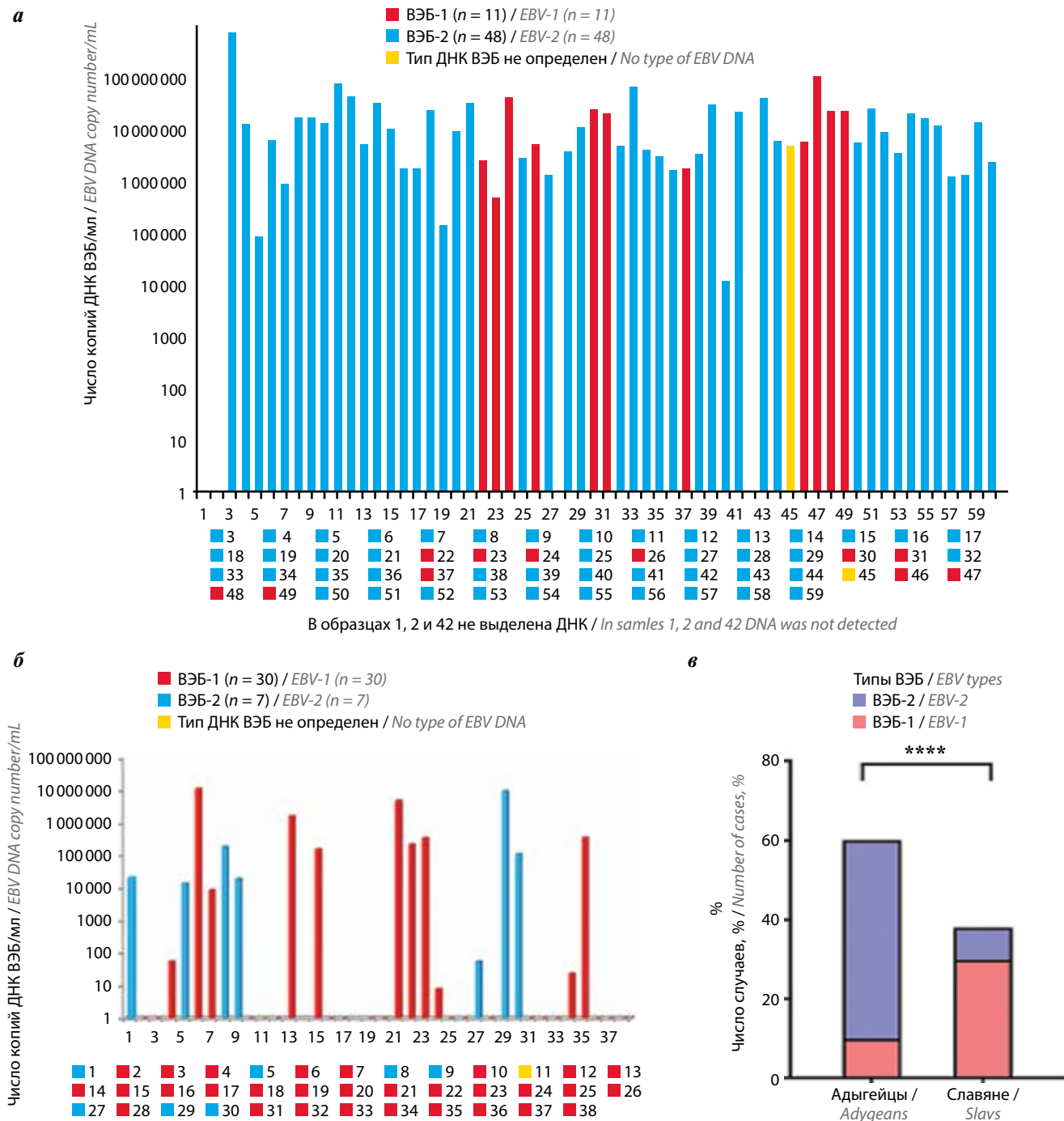


Рис. 1. Типы вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), концентрация ДНК вируса в полости рта адыгейцев (а) и славян (б) и соотношение ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у представителей этих этносов (в)

Fig. 1. Types of Epstein–Barr virus (EBV), concentration of virus DNA in the oral cavity of the Adygeans (a) and Slavs (б) and the ratio of EBV-1 and EBV-2 in representatives of these ethnic groups (в)

опухолями у населения Республики Адыгея по сравнению с таковым у населения Москвы, заселенной преимущественно славянами, у представителей которых преобладал трансформирующий 1-й тип вируса (ВЭБ-1). Для проверки этого предположения сравнивали показатели заболеваемости новообразованиями, среди которых диагностируют ВЭБ-ассоциированные случаи, для Москвы и Республики Адыгея [2]. Из данных, приведенных на рис. 2, следует, что заболева-

емость раком носоглотки, ЛХ и НХЛ — новообразованиями, относящимися к патологиям, в разной степени ассоциированным с ВЭБ, — у населения Республики Адыгея была несколько ниже, чем у населения Москвы. Однако различия были статистически недостоверными. Исключение составили лишь показатели заболеваемости раком желудка. У жителей Москвы они оказались существенно выше, чем у жителей Республики Адыгея; различие было статистически

Таблица 2. Полиморфизм *LMP1* в изолятах вируса Эпштейна—Барр из смывов полости рта адыгейцев и славянTable 2. *LMP1* polymorphism in Epstein—Barr virus isolates from oral washes of Adygeans and Slavs

Число образцов <i>LMP1</i> , абс. (%) Number of <i>LMP1</i> samples, abc. (%)	Варианты <i>LMP1</i> по классификации Edwards et al. (1999), абс. (%) <i>LMP1</i> variants by classification of Edwards et al. (1999), abc. (%)					Мутации в областях CTAR <i>LMP1</i> , абс. (%) Mutations in CTAR regions of the <i>LMP1</i> gene, abc. (%)		
	B95.8	B95.8/A	China	Med—	NC	CTAR 1 191–232	CTAR 2 351–386	CTAR 3 275–330
Этнические адыгейцы Республики Адыгея (<i>n</i> = 59) <i>Ethnic Adygeans people of the Republic Adygea (n = 59)</i>								
29 (49,2)	28 (96,6)	1 (3,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (10,3)	2 (6,9)
Этнические славяне Москвы (<i>n</i> = 40) <i>Ethnic Slavs of the Moscow (n = 40)</i>								
40 (100)	0 (0)	33 (82,5)	3 (7,5)	1 (2,5)	3 (7,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

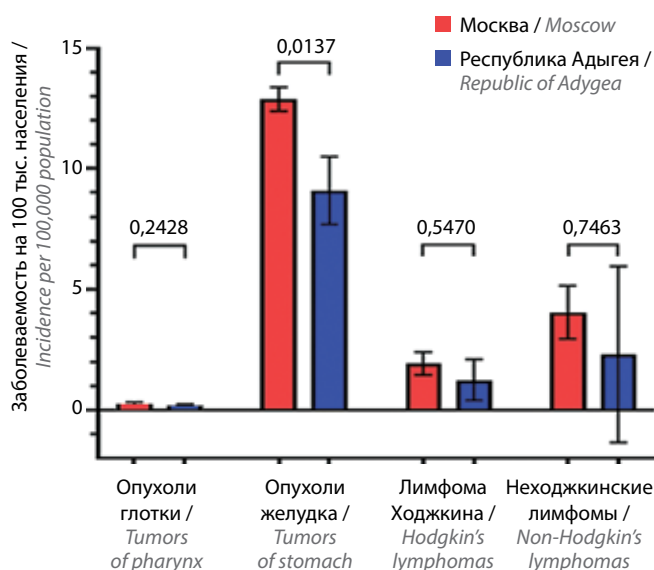


Рис. 2. Показатели заболеваемости злокачественными новообразованиями, включающими случаи, ассоциированные с вирусом Эпштейна—Барр, населения Москвы и Республики Адыгея. Для Москвы использованы стандартизированные показатели заболеваемости некоторыми злокачественными опухолями, среди которых встречаются случаи, ассоциированные с вирусом Эпштейна—Барр [2]

Fig. 2. Incidence rates of malignant neoplasm, including cases associated with the Epstein—Barr virus, for the population of the Moscow and the Republic of Adygea. For Moscow, we used adjusted incidence of certain malignant tumors, including cases associated with Epstein—Barr virus [2]

высоко достоверным ($p = 0,0137$). В ходе анализа показателей смертности от тех же новообразований в изучаемых популяциях было выявлено, что смертность от опухолей носоглотки и желудка у населения Республики Адыгея была выше, чем у населения Москвы (3,8 и 10,2 случая против 3,2 и 9,4 случая на 100 тыс. населения соответственно). В то же время показатели смертности от ЛХ и НХЛ, напротив, были хуже у населения Москвы, чем у населения Республики Адыгея (0,2 и 1,4 случая против 0,0 и 1,2 случая на 100 тыс. населения соответственно). Однако различия между по-

казателями смертности в сравниваемых группах были статистически недостоверными (данные не представлены).

ОБСУЖДЕНИЕ

Новые технологии секвенирования последних лет позволили проводить детальный анализ многочисленных геномов ВЭБ, полученных из образцов опухолевых биопсий, крови и слюны. Анализ опубликованных последовательностей вирусного генома был направлен на выяснение вопросов, являются ли некоторые из этих последовательностей специфическими для конкретной опухоли, этноса или географического региона и нельзя ли обнаружить штаммы ВЭБ высокого онкогенного риска. Сегодня к числу таких штаммов, по-видимому, можно отнести изолят ВЭБ M81, полученный от китайского больного раком носоглотки. Он вызывает пролиферацию В-клеток и демонстрирует высокую склонность к инфицированию эпителиальных клеток, что может явиться фактором риска для развития лимфом и различных форм рака, ассоциированных с ВЭБ. Используя иерархический байесовский (Hierarchical Bayesian) анализ структур различных популяций ВЭБ, L. Zanella и соавт. отобрали 12 популяций вируса, различающихся по ряду признаков [31]. Три из этих ВЭБ-популяций, представляющих собой штаммы азиатского происхождения, являются органоспецифическими. Так, за редким исключением популяция EBV-p1/Asia/GC была связана с развитием рака желудка, популяция EBV-p4/China/NPCs — с развитием рака носоглотки, а популяция EBV-p2/Asia II/Tumors — с несколькими типами других опухолей и лимфопролиферативных патологий [28]. Эти авторы для некоторых популяций ВЭБ обнаружили также заметную географическую зависимость их циркуляции. Одна популяция вируса была характерна для 4 азиатских стран (Китай, Японии, Кореи и Вьетнама), 2 другие персистировали исключительно в Кении, а еще 6 продемонстрировали более широкое географическое распространение.

Выполненное нами исследование подтвердило данные многочисленных работ, свидетельствующих о широкой инфицированности населения планеты ВЭБ. Группы этнических адыгейцев и славян были инфицированы этим вирусом в 100 % случаев. Большой интерес, однако, вызывает тот факт, что у представителей этносов одной и той же страны — России — доминируют различные типы ВЭБ. У адыгейцев преобладающим является ВЭБ-2, у славян — ВЭБ-1. Обнаруженный феномен поднимает вопрос о том, являются ли доминирующие варианты ВЭБ географически или этноспецифическими, а также может ли ВЭБ-1, обладающий более выраженным трансформирующим потенциалом *in vitro*, оказывать влияние на заболеваемость злокачественными новообразованиями, среди которых могут встречаться ВЭБ-ассоциированные случаи. Согласно статистическим данным, население Москвы действительно характеризуется более высокой заболеваемостью опухолями глотки, желудка, ЛХ и НХЛ по сравнению с населением Республики Адыгея [2], хотя различия между сравниваемыми показателями заболеваемости (кроме показателей для опухолей желудка) оказались статистически недостоверными ($p > 0,5$). Нам представляется, однако, что более высокие показатели заболеваемости злокачественными новообразованиями у жителей Москвы по сравнению с жителями Республики Адыгея не могут быть объяснены фактом обнаружения доминирующего распространения 1-го, трансформирующего,

типа ВЭБ у отобранной группы московских славян, поскольку многонациональное население Москвы представляет собой конгломерат представителей многочисленных этносов, среди которых этнические (не менее чем в 3-м поколении) славяне занимают лишь небольшой процент. Показатели же онкологической заболеваемости населения Москвы являются обобщающими и отражают структуру ее этнически разнородных жителей. В то же время более высокие и статистически достоверно отличающиеся показатели заболеваемости раком желудка у жителей Москвы по сравнению с таковыми у жителей Республики Адыгея, по нашему мнению, объясняются большей генетической предрасположенностью к развитию этой опухоли населения Москвы, а также более значительным воздействием на москвичей многочисленных вредных факторов окружающей среды, характерных для любого мегаполиса мира.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Причина доминирующей персистенции ВЭБ-1 среди славян и ВЭБ-2 среди адыгейцев остается неизвестной и требует дальнейшего изучения. Не исключено, что различающиеся генотипы ВЭБ, циркулирующие среди адыгейцев и славян, вносят определенный вклад в процесс канцерогенеза, но это предположение требует доказательства. Дальнейшие исследования с увеличением числа наблюдений и изучаемых этносов, возможно, позволят пролить свет на эти вопросы.

Приложение

Республика Адыгея [32]

Коренные жители Республики Адыгея, адыгейцы (адыги), — один из древнейших народов России, племена которых с исторических времен заселили Черноморское и Азовское побережье Северо-Западного Кавказа. В начале XIII в. адыги вошли в состав Золотой Орды. В 1864 г. закубанские адыги были включены в административно-политическую систему Российской империи. В настоящее время Рес-

публика Адыгея входит в состав Южного федерального округа России и географически со всех сторон окружена территорией Краснодарского края. Население республики составляет более 449 тыс. человек, из которых примерно 63,6 % — русские и 25,2 % — адыги (2015). Ведущими отраслями экономики адыгов являются сельское хозяйство и животноводство. Большинство адыгов — мусульмане-сунниты.



Географическое положение Республики Адыгея в Российской Федерации

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

1. Ghosh S.K., Singh A.S., Mondal R. et al. Dysfunction of mitochondria due to environmental carcinogens in nasopharyngeal carcinoma in the ethnic group of Northeast Indian population. *Tumour Biol* 2014;35(7):6715–24. DOI: 10.1007/s13277-014-1897-x
2. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. Malignant neoplasms in Russia in 2015 (morbidity and mortality). Ed. by Kaprin A.D., Starinskii V.V., Petrova G.V. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMIRTS” Minzdrava Rossii, 2017. (In Russ.).
3. Tsao S., Tsang C., To K., Lo K. The role of Epstein–Barr virus in epithelial malignancies. *J Pathol* 2014;235(2):323–33. DOI: 10.1002/path.4448
4. Galetsky S.A., Tsvetnov V.V., Land C.E. et al. Epstein–Barr-virus-associated gastric cancer in Russia. *Int J Cancer* 1997;73(6):786–9. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19971210)73:6<786::aid-ijc2>3.0.co;2-z
5. Crombie J.L., LaCasce A.S. Epstein Barr virus associated B-cell lymphomas and iatrogenic lymphoproliferative disorders. *Front Oncol* 2019;9:109. DOI: 10.3389/fonc.2019.00109
6. Sample J., Young L., Martin B. et al. Epstein–Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol* 1990;64(9):4084–92. DOI: 10.1128/JVI.64.9.4084-4092.1990
7. Farrell P.J. Epstein–Barr virus strain variation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015;390(Pt. 1):45–69. DOI: 10.1007/978-3-319-22822-8_4
8. Smith N.A., Baresel P.C., Jackson C.L. et al. Differences in the Epstein–Barr virus gp350 IgA antibody response are associated with increased risk for coinfection with a second strain of Epstein–Barr virus. *J Infect Dis* 2019;219(6):955–63. DOI: 10.1093/infdis/jiy601
9. Rickinson A.B., Young L.S., Rowe M. Influence of the Epstein–Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J Virol* 1987;61(5):1310–7. DOI: 10.1128/JVI.61.5.1310-1317.1987
10. Chang C.M., Yu K.J., Mbulaiteye S.M. et al. The extent of genetic diversity of Epstein–Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res* 2009;143(2):209–21. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.07.005
11. Ai J., Xie Z., Liu C. et al. Analysis of EBNA-1 and LMP-1 variants in diseases associated with EBV infection in Chinese children. *Virol J* 2012;9:13. DOI: 10.1186/1743-422X-9-13
12. Edwards R.H., Seillier-Moisewitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein–Barr virus strains. *Virology* 1999;261(1):79–95. DOI: 10.1006/viro.1999.9855
13. Pavlish O.A., Diduk S.V., Smirnova K.V. et al. Mutations of the Epstein–Barr virus LMP1 gene mutations in Russian patients with lymphoid pathology and healthy individuals. *Vopr Virusol* 2008;53(1):10–6.
14. Walling D.M., Shebib N., Weaver S.C. et al. The molecular epidemiology and evolution of Epstein–Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. *J Infect Dis* 1999;179(4):763–74. DOI: 10.1086/314672
15. Blake S.M., Eliopoulos A.G., Dawson C.W. et al. The transmembrane domains of the EBV-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) variant CAO regulate enhanced signalling activity. *Virology* 2001;282(2):278–87. DOI: 10.1006/viro.2001.0828
16. Wang D., Liebowitz D., Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 1985;43(3 Pt. 1):831–40. DOI: 10.1016/0092-8674(85)90256-9
17. Kulwichit W., Edwards R.H., Davenport E.M. et al. Expression of the Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(20):11963–8. DOI: 10.1073/pnas.95.20.11963
18. Nitta T., Chiba A., Yamamoto N. et al. Lack of cytotoxic property in a variant of Epstein–Barr virus latent membrane protein-1 isolated from nasopharyngeal carcinoma. *Cell Signal* 2004;16(9):1071–81. DOI: 10.1016/j.cellsig.2004.03.001
19. Blake S.M., Eliopoulos A.G., Dawson C.W. et al. The transmembrane domains of the EBV-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) variant CAO regulate enhanced signalling activity. *Virology* 2001;282(2):278–87. DOI: 10.1006/viro.2001.0828
20. Gantuz M., Lorenzetti M.A., Chabay P.A. et al. A novel recombinant variant of latent membrane protein 1 from Epstein Barr virus in Argentina denotes phylogeographical association. *PLoS One* 2017;12(3):e0174221. DOI: 10.1371/journal.pone.0174221
21. Zhou X.G., Sandvej K., Li P.J. et al. Epstein–Barr virus gene polymorphisms in Chinese Hodgkin’s disease cases and healthy donors: identification of three distinct virus variants. *J Gen Virol* 2001;82(Pt. 5):1157–67. DOI: 10.1099/0022-1317-82-5-1157
22. Saechan V., Mori A., Mitarnun W. et al. Analysis of LMP1 variants of EBV in Southern Thailand: evidence for strain-associated T-cell tropism and pathogenicity. *J Clin Virol* 2006;36(2):119–25. DOI: 10.1016/j.jcv.2006.01.018
23. Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Ботезату И.В. и др. Вирус Эпштейна–Барр у этнических татар: инфицированность и си-квенсные варианты онкогена LMP1. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;3:65–74. DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-65-74
24. Smirnova K.V., Senyuta N.B., Botezatu I.V. et al. Epstein–Barr virus in ethnic Tatars: infection and sequential variants of the LMP1 oncogene. *Advances in molecular oncology* 2018;3:65–74. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-65-74
25. Gurtsevitch V.E., Iakovleva L.S., Shcherbak L.N. et al. [The LMP1 oncogene sequence variations in patients with oral tumours associated or not associated with the Epstein–Barr]. *Mol Biol (Mosk)* 2013;47:987–95. (In Russ.).
26. Hahn P., Novikova E., Scherback L. et al. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int J Cancer* 2001;91(6):815–21. DOI: 10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::aid-ijc1122>3.0.co;2-w
27. Contreras A., Nowzari H., Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15(1):15–8. DOI: 10.1034/j.1399-302x.2000.150103.x
28. Lo Y.M., Chan L.Y., Chan A.T. et al. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein–Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1999;59(21):5452–5.
29. Gurtsevitch V.E., Senyuta N.B., Ignatova A.V. et al. Epstein–Barr virus biomarkers for nasopharyngeal carcinoma in non-endemic regions. *J Gen Virol* 2017;98:2118–27. DOI: 10.1099/jgv.0.000889
30. Abnet C.C., Qiao Y.L., Mark S.D. et al. Prospective study of tooth loss and incident esophageal and gastric cancers in China. *Cancer Causes Control* 2001;12(9):847–54. DOI: 10.1023/a:1012290009545
31. Huang J., Roosaar A., Axell T. et al. A prospective cohort study on poor oral hygiene and pancreatic cancer risk. *Int J Cancer* 2016;138:340–7. DOI: 10.1002/ijc.29710
32. Zanella L., Riquelme I., Buchegger K. et al. A reliable Epstein–Barr virus classification based on phylogenomic and population analyses. *Sci Rep* 2019;9(1):9829. DOI: 10.1038/s41598-019-45986-3

32. Шарце М.Г., Гладкевич Г.И., Эрлих В.Р. и др. Адыеа. Большая Российская энциклопедия. Доступно по: <https://bigenc.ru/geography/text/5595151>.

Shartse M.G., Gladkevich G.I., Erlich V.R. et al. Adygea. Great Russian Encyclopedia. Available at: <https://bigenc.ru/geography/text/5595151>.

Вклад авторов

К.В. Смирнова: организация исследования, анализ полученных результатов, редактирование статьи;
А.К. Лубенская: определение типов ВЭБ, амплификация LMP1;
Н.Б. Сеньюта: систематизация результатов исследования, анализ сиквенсов, определение вариантов LMP1;
Т.Е. Душенькина: сбор и обработка биологического материала;
В.Э. Гурцевич: идея и разработка дизайна исследования, оформление таблиц и рисунков, написание текста статьи.

Authors' contributions

K.V. Smirnova: organization of the study, analysis of the results obtained, article editing;
A.K. Lubenskaya: identification of EBV types, amplification of LMP1;
N.B. Senyuta: systematization of the study results, analysis of the EBV sequences, identification of LMP1 variants;
T.E. Dushenkina: collection and processing of biological material;
V.E. Gurtsevitch: the idea and design development of the study, the design of tables and figures, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.В. Смирнова / K.V. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0001-6209-977X>
А.К. Лубенская / A.K. Lubenskaya: <https://orcid.org/0000-0003-3953-7449>
Н.Б. Сеньюта / N.B. Senyuta: <https://orcid.org/0000-0001-8915-8274>
Т.Е. Душенькина / T.E. Dushenkina: <http://orcid.org/0000-0001-8279-514X>
В.Э. Гурцевич / V.E. Gurtsevitch: <https://orcid.org/0000-0003-1840-4364>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Это исследование было выполнено в рамках экспериментального государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации при координации ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Минздрава России.

Funding. This study was carried out as part of an experimental state task of the Ministry of Health of the Russian Federation under the coordination of the Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks of the Ministry of Health of Russia.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по этике 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 local ethics committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia approved the protocol of the study.

All patients signed an informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 25.04.2022. **Принята к публикации:** 20.06.2022.

Article submitted: 25.04.2022. **Accepted for publication:** 20.06.2022.

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-60-68



Детерминанты ферроптоза – потенциальные терапевтические мишени стволовых клеток глиобластомы

В.Е. Шевченко¹, З.Н. Никифорова², Т.И. Кушнир¹, И.А. Кудрявцев¹, А.А. Митрофанов¹, А.Х. Бекашев¹, Н.Е. Арноцкая¹

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

²ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации»; Россия, 123022 Москва, Звенигородское шоссе, 5

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Введение. Терапия мультиформной глиобластомы остается малоэффективной из-за быстроразвивающихся рецидивов опухоли, обусловленных высоким опухолевым потенциалом, резистентностью к химиолучевой терапии и повышенной диссеминацией стволовых клеток глиобластомы. Актуальной становится идентификация потенциальных терапевтических мишеней, позволяющих более эффективно уничтожать данные клетки. В связи с этим большое значение приобретает изучение ферроптоза (ФП), способного вызывать гибель опухолевых клеток с высокозлокачественным фенотипом. Однако ФП и его регуляторные пути в стволовых клетках глиобластомы до конца не изучены. В настоящее время также не ясно, чем отличается ФП в стволовых и дифференцированных клетках глиобластомы.

Цель исследования – методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучить экспрессию детерминант сигнального каскада ФП в CD133⁺-стволовых и CD133⁻-дифференцированных клетках глиобластомы.

Материалы и методы. Использовались протеомная масс-спектрометрия высокого разрешения и клеточные технологии.

Результаты. В целом идентифицированы 1970 белков, 15 из которых связаны с ФП и присутствуют в обеих популяциях клеток. Обнаружена положительная регуляция 12 детерминант ФП (ACSL1, ACSL3, COPZ1, FTH1, FTL, GPX1, GPX4, PCBP1, SLC3A2, TFRC, VDAC1, VDAC2) в CD133⁺-стволовых клетках глиобластомы по сравнению с CD133⁻-дифференцированными клетками глиобластомы, 10 из которых имели повышенную более чем в 2 раза экспрессию.

Заключение. Установлены важные закономерности в экспрессии детерминант ФП и протеинов, контролирующих этот процесс в стволовых клетках глиобластомы, которые могут использоваться при разработке новых подходов к обнаружению потенциальных мишеней для терапии мультиформной глиобластомы.

Ключевые слова: стволовые клетки глиобластомы, ферроптоз, мультиформная глиобластома, протеом, масс-спектрометрия

Для цитирования: Шевченко В.Е., Никифорова З.Н., Кушнир Т.И. и др. Детерминанты ферроптоза – потенциальные терапевтические мишени стволовых клеток глиобластомы. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(3):60–8. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-60-68

Ferroptosis determinants – potential therapeutic targets glioblastoma stem cells

V.E. Shevchenko¹, Z.N. Nikiforova², T.I. Kushnir¹, I.A. Kudryavtsev¹, A.A. Mitrofanov¹, A.Kh. Bekyashev¹, N.E. Arnotskaya¹

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

²Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality; 5 Zvenigorodskoe Shosse, Moscow 123022, Russia

Contacts: Valeriy Evgenievich Shevchenko vshev2015@yandex.ru

Introduction. Treatment of glioblastoma multiforme remains little effective due to the rapidly developing recurrence of the tumor, due to its high tumorigenic potential, resistance to chemoradiation therapy and increased dissemination of glioma stem cells. The identification of potential therapeutic targets, which make it possible to more effectively destroy glioma stem cells, becomes topical. In this regard, the study of ferroptosis (FP), which can cause the death of tumor cells with a highly malignant phenotype, is of great importance. However, FP and its regulatory pathways in the GSC are not fully understood. At present, it is also not clear how FP differs for glioma stem cells and glioblastoma differentiated cells.

Aim. To study the expression of ferroptosis signaling cascade determinants in CD133⁺ glioma stem cells and CD133⁻ glioblastoma differentiated cells using high resolution proteomic mass spectrometry.

Materials and methods. High-resolution proteomic mass spectrometry, cell technologies.

Results. In total, 1970 proteins were identified, 15 of which are associated with ferroptosis and are present in both cell populations. Upregulation of 12 FP determinants (ACSL1, ACSL3, COPZ1, FTH1, FTL, GPX1, GPX4, PCBP1, SLC3A2, TFRC, VDAC1, VDAC2) was found in CD133⁺ glioblastoma stem cells compared to CD133⁻ differential glioblastoma cells, 10 of which were more than 2-fold overexpressed.

Conclusion. Important regularities have been established in the expression of ferroptosis determinants and proteins controlling this process in glioma stem cells, which can be used in the development of new approaches to the detection of potential targets for the therapy of glioblastoma multiforme.

Keywords: glioblastoma stem cells, ferroptosis, glioblastoma multiforme, proteome, mass spectrometry

For citation: Shevchenko V.E., Nikiforova Z.N., Kushnir T.I. et al. Ferroptosis determinants – potential therapeutic targets glioblastoma stem cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = Advances in Molecular Oncology 2022;9(3):60–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-60-68

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на прогресс, достигнутый в терапии рака, лечение мультиформной глиобластомы (МГБ) остается малоэффективным из-за быстроразвивающихся рецидивов опухоли [1]. При выполнении стандартного протокола комплексной терапии МГБ медиана выживаемости больных составляет 12–15 мес. Отчасти это объясняется тем, что МГБ имеет высокую степень внутриопухолевой гетерогенности как на клеточном, так и на генетическом уровне, что является препятствием для преодоления резистентности к лечению. Клетки МГБ, выходящие из первичной опухоли, быстро проникают в нормальную паренхиму головного мозга, образуя рецидивы. Такие инвазивные клетки относительно устойчивы к радио- и химиотерапии [2], что еще более усложняет лечение этого заболевания.

В значительной степени инвазивность и резистентность МГБ к генотоксической терапии связывают с субпопуляцией стволовых клеток глиобластомы (СКГ) [3], способных самообновляться, инициировать и поддерживать рост опухоли, образуя рецидив [4]. Идентификация СКГ изначально основывалась на способности клеток МГБ экспрессировать CD133 – белок клеточной поверхности [5]. Однако CD133 не является уникальным маркером СКГ. Исследования выявили дополнительные маркеры – CD15, A2B5, Notch1, CD44, EZH2, STAT3 и другие, – которые могут обеспечить повышенную специфичность СКГ в сочетании с CD133 [5]. Стволовые клетки глиобластомы представляют значительную клиническую проблему и создают трудности для успешной терапии МГБ. Актуальной становится идентификация потенциальных терапевтических мишеней, позволяющих более эффективно уничтожать СКГ. В связи с этим большое значение приобретает изучение ферроптоза (ФП), способного вызывать запрограммированную гибель опухолевых клеток с высококачественным фенотипом.

Ферроптоз морфологически, биохимически и генетически отличается от других форм гибели клеток,

включая апоптоз, некроз и аутофагию, и является железозависимым процессом [6, 7]. Именно по этой причине ФП получил свое название как отдельная форма гибели клеток. Активные формы кислорода (АФК) играют ведущую роль в запуске ФП и образуются в ходе реакции Фентона, а не при работе митохондриальной электрон-транспортной цепи [8]. Активные формы кислорода вызывают окисление практически любого вещества клетки, включая генетический аппарат, белки и липиды [9]. В последние годы достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов ФП. Однако ФП и его регуляторные пути в СКГ до конца не изучены. В настоящее время также не ясно, чем отличается ФП в СКГ и дифференцированных клетках глиобластомы (ДКГ).

В настоящем исследовании впервые проведен протеомный анализ лизатов CD133⁺- и CD133⁻-клеток, полученных из глиомасфер линии клеток U87MG, для сравнения протеомов СКГ и ДКГ. Основное внимание уделялось дифференциально экспрессированным белкам ФП, играющего важную роль в гибели опухолевых клеток. Методом панорамной нано-высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (нано-ВЭЖХ-МС/МС) в целом идентифицированы 1970 белков, 15 из которых связаны с ФП и присутствуют в обеих популяциях клеток. Обнаружена положительная регуляция 12 детерминант ФП (ACSL1, ACSL3, COPZ1, FTH1, FTL, GPX1, GPX4, PCBP1, SLC3A2, TFRC, VDAC1, VDAC2) в CD133⁺-СКГ по сравнению с CD133⁻-ДКГ. Полученные данные и выявленные закономерности, на наш взгляд, указывают на возможность таргетирования сигнального каскада ФП в CD133⁺-СКГ, что может использоваться при разработке новых терапевтических схем лечения мультиформной глиобластомы.

Цель исследования – методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучить экспрессию детерминант сигнального каскада ФП в CD133⁺-стволовых и CD133⁻-дифференцированных клетках глиобластомы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. Для получения глиомасфер использовали клетки МГБ человека линии U87MG (American Type Culture Collection, Manassas, VA, США), как описано ранее [10]. CD133⁺-СКГ выделяли методом иммуносортинга, используя магнитные шарики с иммобилизованными на них антителами к CD133 (CD133 MicroBeadKit, Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя, тогда как CD133⁻ ДКГ свободно проходили через колонку [10]. Чистоту CD133⁺-СКГ оценивали методом проточной цитометрии с CD133-антителами (5–10 мкг/мл, MiltenyiBiotec, Германия); она превышала 90 % [10].

Приготовление образцов для масс-спектрометрии. Образцы клеток глиомасфер (CD133⁺- и CD133⁻-клетки) криоконсервировали в фосфатном буферном растворе при температуре –80 °С до использования. После оттаивания клетки лизировали и подвергали ультрафильтрации для удаления низкомолекулярных соединений [10]. После ферментативного расщепления образцы концентрировали при температуре 30 °С в центрифужном концентраторе LabconcoCentriVar (Labconco Corporation, США), растворяли в мобильной фазе (30 % ацетонитрила, 70 % воды и 0,1 % муравьиной кислоты, pH 2,7) и разделяли на 24 фракции [10]. Фракции упаривали досуха при 30 °С в центрифужном концентраторе Labconco CentriVar (Labconco Corporation, США) и повторно растворяли в 100 мкл 0,1 % муравьиной кислоты для масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрический анализ. Анализ триптических пептидов проводили с использованием нано-ВЭЖХ-Dionex Ultimate 3000 и масс-спектрометра LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с источником ионизации NanoSpray [10]. Масс-спектрометрические данные обрабатывали с помощью программ MaxQuant 1.6.17.0 (Biochemistry Computational Systems, Biochemistry Max Planck, Martinsried, Германия) и Perseus 1.6.0.7 (Max Planck Institute of Biochemistry, Германия).

Биоинформатический анализ. Биоинформатический анализ проводили с использованием программы DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <https://david.ncifcrf.gov>), а также открытой базы данных PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). Белок-белковые взаимодействия анализировали с помощью базы данных Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins v11.0 (STRING) (<https://string-db.org>), предназначенной для сбора, оценки и интегрирования всех общедоступных источников информации о белок-белковых взаимодействиях, а также для дополнения их расчетными прогнозами. Ее цель — создать комплексную и объективную глобальную сеть, включающую как прямые (физические), так и косвенные (функциональные) взаимодействия. В связи с этим по умолчанию в базе данных STRING для оценки комби-

нированного взаимодействия принята средняя достоверность >0,4.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения биологических процессов и сигнальных путей, отличающих CD133⁺-СКГ и CD133⁻-ДКГ, проводили сравнительный протеомный анализ лизатов этих клеток. Мы использовали label-free количественный нано-ВЭЖХ-МС/МС-метод для панорамного картирования протеомов 2 типов образцов (в триплетах). Анализ триптических пептидов с помощью программного обеспечения MaxQuant идентифицировал в целом 1970 белков при сопоставлении 47331 МС/МС-спектра с пептидными последовательностями в базе данных Swiss-Prot_human с ложным уровнем обнаружения (false discovery rate, FDR) 1 % для тройных повторов 2 видов образцов.

Программа Perseus идентифицировала следующее количество белков в лизатах клеточных линий: CD133⁺-СКГ — 1873 белка по 9044 пептидам (7867 уникальных пептидов); CD133⁻-ДКГ — 1732 белка по 8739 пептидам (7562 уникальных пептида). Из них 89 % белков идентифицировали по совпадению 2 и более пептидов и 11 % — по совпадению 1 пептида. Процент сиквенс-покрытия исследуемых белков изменялся от 0,2 до 77,0 %. Коэффициент корреляции Пирсона между образцами CD133⁺-СКГ и CD133⁻-ДКГ варьировал от 0,74 до 0,93.

Идентифицированные протеины показали высокий процент перекрытия для 2 клеточных популяций: 1635 (83 % из 1970 белков) белков обнаружили в обеих клеточных линиях, 238 (12 %) — только в CD133⁺-СКГ, а 97 (5 %) — только в CD133⁻-ДКГ. Из 1635 протеинов, присутствующих в обеих клеточных линиях, статистически значимые изменения ($p < 0,05$) экспрессии с кратностью >2 или <0,5 имели 595 протеинов и относились к дифференциально экспрессированным белкам. Использование 1 в качестве порогового логарифмического соотношения показало, что в CD133⁺-СКГ экспрессия 358 белков была выше, а экспрессия 237 белков — ниже по сравнению с CD133⁻-ДКГ.

Учитывая важную роль ФП в программируемой гибели опухолевых клеток, мы изучили экспрессию белков, связанных с этим сигнальным каскадом. В результате протеомного анализа идентифицированы 15 детерминант ФП. Как видно из данных, представленных в таблице, повышенную экспрессию наблюдали у 12 протеинов ($p < 0,05$) — ACSL1 (ацил-КоА-синтетаза 1), ACSL3 (ацил-КоА-синтетаза 3), COPZ1 (коатомер субъединица дзета-1), FTH1 (тяжелая цепь ферритина 1), FTL (легкая цепь ферритина), GPX1 (глутатионпероксидаза 1), GPX4 (глутатионпероксидаза 4), PCBP1 (поли (rC) — связывающий протеин), SLC3A2 (тяжелая цепь антигена клеточной поверхности 4F2, TFRC (рецептор трансферрина), VDAC1 (потенциал-зависимый анионный канал 1), VDAC2 (потенциал-зависимый анионный канал 2), — из них

Детерминанты сигнального каскада ферроптоза, экспрессия которых различается ($p < 0,05$) в CD133⁺-стволовых и CD133⁻-дифференцированных клетках глиобластомы

Determinants of the signaling cascade of ferroptosis, the expression of which differs ($p < 0.05$) between CD133⁺ stem and CD133⁻ differentiated glioblastoma cells

Индекс гена Gene index	Название белка Protein name	Число идентифицированных пептидов Number of identified peptides	CD133 ⁺ -СКГ/CD133 ⁻ -ДКГ CD133 ⁺ -GSC/CD133 ⁻ -GDC
ACSL1	Ацил-КоА-синтетаза 1 Acyl-CoA synthetase long chain family member 1	2	25,6
ACSL3	Ацил-КоА-синтетаза 3 Acyl-CoA synthetase long chain family member 3	4	3,4
COPZ1	Коатомер субъединица дзета-1 Coatomer subunit zeta-1	1	2,2
FTH1	Тяжелая цепь ферритина 1 Ferritin heavy chain 1	6	2,1
FTL	Легкая цепь ферритина Ferritin light chain	4	19,3
GPX1	Глутатионпероксидаза 1 Glutathione peroxidase 1	4	2,2
GPX4	Глутатионпероксидаза 4 Glutathione peroxidase 4	1	3,1
PCBP1	Поли (rC) — связывающий протеин Poly (rC) binding protein 1	6	1,8
SLC3A2	Тяжелая цепь антигена клеточной поверхности 4F2 4F2 cell-surface antigen heavy chain	3	4,3
TFRC	Рецептор трансферрина Transferrin receptor	5	2,0
VDAC1	Потенциал-зависимый анионный канал 1 Voltage dependent anion channel 1	8	1,8
VDAC2	Потенциал-зависимый анионный канал 2 Voltage dependent anion channel 2	6	2,5

Примечание. СКГ — стволовые клетки глиобластомы; ДКГ — дифференцированные клетки глиобластомы.

Note. GSC — glioblastoma stem cells; GDC — differentiated glioblastoma cells.

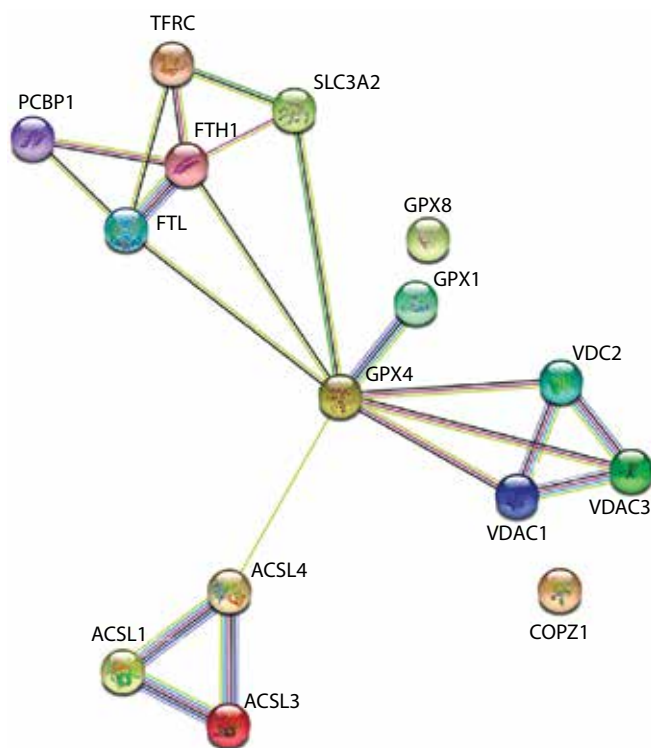
10 дифференциально экспрессированных белков имели повышенную экспрессию (более чем в 2 раза) в CD133⁺-СКГ по сравнению с CD133⁻-ДКГ. Достоверно не изменяли экспрессию 3 протеина (ACSL4, GPX8, VDAC3). Согласно данным, представленным в таблице, в СКГ наблюдались значительные изменения в экспрессии детерминант ФП по сравнению с ДКГ. Дисрегуляция касалась как белков, участвующих в ФП 1-го (SLC3A2) и 2-го (GPX1, GPX4, VDAC1, VDAC2) типов, так и регуляторных протеинов (ACSL1, ACSL3, COPZ1). Существенные различия в протеомах 2 популяций опухолевых клеток наблюдались и для белков, участвующих в метаболизме железа (FTH1, FTL, PCBP1, TFRC).

ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее время отмечается повышенный интерес к новым видам программируемой клеточной

гибели: некроптозу, ФП и пироптозу. В настоящей работе основное внимание уделяется ФП, играющему важную роль в процессах гибели опухолевых клеток. Согласно последним исследованиям патогенез глиом связан со снижением ФП в опухолевых клетках, что ускоряет пролиферацию и метастазирование глиом [11], способствует злокачественной трансформации и процессам ангиогенеза в глиомах [12]. Сообщается, что темозоломид, широко применяемый при терапии глиом, убивает опухолевые клетки и СКГ несколькими способами, включая ФП, и его эффективность можно повысить, индуцируя этот процесс [13]. Кроме того, маркеры ФП могут использоваться для прогнозирования выживаемости больных глиомами [14]. Учитывая важность ФП в онкогенезе, запущена база данных FerrDB по обзору регуляторов и маркеров ФП [15].

В данном исследовании впервые выполнен сравнительный протеомный анализ CD133⁺-СКГ

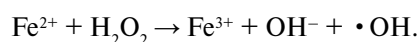


Белок-белковые взаимодействия 15 идентифицированных детерминант сигнального каскада ферроптоза, полученные с помощью веб-сайта STRING

Protein-protein interactions of 15 identified determinants of the ferroptosis signaling cascade, obtained from the STRING website

и CD133⁺-ДКГ. Мы идентифицировали 1970 белков, из которых к детерминантам сигнального каскада ФП относились 15 белков. Как видно из данных, представленных в таблице, положительную регуляцию в CD133⁺-СКГ наблюдали у 12 протеинов, 10 из которых (ACSL1, ACSL3, COPZ1, FTH1, FTL, GPX1, GPX4, SLC3A2, TFRC, VDAC2) имели повышенную более чем в 2 раза экспрессию. Интерактомное картирование с использованием базы данных STRING выполняли для 15 идентифицированных детерминантов ФП, чтобы установить их ассоциированных партнеров в сети белок-белковых взаимодействий. Согласно результатам функциональной ассоциации между белками ФП, представленным на рисунке, большинство из них тесно связаны друг с другом через скоординированную интерактивную сеть.

В регуляции метаболизма железа и редокс-дисбаланса при ФП участвуют митохондрии, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и лизосомы, что указывает на комплексную сигнальную сеть, контролирующую и обуславливающую ФП. Как отмечалось ранее, в основе ФП лежит реакция Фентона:



В результате этой реакции избыток железа, не связанный с ферритином или ферропортином, генерирует гидроксил-радикалы [6, 8]. В настоящее время

считается, что характерной особенностью ФП является железозависимое перекисное окисление липидов (ПОЛ), повреждающее плазматическую мембрану и мембраны внутриклеточных органелл клетки. Основной мишенью гидроксил-радикала являются полиненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов биомембран [16]. Синглетный кислород также участвует в ПОЛ, образуя гидропероксиды липидов из холестерина и этерифицированных липидов [17].

Семейство длинноцепочечных ацил-КоА-синтетаз (ACSL) играет важную роль в ФП и включает 5 изоформ — ACSL1 и ACSL3–6, — имеющих различные внутриклеточные локализации и субстратную специфичность. Протеомный анализ идентифицировал ACSL1, ACSL3 и ACSL4. Уровни ACSL1 и ACSL3 были увеличены в СКГ по сравнению с ДКГ в 25,6 и 3,4 раза соответственно (см. таблицу), тогда как экспрессия ACSL4 достоверно не изменялась. Все изоформы ACSL относились к детерминантам ФП, однако их роль в этом процессе и канцерогенезе в целом пока изучена недостаточно. ACSL1 и ACSL3 высоко экспрессируются при некоторых видах рака и коррелируют с плохим прогнозом. Ацил-КоА-синтетаза 1 участвует в опосредованном ФНО- α (фактором некроза опухоли α) провоспалительном фенотипе клеток и в основном способствует прогрессированию рака [18]. Гиперэкспрессия ACSL3 вызывала абсорбцию олеиновой кислоты и повышала резистентность опухолевых клеток к окислительному стрессу. Олеиновая кислота защищала клетки меланомы от ФП ACSL3-зависимым образом и способствовала отдаленному метастазированию [19].

Недавние исследования показали, что уровни белка ACSL4 снижены в тканях и клетках глиомы человека, что указывает на его связь с ФП и пролиферацией клеток глиомы [20, 21]. Индукторы ФП увеличивают экспрессию ACSL4, усиливают выработку ω -6 полиненасыщенных жирных кислот и активируют ФП [22].

Таким образом, учитывая особенности экспрессии трех детерминант ФП — ACSL1, ACSL3 и ACSL4 — в СКГ и ДКГ, можно сделать вывод о том, что они имеют перспективу стать новыми терапевтическими мишенями для СКГ.

При исследовании ФП были открыты как его индукторы (эрастин, RSL3, RSL5), так и ингибиторы (хелаторы железа, витамин E) [23]. Ферроптоз по морфологическим, биохимическим и генетическим особенностям отличается от апоптоза, аутофагии и программируемого некроза. Для ФП характерны такие морфологические изменения, как сжатие клетки и сокращение размеров митохондрий, уменьшение и даже исчезновение митохондриальных крист. Наблюдается также повышение плотности внутренних мембран митохондрий, однако клеточное ядро остается интактным и лишено свертывания хроматина, в отличие от апоптоза [24].

Регулируемая гибель клетки по типу ФП индуцируется препаратами, снижающими уровень глутатиона

(GSH) в клетке или активность глутатион-пероксидазы (GPx) [25]. Помимо каталазы и супероксиддисмутазы, GPx представляют собой 1-ю линию защиты клеток от окислительного стресса, регулируя клеточный редокс-баланс [26]. Глутатионпероксидаза катализирует восстановление перекисей липидов в соответствующие спирты и пероксида водорода в воду [27]. Оба класса индукторов ФП ведут к аккумулярованию в клетках АФК и продуктов ПОЛ биомембран.

Ингибирование системы xCT-Cys/Glu или уменьшение синтеза GSH инициирует ФП 1-го типа в раковых клетках [28]. С помощью системы xCT (цистин-глутамат антипортер) внутриклеточный глутамат выводится, а внеклеточный цистин транспортируется в клетку и участвует в синтезе GSH, который необходим для оптимальной активности глутатион-пероксидазы 4 (GPX4) — ключевого регулятора ФП. К настоящему моменту установлено, что транспортер является гетеродимером и состоит из субъединиц легкой (SLC7A11) и тяжелой (SLC3A2) цепи [29]. Экспрессия системы xCT часто активируется в раковых клетках, включая клетки глиобластомы, и ее экспрессия коррелирует с ростом опухоли и плохими показателями выживаемости [30]. Как видно из данных, представленных в таблице, экспрессия субъединицы SLC3A2 увеличена в СКГ в 4,3 раза по сравнению с ДКГ, что указывает на важность внутриклеточного транспорта цистина для предотвращения окислительного стресса и гибели СКГ. Однако то, как активность xCT регулируется в раковых клетках, до конца не изучено.

Прямое ингибирование GPX4 приводит к развитию ФП 2-го типа. Глутатион-пероксидазы — семейство 8 ферментов, защищающих организм от повреждения АФК [31]. Глутатион-пероксидаза 4 считается основным поглотителем гидроперекисей фосфолипидов или холестерина, в том числе включенных в липопротеины или биомембраны [32]. Она катализирует восстановление гидроперекисей липидов в соответствующие спирты, используя GSH как кофактор, и является главным внутриклеточным ингибитором ФП. Отмечен более высокий уровень GPX4 в тканях и клетках глиомы человека по сравнению со здоровой тканью и глиальными клетками, что указывает на снижение ФП при глиоме как *in vivo*, так и *in vitro*. Нокдаун *GPX4* ингибирует пролиферацию и миграцию клеток глиомы, а сайленсинг *GPX4* гена может индуцировать апоптоз [22]. Таким образом, GPX4 можно рассматривать как новый прогностический фактор при глиоме, который тесно коррелирует с пролиферацией, миграцией и апоптозом опухолевых клеток [33].

При сравнительном анализе протеомов CD133⁺-СКГ и CD133⁻-ДКГ идентифицированы 3 типа GPx: GPX1, GPX4 и GPX8.

По данным, представленным в таблице, экспрессия GPX4 в CD133⁺-СКГ больше в 3 раза по сравнению с CD133⁻-ДКГ, а GPX1 — примерно в 2 раза, тогда как экспрессия GPX8 достоверно не изменялась.

Повышенная экспрессия GPX1 и GPX4 делает СКГ более устойчивыми к ФП, чем ДКГ, и позволяет рассматривать эти детерминанты ФП в качестве потенциальных терапевтических мишеней для СКГ.

В настоящее время установлено, что потенциал-зависимые анионные каналы (voltage-dependent anion channels, VDAC) ответственны за поступление ионов и небольших молекул из цитоплазмы в межмембранное пространство митохондрий [34]. Регуляция активности этих каналов служит тем механизмом, который изменяет обмен метаболитами между митохондриями и цитоплазмой. Анализ протеомов СКГ и ДКГ идентифицировал 3 протеина этого семейства: VDAC1, VDAC2 и VDAC3. По ранее полученным данным, VDAC1 определен как многофункциональный белок и является динамическим регулятором глобальных митохондриальных функций [35], а также участвует в апоптозе [36]. Роль VDAC1 в ФП до конца не установлена. VDAC1 гиперэкспрессируется при многих типах рака [35], в том числе при МГБ [37]. Связывание VDAC1 с гексокиназой (HK1 и HK-II) регулирует гликолиз [38], а также, по-видимому, защищает опухолевые клетки от гибели [39]. Как видно из данных, представленных в таблице, экспрессия VDAC1 в СКГ повышена в 1,8 раза по сравнению с ДКГ. По нашим данным, увеличение экспрессии в 3,1 раза наблюдалось также и для HK1 в СКГ по сравнению с ДКГ.

Эрастин индуцирует ФП, непосредственно связываясь с VDAC2/3, изменяя проницаемость внешней митохондриальной мембраны и тем самым снижая уровень окисления никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) [40]. Однако механизм, с помощью которого эрастин вызывает специфическое подавление VDAC2/3, до конца не изучен.

По данным нашего протеомного анализа, повышенная экспрессия (выше в 2,5 раза) в СКГ наблюдалась в VDAC2, тогда как уровень VDAC3 достоверно не изменялся. Следует отметить, что сверхэкспрессия VDAC2 или VDAC3 по отдельности не влияла на эрастин-индуцированный ФП, но VDAC2 и VDAC3 вместе способствовали его возникновению [40].

Как уже отмечалось, ФП тесно связан с метаболизмом железа и ПОЛ. Наши исследования показали значительные изменения метаболизма железа в СКГ по сравнению с ДКГ. Согласно данным, представленным в таблице, дисрегуляция наблюдалась у рецептора трансферрина (transferrin receptor protein, TFR), TFR1, TFR2. Из-за важной роли железа в клеточных процессах его уровни жестко контролируются с помощью сети белков, регулирующих его поглощение, хранение, рециркуляцию и утилизацию как на системном, так и на клеточном уровне [41]. Железо представлено в клетках в 2 формах: Fe (II) и Fe (III). Двухвалентное железо участвует в переносе электронов и обладает высокой растворимостью, Fe (II) — содержащие белки всегда служат кофакторами и катализаторами, участвующими

в различных окислительно-восстановительных реакциях, тогда как запасается и транспортируется железо в стабильной форме Fe (III). Железо может быть токсичным для клеток, и при избытке его атомы способны отдавать электроны O_2 и H_2O_2 для генерации супероксидного анион-радикала и гидроксильного радикала, повреждающих клетки [42]. Однако исследования показали, что избыток АФК, генерируемых железом, может способствовать опухолевой прогрессии [43, 44], в то время как железозависимое накопление АФК вызывает ФП. Для объяснения этого противоречия была выдвинута гипотеза, что в раковой клетке редокс-сигналы железа и тиола поддерживают баланс, помогая клетке избежать ФП [45].

Внутриклеточное поступление железа осуществляется в основном эндоцитозом комплекса трансферрина с Fe (III), связанного с высокоаффинным TFR1 на клеточной поверхности и последующим высвобождением железа в цитоплазму [46]. Рецептор трансферрина 1 высоко экспрессируется при многих видах рака, включая глиому, и участвует в росте опухоли, что указывает на повышенную потребность в железе раковых клеток [47]. По нашим данным (см. таблицу), экспрессия TFRC в СКГ была даже выше в 2 раза, чем в ДКГ. Тем не менее остается неясным, как железо управляет опухолеспецифическими сигнальными каскадами и/или предпочтительно ли железо используется отдельными клетками в гетерогенной популяции опухоли, такой как глиобластома.

После попадания в клетку железо в виде Fe (III) связывается с ферритином, выполняющим роль основного внутриклеточного депо железа. Ферритин представляет собой гетерополимер, образованный субъединицами FTH1 и FTL. Высвобождение железа из ферритина жестко контролируется [48]. Клиническое значение ферритина для опухолевого роста продемонстрировано при некоторых видах рака. Ферритин участвует в онкогенезе, действуя как аутокринный фактор роста [49]. Таргетирование ферритина повышает чувствительность клеток глиомы к химиотерапии [50]. По мнению D.L. Schonberg и соавт., изменение доступности железа в СКГ устраняет драйверы фенотипа стволовых клеток, а ферритин представляет собой важную мишень для уничтожения зависимых от железа СКГ [51]. Результаты нашего исследования подтверждают увеличение уровня ферритина в СКГ. Согласно данным, представленным в таблице, экспрессия FTH1 и FTL повышена в CD133⁺-СКГ по сравнению с CD133⁻-ДКГ в 2,1 и 19,3 раза соответственно. Эти результаты показывают, что накопление железа имеет решающее значение для образования опухолей. Не связанный с ферритином избыток неконтролируемого железа, вероятно, блокирует шаги, необходимые для размножения СКГ, и создает среду, благоприятную для формирования опухолей [51].

Ранее показано, что PCBP1 [52] и COPZ1 [53] участвуют в ФП. Поли (rC) — связывающий протеин 1 подавляет аутофагию, важную для ФП, и является основным шапероном железа, облегчающим его загрузку в ферритины. Супрессия PCBP1 активирует синтез липидов и изменение клеточного липидного состава, создающее благоприятные условия для ПОЛ и ФП в раковых клетках [54]. Белок COPZ1 регулирует внутриклеточный транспорт, созревание эндосом, липидный гомеостаз, аутофагию [55] и связан с метаболизмом железа через регуляцию уровня трансферрина [56]. Уровни COPZ1 значительно повышены при МГБ по сравнению с неопухолевыми образцами ткани головного мозга. Нокдаун *COPZ1* приводил к деградации ферритина и последующему увеличению внутриклеточного уровня Fe (II) и в конечном счете к ФП [57]. По нашим данным (см. таблицу), экспрессия PCBP1 увеличена в СКГ в 1,8 раза, а COPZ1 — в 2,2 раза по сравнению с ДКГ. Таким образом, супрессия PCBP1 и COPZ1 является перспективным подходом к стимулированию ФП в СКГ.

Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод о том, что метаболизм железа и ПОЛ являются центральными медиаторами ФП как в СКГ, так и в ДКГ, индукция которого находится в прямой зависимости от пула GSH — эндогенного антиоксиданта клетки. Представленные данные показывают, что сигнальный каскад ФП менее активен в CD133⁺-СКГ по сравнению с CD133⁻-ДКГ. Этот феномен имеет большое значение для более эффективного уничтожения СКГ при использовании терапевтических схем, содержащих индукторы ФП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения проведено сравнительное картирование протеомов CD133⁺-СКГ и CD133⁻-ДКГ. Основное внимание уделялось изучению сигнального каскада ФП, играющего важную роль в программируемой клеточной гибели. Из 1970 идентифицированных белков 15 являлись детерминантами сигнального каскада ФП. В СКГ по сравнению с ДКГ обнаружена положительная регуляция 12 протеинов ФП, 10 из которых (ACSL1, ACSL3, COPZ1, FTH1, FTL, GPX1, GPX4, SLC3A2, TFRC, VDAC2) имели повышенную более чем в 2 раза экспрессию и могут рассматриваться в качестве потенциальных терапевтических мишеней для СКГ. Отмечена дисрегуляция в уровнях белков ФП 1-го и 2-го типов, регуляторных протеинов и белков, участвующих в метаболизме железа. Согласно представленным данным сигнальный каскад ФП менее активен в CD133⁺-СКГ по сравнению с CD133⁻-ДКГ, что имеет важное значение для более эффективного уничтожения СКГ при использовании терапевтических схем, содержащих индукторы ФП.

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

- Huse J.T., Holland E.C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer* 2010;10(5):319–31. DOI: 10.1038/nrc2818
- Chinnaiyan P., Won M., Wen P.Y. et al. A randomized phase II study of everolimus in combination with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma: results of NRG Oncology RTOG 0913. *Neuro Oncol* 2018;20(5):666–73. DOI: 10.1093/neuonc/nox209
- Roos A., Ding Z., Loftus J.C., Tran N.L. Molecular and microenvironmental determinants of glioma stem-like cell survival and invasion. *Front Oncol* 2017;7:120. DOI: 10.3389/fonc.2017.00120
- Chen J., McKay R.M., Parada L.F. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models and stem cells. *Cell* 2012;149(1):36–47. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.009
- Muftuoglu Y., Pajonk F. Targeting glioma stem cells. *Review Neurosurg Clin N Am* 2021; 32(2):283–9. DOI: 10.1016/j.nec.2021.01.002
- Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;149(5):1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042
- Zaffagnini G., Martens S. Mechanisms of selective autophagy. *J Mol Biol* 2016;428(9):1714–24. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.02.004
- Winterbourn C.C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* 1995;82–83:969–74. DOI: 10.1016/0378-4274(95)03532-x
- Bogdan A.R., Miyazawa M., Hashimoto K. et al. Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease. *Trends Biochem Sci* 2016;41(3):274–86. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.11.012
- Bryukhovetskiy A., Shevchenko V., Kovalev S. et al. To the novel paradigm of proteome-based cell therapy of tumors: through comparative proteome mapping of tumor stem cells and tissue-specific stem cells of humans. *Cell Transplant* 2014;23:151–70. DOI: 10.3727/096368914X684907
- Fan Z., Wirth A.K., Chen D. et al. Nrf2-Keap1 pathway promotes cell proliferation and diminishes ferroptosis. *Oncogenesis* 2017;6(8):e371. DOI: 10.1038/oncsis.2017.65
- Chen D., Fan Z., Rauh M. et al. ATF4 promotes angiogenesis and neuronal cell death and confers ferroptosis in a xCT-dependent manner. *Oncogene* 2017;36(40):5593–608. DOI: 10.1038/ncr.2017.146
- Buccarelli M., Marconi M., Pacioni S. et al. Inhibition of autophagy increases susceptibility of glioblastoma stem cells to temozolomide by igniting ferroptosis. *Cell Death Dis* 2018;9(8):841. DOI: 10.1038/s41419-018-0864-7
- Dahlmanns M., Yakubov E., Dahlmanns J.K. Genetic profiles of ferroptosis in malignant brain tumors and off-target effects of ferroptosis induction. *Front Oncol* 2021;11:783067. DOI: 10.3389/fonc.2021.783067
- Zhou N., Bao J. FerrDb: a manually curated resource for regulators and markers of ferroptosis and ferroptosis-disease associations. *Database (Oxford)* 2020;2020:baaa021. DOI: 10.1093/database/baaa021
- Yang W.S., Kim K.J., Gaschler M.M. et al. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(34):E4966–75. DOI: 10.1073/pnas.1603244113
- Hauck A.K., Bernlohr D.A. Oxidative stress and lipotoxicity. *J Lipid Res* 2016;57(11):1976–86. DOI: 10.1194/jlr.R066597
- Zhang Q., Zhou W., Yu S. et al. Metabolic reprogramming of ovarian cancer involves ACSL1-mediated metastasis stimulation through upregulated protein myristoylation. *Oncogene* 2021;40:97–111. DOI: 10.1038/s41388-020-01516-4
- Ubellacker J.M., Tasdogan A., Ramesh V. et al. Lymph protects metastasizing melanoma cells from ferroptosis. *Nature* 2020;585:113–8. DOI: 10.1038/s41586-020-2623-z
- Ma L.L., Liang L., Zhou D. et al. Tumor suppressor miR-424-5p abrogates ferroptosis in ovarian cancer through targeting ACSL4. *Neoplasma* 2021;68:165–73. DOI: 10.4149/neo_2020_200707N705
- Cheng J., Fan Y.Q., Liu B.-H. et al. ACSL4 suppresses glioma cells proliferation via activating ferroptosis. *Oncology Reports* 2020;43:147–58. DOI: 10.3892/or.2019.7419
- Yuan H., Li X., Zhang X. et al. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;478:1338–43. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.08.124
- Lachiaer E., Louandre C., Godin C. et al. Sorafenib induces ferroptosis in human cancer cell lines originating from different solid tumors. *Anticancer Res* 2014;34(11):6417–22.
- Dixon S.J. Ferroptosis: bug or feature? *Immunol Rev* 2017;277(1):150–7. DOI: 10.1111/imr.12533
- Meister A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 1995;251:3–7. DOI: 10.1016/0076-6879(95)51106-7
- Ighodaro O.M., Akinloye O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex J Med* 2019;54(4):287–93. DOI: 10.1016/j.ajme.2017.09.001
- Brigelius-Flohe R., Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(5):3289–303. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020
- Yang W.S., SriRamaratnam R., Welsch M.E. et al. Regulation of ferroptotic cancer death by GPX4. *Cell* 2014;156(1–2):317–31. DOI: 10.1016/j.cell.2013.12.010
- Bridges R.J., Natale N.R., Patel S.A. System xc(-) cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *Br J Pharmacol* 2012;165(1):20–34. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01480.x
- Takeuchi S., Wada K., Toyooka T. et al. Increased xCT expression correlates with tumor invasion and outcome in patients with glioblastoma. *Neurosurgery* 2013;72(1):33–41. DOI: 10.1227/NEU.0b013e318276b2de
- Farinati F., Cardin R., Maria N.D. et al. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol* 1995;22(4):449–56. DOI: 10.1016/0168-8278(95)80108-1
- Thomas J.P., Maiorino M., Ursini F., Girotti A.W. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J Biol Chem* 1990;265(1):454–61.
- Zhao H., Ji B., Chen J. et al. Gpx 4 is involved in the proliferation, migration and apoptosis of glioma cells. *Pathol Res Pract* 2017;213(6):626–33. DOI: 10.1016/j.prp.2017.04.025
- Maldonado E.N., Sheldon K.L., DeHart D.N. et al. Voltage-dependent anion channels modulate mitochondrial metabolism in cancer cells: regulation by free tubulin and erastin. *J Biol Chem* 2013;288(17):11920–9. DOI: 10.1074/jbc.M112.433847
- Shoshan-Barmatz V., Ben-Hail D., Admoni L. et al. The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 2015;1848(10):2547–75. DOI: 10.1016/j.bbame.2014.10.040
- Shoshan-Barmatz V., De Pinto V., Zweckstetter M. et al. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med* 2010;31(3):227–85. DOI: 10.1016/j.mam.2010.03.002
- Feichtinger R.G., Weis S., Mayr J.A. et al. Alterations of oxidative phosphorylation complexes in astrocytomas. *Glia* 2014;62(4):514–25. DOI: 10.1002/glia.22621
- Pedersen P.L. Voltage dependent anion channels (VDACs): a brief introduction with a focus on the outer mitochondrial compartment's roles together with hexokinase-2 in the “Warburg effect” in cancer. *J Bioenerg Biomembr* 2008;40(3):123–6. DOI: 10.1007/s10863-008-9165-7

39. Arzoine L., Zilberberg N., Ben-Romano R., Shoshan-Barmatz V. Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with hexokinase to prevent its anti-apoptotic activity. *J Biol Chem* 2009;284(6):3946–55. DOI: 10.1074/jbc.M803614200
40. Yagoda N., Rechenberg M., Zaganjor E. et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* 2007;447(7146):864–8. DOI: 10.1038/nature05859
41. Hentze M.W., Muckenthaler M.U., Galy B., Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 2010;142(1):24–38. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.028
42. Pignatello J.J., Oliveros E., MacKay A. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the fenton reaction and related chemistry. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2006;36(1):1–84. DOI: 10.1080/10643380500326564
43. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997;387(3):147–63. DOI: 10.1016/S1383-5742(97)00035-5
44. Toyokuni S. Iron and carcinogenesis: from fenton reaction to target genes. *Redox Rep* 2002;7(4):189–97. DOI: 10.1179/135100002125000596
45. Toyokuni S., Ito F., Yamashita K. et al. Iron and thiol redox signaling in cancer: an exquisite balance to escape ferroptosis. *Free Radic Biol Med* 2017;108:610–26. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.024
46. Torti S.V., Torti F.M. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer* 2013;13(5):342–55. DOI: 10.1038/nrc3495
47. Daniels T.R., Delgado T., Rodriguez J.A. et al. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin Immunol* 2006;121(2):144–58. DOI: 10.1016/j.clim.2006.06.010
48. Kurz T., Terman A., Gustafsson B. et al. Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem. Cell Biol* 2008;129:389–406. DOI: 10.1007/s00418-008-0394-y
49. Coffman L.G., Parsonage D., D'Agostino R. et al. Regulatory effects of ferritin on angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:570–5. DOI: 10.1073/pnas.0812010106
50. Liu X., Madhankumar A.B., Slagle-Webb B. et al. Heavy chain ferritin siRNA delivered by cationic liposomes increases sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 2011;71:2240–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1375
51. Schonberg D.L., Miller T.E., Wu Q. et al. Preferential iron trafficking characterizes glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell* 2015;28(4):441–55. DOI: 10.1016/j.ccr.2015.09.002
52. Ryu M.S., Zhang D., Protchenko O. et al. PCBP1 and NCOA4 regulate erythroid iron storage and heme biosynthesis. *J Clin Invest* 2017;127(5):1786–97. DOI: 10.1172/JCI90519
53. Beck R., Ravet M., Wieland F.T., Cassel D. The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS Lett* 2009;583(17):2701–9. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.07.032
54. Protchenko O., Baratz E., Jadhav S. et al. Iron chaperone poly rC binding protein protects mouse liver from lipid peroxidation and steatosis. *Hepatology* 2021;73(3):1176–93. DOI: 10.1002/hep.31328
55. Razi M., Chan E.Y., Tooze S.A. Early endosomes and endosomal coatome are required for autophagy. *J Cell Biol* 2009;185(2):305–21. DOI: 10.1083/jcb.200810098
56. Collinet C., Stoter M., Bradshaw C.R. et al. Systems survey of endocytosis by multiparametric image analysis. *Nature* 2010;464(7286):243–9. DOI: 10.1038/nature08779
57. Zhang Y., Kong Y., Ma Y. et al. Loss of COPZ1 induces NCOA4 mediated autophagy and ferroptosis in glioblastoma cell lines. *Oncogene* 2021;40(8):1425–39. DOI: 10.1038/s41388-020-01622-3

Вклад авторов

В.Е. Шевченко: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи;

З.Н. Никифорова: подготовка образцов для анализа;

Т.И. Кушнир: статистический анализ данных;

И.А. Кудрявцев: получение протеома клеток мультиформной глиобластомы;

А.А. Митрофанов: обзор публикаций по теме статьи;

А.Х. Бекашев: научное редактирование статьи;

Н.Е. Арноцкая: получение масс-спектрометрических данных, редактирование статьи.

Authors' contributions

V.E. Shevchenko: developing the research design, analysis of the received data, article writing;

Z.N. Nikiforova: preparation of samples for analysis;

T.I. Kushnir: statistical data analysis;

I.A. Kudryavtsev: obtaining proteome of glioblastoma multiforme cells;

A.A. Mitrofanov: review of publications on the topic of the article;

A.Kh. Bekyashev: scientific editing;

N.E. Arnotskaya: obtaining mass spectrometric data, editing editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

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

З.Н. Никифорова / Z.N. Nikiforova: <https://orcid.org/0000-0001-7657-3735>

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

И.А. Кудрявцев / I.A. Kudryavtsev: <https://orcid.org/0000-0001-7588-1066>

А.А. Митрофанов / A.A. Mitrofanov: <https://orcid.org/0000-0002-4125-7342>

А.Х. Бекашев / A.Kh. Bekyashev: <https://orcid.org/0000-0002-4160-9598>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Финансируется в рамках госбюджетной темы № 2021-76.

Funding. It is funded under the state budget theme No. 2021-76.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. This article does not describe any research involving humans or animals as subjects.

Статья поступила: 17.05.2022. **Принята к публикации:** 27.06.2022.

Article submitted: 17.05.2022. **Accepted for publication:** 27.06.2022.

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-69-84



Мутационный профиль диффузной В-крупноклеточной лимфомы с рецидивами в центральной нервной системе

Е.Н. Воропаева^{1,2}, Т.И. Поспелова², В.С. Карпова², М.И. Чуркина², Ю.В. Вяткин³, Т.А. Агеева², В.Н. Максимов¹

¹Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»; Россия, 630089 Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 630091 Новосибирск, Красный проспект, 52;

³ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»; Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 1

Контакты: Елена Николаевна Воропаева vena.81@mail.ru

Введение. Рецидив диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы в центральной нервной системе в подавляющем большинстве случаев является фатальным проявлением заболевания. Изучение мутационного профиля лимфомы может способствовать улучшению точности прогноза рецидива в центральной нервной системе и обоснованию отбора пациентов для профилактического лечения.

Цель исследования — изучить мутационный профиль случаев диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы с рецидивами в центральной нервной системе.

Материалы и методы. На платформе Illumina выполнено полноэкзомное секвенирование диагностических образцов диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы с рецидивами в центральной нервной системе. Проанализирована панель, включающая более 70 генов.

Результаты. Можно выделить 4 основные группы генетических событий в исследованных образцах, а именно: сочетанные мутации в генах сигнальных путей NF-κB (*MYD88*, *NOTCH1*, *CD79B*, *CARD11*) и JAK-STAT (*PIM1*, *STAT6*), а также абберрации в главном онкосупрессоре *TP53* и генах системы ремоделирования хроматина (*ARID1A*, *KMT2D*, *EP300*, *SMARCA4*). В группе исследования выявлена рекуррентная мутация с. 794T>C, р.L265P *MYD88*. Среди других находок следует отметить мутации в генах *CPIA* и *CD58*, имеющих значение в уклонении опухолевых клеток от иммунного надзора.

Заключение. Несмотря на кажущуюся гетерогенность мутационного профиля диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы с рецидивами в центральной нервной системе, в большинстве случаев для опухолевых клеток были характерны генетические нарушения, приводящие к продукции злокачественными лимфоцитами большого количества провоспалительных цитокинов, а также абберрации, снижающие иммуногенность и способствующие избеганию опухоли иммунного надзора.

Ключевые слова: лимфома, мутационный профиль, высокопроизводительное секвенирование, рецидив, сигнальный путь NF-κB, сигнальный путь JAK-STAT, ген *TP53*, ремоделирование хроматина, иммунологический контроль, центральная нервная система, диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома

Для цитирования: Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Карпова В.С. и др. Мутационный профиль диффузной В-крупноклеточной лимфомы с рецидивами в центральной нервной системе. Успехи молекулярной онкологии 2022; 9(3):69–84. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-69-84

Mutation profile of diffuse large B-cell lymphoma with relapses in the central nervous system

E.N. Voropaeva^{1,2}, T.I. Pospelova², V.S. Karpova², M.I. Churkina², Yu. V. Vyatkin³, T.A. Ageeva², V.N. Maksimov¹

¹Scientific Research Institute of Therapy and Preventive Medicine — branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian branch of the Russian Academy of Sciences; 175/1 Boris Bogatkov St., Novosibirsk 630089, Russia;

²Novosibirsk State Medical University, Ministry of Health of Russia; 52 Krasny Prospekt, Novosibirsk 630091, Russia;

³Novosibirsk National Research State University; 1 Pirogova St., Novosibirsk 630090, Russia

Contacts: Elena Nikolaevna Voropaeva vena.81@mail.ru

Introduction. The recurrence of diffuse large B-cell cell lymphoma in the central nervous system in the vast majority of cases is a fatal manifestation of the disease. The study of the lymphoma mutational profile can improve the accuracy of the prognosis of relapse in the central nervous system and justify the selection of patients for preventive treatment.

Aim. To evaluate the mutational profile of cases of diffuse large B-cell cell lymphoma with central nervous system damage in relapse based on the results of our own experiment on high-performance sequencing.

Materials and methods. On the Illumina platform, full-exome sequencing of diagnostic samples of diffuse large B-cell cell lymphoma with relapses in the central nervous system was performed. A panel including more than 70 genes was analyzed.

Results. Four main groups of genetic events can be distinguished in the group of studied samples, namely: combined mutations in the NF- κ B (*MYD88*, *NOTCH1*, *CD79B*, *CARD11*) and JAK-STAT (*PIM1*, *STAT6*) signaling pathways, as well as aberrations in the main oncosuppressor *TP53* and chromatin remodeling system genes (*ARID1A*, *KMT2D*, *EP300*, *SMARCA4*). A recurrent mutation c. 794T>C, p.L265P *MYD88* was detected in the study group. Among other findings, mutations in the *CIITA* and *CD58* genes should be noted, which are important in avoiding tumor cells from immune surveillance.

Conclusion. Despite the apparent heterogeneity of the mutational profile of diffuse large B-cell cell lymphoma with relapses in the central nervous system, in most cases, tumor cells were characterized by genetic disorders leading to the production of a large number of pro-inflammatory cytokines by malignant lymphocytes, as well as aberrations that reduce immunogenicity and contribute to the avoidance of immune surveillance by the tumor.

Keywords: lymphoma, mutational profile, high-throughput sequencing, relapse, NF- κ B signaling pathway, JAK-STAT signaling pathway, *TP53* gene, chromatin remodeling, immunological control, diffuse large B-cell lymphoma, central nervous system

For citation: Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Karpova V.S. et al. Mutation profile of diffuse large B-cell lymphoma with relapses in the central nervous system. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(3): 69–84. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-69-84

ВВЕДЕНИЕ

Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) является доминирующим типом агрессивных вариантов неходжкинских лимфом. При этом рецидивы ДВККЛ в центральную нервную систему (ЦНС) остаются одной из самых сложных клинических проблем. На одной чаше весов — относительно низкая частота данного события (до 5 % случаев заболевания), а на другой — выраженная тяжесть течения заболевания и высокая летальность пациентов [1].

Повышенная частота вовлечения ЦНС в рецидив ДВККЛ наблюдается в случаях лимфом, имеющих перестройки с вовлечением *MYC* и *BCL2* и/или *BCL6*, а также с поражением костного мозга, яичек или молочной железы, что подчеркивает необходимость выяснения особенностей биологии опухоли, связанных с потенциалом лимфомных клеток проникать в ЦНС [2–4].

В настоящее время неизвестно, какие еще молекулярно-генетические маркеры опухолевых клеток могут насторожить клинициста в отношении высокого риска вовлечения в опухолевый процесс ЦНС уже на этапе диагностики лимфомы. Кроме того, требуется разработка таргетных подходов, которые могут быть эффективны при профилактике и терапии данного типа прогрессирования опухоли.

При использовании существующей прогностической модели Central Nervous System International Prognostic Index (Международного прогностического индекса CNS-IPI) можно рассчитывать на предотвращение большого числа рецидивов в ЦНС. Для этого в группе высокого риска применяется многократное интратекальное или системное введение метотрексата в высоких дозах. К сожалению, такое профилактическое лечение является крайне токсичным и не может

быть назначено пожилым и соматически ослабленным пациентам [5]. В то же время примерно у 70–80 % больных, отнесенных к группе высокого риска, которым обязательно проводится терапия с целью профилактики, рецидивы не возникают, что приводит к чрезмерному лечению этих пациентов. Поэтому так важно вести поиск дополнительных предикторов развития рецидива ДВККЛ в ЦНС для возможного их учета совместно с существующей прогностической моделью [6, 7].

Обращают на себя внимание следующие факты. По мнению ряда авторов, развитие поражения ЦНС в ходе проведения или сразу после завершения первичной химиотерапии может указывать на наличие субклинического поражения ЦНС уже на начальных этапах формирования опухоли [6]. Согласно опубликованным данным, медиана срока от постановки диагноза ДВККЛ до возникновения рецидива с поражением ЦНС составляет около 6–7 мес. Кроме того, бывают изолированные рецидивы в ЦНС или рецидивы в ЦНС, предшествующие системному возобновлению проявления опухоли [8]. Все это должно свидетельствовать о ранней миграции лимфомных клеток за гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Биопсия опухолевого поражения в случае вовлечения ЦНС при рецидиве ДВККЛ проводится далеко не всегда, что может быть связано как с тяжестью состояния больного, так и с недоступностью очага поражения и приводит к малой изученности биологических свойств опухоли и отсутствию биобанка образцов [2].

Именно по этим причинам мы решили изучить мутационный статус лимфомы на основании анализа первичного биоматериала — биоптатов опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ, полученных на этапах диагностики.

Опубликованы результаты таргетного, полногеномного и полноэкзомного секвенирования образцов ДВККЛ, полученных от пациентов, а также нескольких клеточных линий данного типа лимфомы [1, 9].

Цель данного исследования — оценить мутационный профиль случаев ДВККЛ с поражением ЦНС при рецидиве на основании результатов собственного эксперимента по высокопроизводительному секвенированию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили диагностические блоки фиксированных формалином и парафинизированных биоптатов опухолевых лимфатических узлов и экстранодальных очагов поражения пациентов с ДВККЛ ($n = 9$), у которых при рецидиве

возникло поражение ЦНС. Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 1.

В исследование с блоков брали срезы толщиной 10–12 мкм с содержанием опухолевых клеток не менее 50 %. Для выделения ДНК использовали набор QiaAmp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции к набору. Оценку и контроль качества выделенных нуклеиновых кислот проводили с помощью аппарата Epoch (BioTek, США).

Далее проводили фрагментацию ДНК ультразвуком на наборе Covaris S2. Полученную геномную ДНК использовали для приготовления и обогащения библиотек при помощи наборов NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (Illumina, США) и NEBNext FFPE DNA Repair Mix (NEB, США) по инструкции производителей. Полученные библиотеки гибридизовали

Таблица 1. Характеристика пациентов с поражением центральной нервной системы в рецидиве диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы, которым было выполнено высокопроизводительное секвенирование

Table 1. Characteristics of patients with central nervous system lesions in recurrent diffuse large B-cell cell lymphoma who underwent high-throughput sequencing, central nervous system

Параметр Parameter	Случай Case								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Пол Sex	Ж F	Ж F	М M	Ж F	М M	Ж F	Ж F	Ж F	Ж F
Возраст, лет Age, years	54	55	27	66	69	73	53	55	30
ECOG-статус, баллы ECOG status, points	1	2	3	3	2	2	3	1	2
Стадия Stage	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV
В-симптомы B-symptoms	+	+	+	+	+	–	–	+	+
Экстранодальные поражения Extranodal lesions	+	–	–	+	–	–	+	+	+
Лейкемизация Leukemization	+	+	+	+	–	–	–	+	–
Массивные опухолевые поражения Massive tumor lesions	–	–	–	+	–	–	+	–	+
Уровень ЛДГ, МЕ/л LDH level, IU/l	609	589	406	986	746	671	807	708	953
Группа риска по Международному прогностическому индексу Risk group according to the International Prognostic Index	ПВ IH	ПВ IH	ПН IL	В H	ПВ IH	В H	ПВ IH	ПВ IH	В H
Период от ремиссии до рецидива с вовлечением ЦНС, мес Period from remission to relapse with CNS involvement, months	20	2	4	2	5	3	5	48	5
Тип поражения ЦНС Type of CNS lesion	ВМ IC	ВМ IC	ВМ + НЛ IC + NL	ВМ IC	ВМ IC	ВМ/ IC	ВМ IC	ВМ IC	ВМ/ IC
Характер поражения мозга The nature of brain damage	С S	С S	МФ MF	С S	С S	С S	МФ MF	С S	МФ MF

Примечание. М — мужчина; Ж — женщина; ECOG — Eastern Cooperative Oncology Group, Восточная кооперативная онкологическая группа; ПН — промежуточный низкий риск; ПВ — промежуточный высокий риск; В — высокий риск; ВМ — внутримозговое поражение; НЛ — нейролейкемия, МФ — мультифокальное поражение; С — солитарное поражение.

Note. M — male; F — female; ECOG — Eastern Cooperative Oncology Group; IL — intermediate low risk; IH — intermediate high risk; H — high risk; IC — intracerebral lesion; NL — neuroleukemia, MF — multifocal lesion; S — solitary lesion.

с SureSelect Human All Exon V7 exome (Agilent, США) согласно инструкции. Секвенирование выполняли на приборе HiSeq1500 с генерацией данных до среднего покрытия 100х.

Биоинформационный анализ необработанных данных проводили на платформе Genomenal [10] по следующей процедуре: контроль качества и фильтрация необработанных чтений, выравнивание на референсный геном человека версии GRCh38/hg38 с помощью инструмента BWA версии 0.7.17, отбор SNV/indels с использованием GATK версии 4.1.3.0 с последующими фильтрацией и контролем качества. Порог частоты альтернативных аллелей установлен на уровне 5 %. Все варианты, встречающиеся в базах данных dbSNP, 1000Genomes и ExAC с частотой выше 1 %, были исключены из анализа. Дополнительно проводили аннотирование по базам данных COSMIC и dbSNP, а также оценку функционального эффекта миссенс-мутаций с помощью предикторов Polyphen2, SIFT, Mutation Assessor и PROVEAN. Для работы были выбраны нонсенс-мутации, мутации со сдвигом рамки считывания, замены в сайтах сплайсинга, миссенс-замены.

Для анализа отобрана таргетная панель генов, которые играют важную роль в развитии и функционировании В-лимфоцитов и, по данным литературы, вовлечены в онкогенез. В исследование были включены гены регуляции иммунного ответа (*CIITA*, *B2M*, *TNFRSF14*, *CD58*), клеточного цикла и апоптоза (*RB1*, *MFHAS1*, *XPO1*, *MYC*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *FOXO1*, *TP53*, *ATM*, *GNA13*, *ERBB2*, *ERBB4*, *FBXW7*, *BCL2*, *GNA11*, *KRAS*, *NRAS*, *NPM1*, *STK11*), пролиферации, дифференцировки и миграции клеток (*ABL1*, *ALK1*, *APC*, *RET*, *SMAD4*, *EGFR*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *CDH1*, *CSF1R*, *CTNNB1*, *FLT3*, *GNAQ*, *HRAS*, *KDR*, *KIT*, *SOC1*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *PTEN*), сигнальных путей NOTCH (*NOTCH1*, *NOTCH2*), NF-κB (*TNFAIP3*, *MYD88*, *PIM1*, *CARD11*, *IRF4*, *PRDM1*), MAP-киназного (*BRAF*, *PTPN11*), JAK-STAT (*SOC1*, *STAT6*, *JAK2*, *JAK3*, *MET*), BCR (*CD79A*, *CD79B*, *ITPKB*, *TCF3*, *ID3*), эпигенетической регуляции (*EZH2*, *KMT2D*, *EP300*, *MEF2B*, *CREBBP*, *SMARCB1*, *SMARCA4*, *ARID1A*) и репарации ДНК (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1*).

Патогенные и вероятно патогенные однонуклеотидные замены с частотой мутантного аллеля 30 % и более были подтверждены методом прямого капиллярного секвенирования по Сэнгеру. Делеции валидированы методом полимеразной цепной реакции с фланкирующими праймерами с последующим электрофорезом в высокопроцентном полиакриламидном геле с добавлением глицерина.

С помощью онлайн-сервиса OncoPrinter [11] была получена картина совместного появления и взаимного исключения мутаций в генах при лимфоме. Мутации отдельных генов были представлены в виде графика «леденец на палочке» с помощью программы Lollipop software [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Функционально значимые мутации были выявлены в ряде генов анализируемой панели (табл. 2). На рис. 1 представлены результаты подтверждения выявленных находок с частотой мутантного аллеля более 30 % методами секвенирования по Сэнгеру.

Миссенс-мутации составили 22/35 (62,8 %), небольшие делеции — 8/35 (23 %), замены с образованием «стоп»-кодона — 3/35 (8,6 %), инсерция нуклеотида и синонимичная замена нуклеотида в сайте сплайсинга — по 1/35 (2,8 %). При этом только 3/8 делеций приводили к утрате кодонов в рамке считывания, в остальных случаях они вызывали сдвиг рамки считывания и преждевременную терминацию синтеза кодируемого белка.

В табл. 3 представлены результаты анализа функциональной значимости выявленных миссенс-замен. Все мутации, за исключением *MYD88* p.V204F, были отнесены большинством биоинформационных предикторных программ к возможно/вероятно патогенным заменам.

В целом можно выделить 4 группы основных генетических событий в группе исследованных образцов, а именно мутации в генах: сигнальных путей NF-κB (*MYD88*, *NOTCH1*, *CD79B*, *CARD11*) — 6/9 образцов, JAK-STAT (*PIM1*, *STAT6*) — 5/9 образцов, системы ремоделирования хроматина (*ARID1A*, *KMT2D*, *EP300*, *SMARCA4*) — 5/9 образцов, а также в главном онкосупрессоре *TP53* — 3/9 образцов.

Мутации в генах сигнальных путей NF-κB и JAK-STAT носили сочетанный характер, а наибольшее число нарушений было выявлено в образцах с мутациями в генах *MSH2* и *MSH6* (рис. 2), которые входят в систему мисс-матч-репарации и участвуют в процессах исправления инсерций, делеций и включений ошибочных нуклеотидов в последовательность ДНК в процессе репликации [13]. В 3/4 случаев выявленных мутаций в *MYD88* в группе исследования зафиксирована рекуррентная замена с.794T>C, p.L265P, которая является «горячей» точкой мутаций в гене (рис. 3).

Мутации в онкосупрессорных генах системы ремоделирования хроматина были представлены следующими находками. В 2 образцах выявлены замены в гене *KMT2D* (p.G2279R и p.Q3683X), кодирующем лизин-специфическую метилтрансферазу 2D [14]. В 1 из образцов была обнаружена мутация p.F1448S в гене *EP300*, ответственном за синтез фермента гистон-ацетилтрансферазы P300, которая действует как коактиватор для различных факторов транскрипции и участвует в регуляции генов, контролирующих клеточную пролиферацию, апоптоз, дифференцировку, клеточный цикл и репарацию ДНК [15]. Также в группе исследования выявлены мутации *SMARCA4* p.E187fs и *ARID1A* p.Q1212HfsX4 и p.Q1334del. Интересно, что все они представляли собой небольшие делеции, 2 из которых вызывают сдвиг рамки считывания и возникновение преждевременных «стоп»-кодонов,

Таблица 2. Данные секвенирования образцов опухолей пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой, у которых в рецидиве заболевания поражение центральной нервной системы

Table 2. Data from sequencing of tumor specimens from patients with diffuse large B-cell lymphoma who have relapsed disease central nervous system lesion developed

Ген Gene	Положение мутации Mutation position (GRCh38)	Генотип Genotype	Экзон Exon	Положение Position		Идентификатор Identifier		Частота мутаций* Mutation frequency*	Референсная последо- вательность Reference sequence	Глубина чтения (W/M) Reading depth (W/M)
				В ДНК In DNA	В белке In protein	dbSNP	COSMIC			
Образец 1 Sample 1										
MSH2	chr2:47412552 G>A	G/A	4	c.G784A	p.E262K	—	—	H/д N/a	ENST00000233146.6	17x (9/8)
MYD88	chr3:38141150 T>C	T/C	3	c.T794C	p.L265P	rs387907272	COSV57169334	0,0001	ENST00000495303.6	63x (15/48)
PIM1	chr6:37171466 G>T	G/T	4	c.G582T	p.K194N	—	—	H/д N/a	—	44x (29/15)
	chr6:37171468– 37171476 delACACCGTCT	ACACC GTCT/–	4	c.584_592del	p.195_198del	—	—	—	ENST00000373509.5	44x (29/15)
CARD11	chr7:2939925 C>T	C/T	6	c.G688A	p.D230N	—	COSV67796694	H/д N/a	ENST00000396946.8	41x (11/30)
NOTCH1	chr9:136505728 G>T	G/T	25	c.C4168A	p.P1390T	rs191645600	COSV53103214	0.0006	ENST00000277541.7	24x (18/6)
TP53	chr17:7674220 C>T	C/T	3	c.G347A	p.R116Q	rs11540652	COSV52661580	0.0002	ENST00000504290.5	25x (4/21)
CD79B	chr17:63929320 A>G	A/G	5	c.T284C	p.L95P	—	COSV50075918	H/д N/a	ENST00000349817.2	47x (18/29)
SMARCA4	chr19:11007900– 11007902 delAGG	AGG/–	6	c.559_559del	p.E187fs	rs759896283	—	0,00001	ENST00000643208.1	42x (36/6)
Образец 2 Sample 2										
TP53	chr17:7674253 A>G	A/G	3	c.T314C	p.M105T	—	COSV53037559	H/д N/a	ENST00000504290.5	77x (54/23)
Образец 3 Sample 3										
MSH2	chr:47463067 G>C	G/C	9	c.G1423C	p.D475H	—	—	H/д N/a	ENST00000233146	16x (8/8)
MYD88	chr3:38140534 G>T	G/T	3	c.G610T	p.V204F	rs776995408	—	0,000007	ENST00000495303.6	307x (182/124)
PIM1	chr6:37171287 G>C	G/C	4	c.G403C	p.E135Q	—	—	H/д N/a	ENST00000373509.6	500x (260/240)

Продолжение табл. 2
Continuation of table 2

Ген Gene	Положение мутации Mutation position (GRCh38)	Генотип Genotype	Экзон Exon	Положение Position		Идентификатор Identifier		Частота мутации* Mutation frequency*	Референсная последо- вательность Reference sequence	Глубина чтения (W/M) Reading depth (W/M)
				В ДНК In DNA	В белке In protein	dbSNP	COSMIC			
<i>CD79B</i>	chr17:63929439 T>A	T/A	5	c.T586A	p.Y196N	—	—	H/д N/a	ENST00000006750.7	214x (39/175)
<i>ARID1A</i>	chr17:26772908 delG	G/—	14	c.3636del	p.Q1212HfsX4	—	—	H/д N/a	ENST00000324856.13	10x (8/2)
Образец 4 Sample 4										
<i>KMT2D</i>	chr12:49040935 C>T	C/T	31	c.G6835A	p.G2279R	—	—	H/д N/a	ENST00000301067.11	166x (114/52)
Образец 5 Sample 5										
<i>MSH6</i>	chr2:47801134 G>A	G/A	2	c.G2761A	p.V921I	rs576269342	COSV52273761	0,0009	ENST00000540021.5	190x (97/93)
<i>MYD88</i>	chr3:38141150 T>C	T/C	3	c.T794C	p.L265P	rs387907272	COSV57169334	0,00001	ENST00000495303.6	322x (198/124)
<i>KMT2D</i>	chr12:49033658 G>A	G/A	39	c.C11047T	p.Q3683X	—	COSV56419976	—	ENST00000301067.11	335x (230/105)
<i>CIITA</i>	chr16:10910180— 10910186 delCTCTCCA	CTCT CCA/—	11	g. 10910180— 10910186	p.R809fs	—	—	—	ENST00000324288.13	48x (22/26)
<i>TP53</i>	chr17:7673802 C>T	C/T	4	c.G422A	p.R141H	rs28934576	COSV52660980	0,00003	ENST00000504290.5	46x (27/19)
<i>EP300</i>	chr22:41170462 T>C	T/C	27	c.T4343C	p.F1448S	—	COSV54331536	—	ENST00000263253.8	290x (222/67)
Образец 6 Sample 6										
<i>CD58</i>	chr1:116570907 G>T	G/T	1	c.C66A	p.C22X	—	—	H/д N/a	ENST00000369487.3	107x (4/103)
<i>MYD88</i>	chr3:38141150 T>C	T/C	3	c.T794C	p.L265P	rs387907272	COSV57169334	0,00001	ENST00000495303.6	116x (74/42)
<i>PIM1</i>	chr6:37171024 G>A	G/A	3	c.G233A	p.G78E	—	COSV65165083	H/д N/a	ENST00000373509.5	63x (48/15)
<i>BCL2</i>	chr18:63318090 C>T	C/T	1	c.G577A	p.G193R	—	—	H/д N/a	ENST00000398117.1	83x (61/22)

Окончание табл. 2
The end of table 2

Ген Gene	Положение мутации Mutation position (GRCh38)	Генотип Genotype	Экзон Exon	Положение Position		Идентификатор Identifier		Частота мутации* Mutation frequency*	Референсная последо- вательность Reference sequence	Глубина чтения (W/M) Reading depth (W/M)
				В ДНК In DNA	В белке In protein	dbSNP	COSMIC			
Образец 7 Sample 7										
ARID1A	chr1:26773690– 26773693 delGCA	GCA/ –	16	c.3999- 4001del	p.Q1334del	–	COSV95590316	0,00005	ESNT000000324856.13	39x (29/10)
CD79B	chr17:63929309– 63929324 delGTCAATG TCCAGGCC	GTCAATGT CCAG GCC/ –	6	c.592-606del	p.G198 D202del	–	–	H/д N/a	ESNT000000349817.2	28x (22/6)
CD79B	chr17:63929839– 63929840 delC	C/ –	4	c.479del	p.G160VfsX4	–	–	H/д N/a	ESNT000000349817.2	14x (8/6)
Образец 8 Sample 8										
PIM1	chr6:37171029 C>T	C/T	3	c.C.238T	p.L80L	rs376834220	COSV97848761	H/д N/a	ENST000000373509.6	115x (79/35)
CD79B	chr17:63929435 T>TC	T/TC	5	c.589dup	p.E197GfsX6	–	–	H/д N/a	ESNT000000349817.2	130x (75/65)
Образец 9 Sample 9										
STAT6	chr12:57102472 G>A	G/A	13	c.G1330A	p.E444K	–	–	H/д N/a	ENST000000300134.8	19x (14/5)
CIITA	chr16:10907411 T>G	T/G	11	c.T1919G	p.L641R	–	–	H/д N/a	ENST000000324288.13	71x (56/15)
CIITA	chr16:10923259 C>T	C/T	19	c.C3349T	p.Q1118X	–	–	H/д N/a	ENST000000324288.13	47x (34/12)
SOC1	chr16:11255269– 11255284 delGCGCGC GTGATGCGC	GCGCG CGTGAT GCGC/ –	1	c.195_209del	p.R66_A70del	–	–	H/д N/a	ENST000000644787.1	63x (55/8)

*Данные Exome Aggregation Consortium database.

*Data from Exome Aggregation Consortium database.

Примечание. H/d – нет данных; W – число чтений дикого аллеля; M – число чтений мутантного аллеля.

Note. N/a – no data available; W – number of wild allele readings; M – number of mutant allele readings.

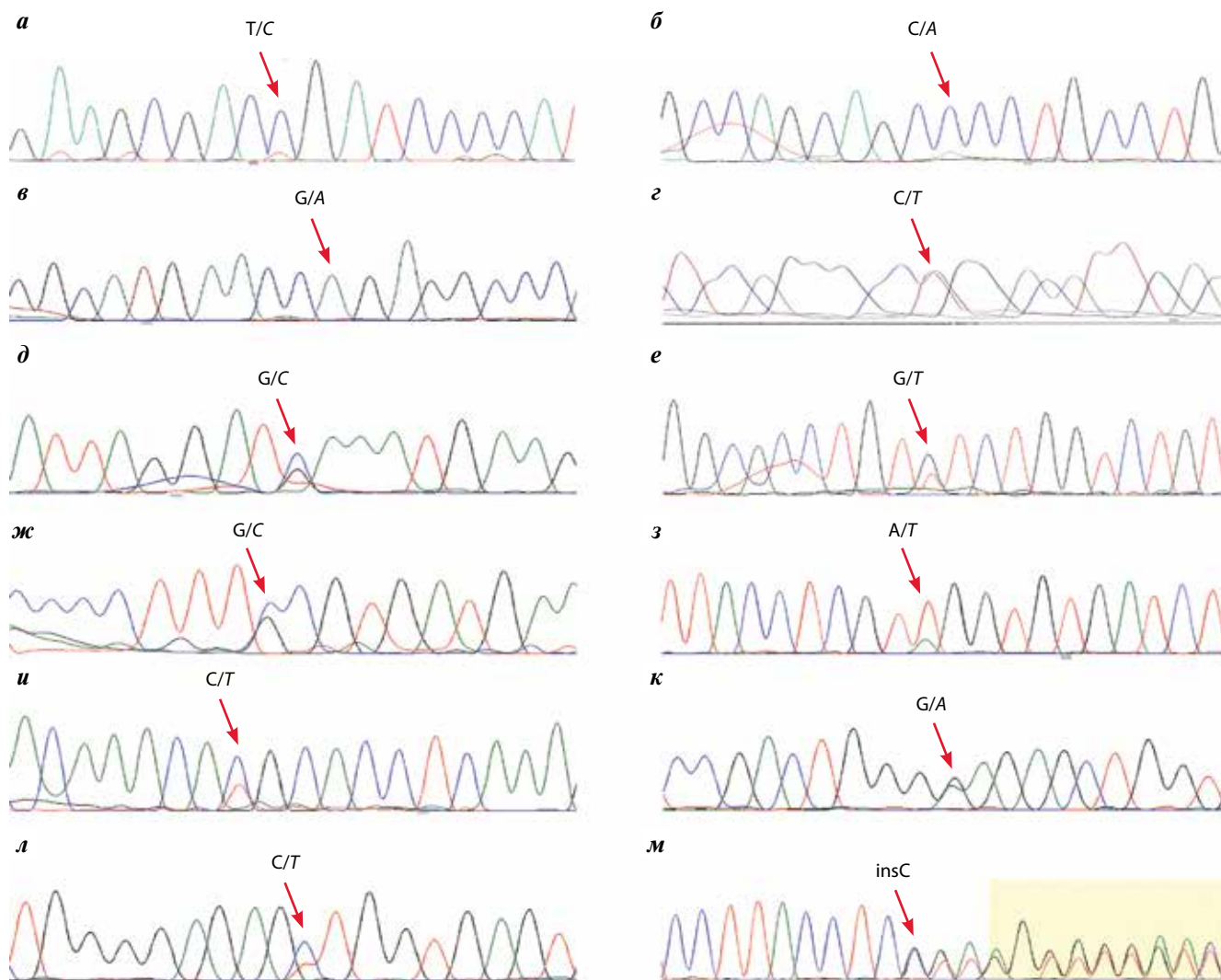


Рис. 1. Секвенограммы мутаций: а – MYD88 p.L265R; б – NOTCH1 p.P1390T; в – TP53 p.R116Q; г – CD79B p.L95P; д – MSH2 p.D475H; е – MYD88 p.V204F; ж – PIM1 p.E135Q; з – CD79B p.Y196N; и – TP53 p.R141H; к – PIM1 p.G78E; л – PIM1 p.L80L; м – CD79B p.E197GfsX6
 Fig. 1. Mutation sequences: а – MYD88 p.L265R; б – NOTCH1 p.P1390T; в – TP53 p.R116Q; г – CD79B p.L95P; д – MSH2 p.D475H; е – MYD88 p.V204F; ж – PIM1 p.E135Q; з – CD79B p.Y196N; и – TP53 p.R141H; к – PIM1 p.G78E; л – PIM1 p.L80L; м – CD79B p.E197GfsX6

что неминуемо приводит к снижению количественного содержания функционально активного белка [16].

Мутации в ДНК-связывающем домене главного онкосупрессорного гена *TP53* были выявлены в 1/3 исследованных случаев: p.M105T, p.R116Q и p.R141H. Все они зафиксированы в базе данных COSMIC при различных злокачественных новообразованиях, а 2 последние мутации являются «горячими» точками мутаций в гене и многократно упоминаются в этой базе, в том числе при лимфоидных опухолях (см. рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Рецидив ДВККЛ в ЦНС является одним из наиболее тяжелых проявлений опухолевой прогрессии заболевания и фатальным в подавляющем большинстве случаев. Добавление ритуксимаба – анти-CD20 моноклонального антитела – в протоколы лечения В-клеточных лимфом привело к улучшению исходов

ДВККЛ, но не решило проблемы поражения ЦНС при рецидиве опухоли в силу малой проницаемости препарата через ГЭБ [2].

Прогнозирование риска рецидива развития лимфомы в ЦНС и отбор пациентов для проведения агрессивной профилактики остаются не до конца решенными задачами. Международный прогностический индекс CNS-IPI, основанный на учете таких факторов риска, как возраст старше 60 лет, заболевание III и IV стадии, общесоматический статус >1 балла, наличие 2 и более очагов экстракраниального поражения, повышенный уровень лактатдегидрогеназы сыворотки крови, а также вовлечение почек или надпочечников, позволяет определить группу повышенного риска вовлечения ЦНС с частотой рецидива до 10–12 %. Однако 50 % рецидивов ДВККЛ в ЦНС происходит в группах пациентов низкого/среднего риска, не получающих профилактического лечения [17].

Таблица 3. Функциональный анализ выявленных мутаций

Table 3. Functional analysis of identified mutations

Мутация Mutation		Предикторная программа Predictor program				
Изменение в белке Change in protein	Эффект Effect	SIFT	PolyPhen2	LRT	MutationAssessor	PROVEAN
MYD88 p.L265P	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
MYD88 p.V204F	Замена аминокислоты Amino acid replacement	НП NP	НП NP	НП NP	НП NP	НП NP
MSH2 p.E262K	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
MSH2 p.D475H	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
PIM1 p.E135Q	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
PIM1 p.K194N	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
PIM1 p.G78E	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
CARD11 p.D230N	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
NOTCH1 p.P1390T	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
TP53 p.R116Q	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
TP53 p.M105T	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
TP53 p.R141H	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
CD79B p.L95P	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
CD79B p.Y196N	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
KMT2D p.G2279R	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
MSH6 p.V921I	Замена аминокислоты Amino acid replacement	НП NP	НП NP	П P	П P	П P
EP300 p.F1448S	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
BCL2 p.G193R	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
STAT6 p.E444K	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	П P	П P	П P
CIITA p.L641R	Замена аминокислоты Amino acid replacement	П P	П P	НП NP	П P	НП NP
CIITA p.Q1118X	Образование «стоп»-кодона “Stop”-codon formation	—	—	—	—	—
SOC31 p.R66_A70del	Делеция в рамке считывания In-frame deletion	—	—	—	—	—

Окончание табл. 3

The end of table 3

Мутация Mutation		Предикторная программа Predictor program				
Изменение в белке Change in protein	Эффект Effect	SIFT	PolyPhen2	LRT	MutationAssessor	PROVEAN
<i>ARID1A</i> p.Q1334del	Делеция в рамке считывания In-frame deletion	—	—	—	—	—
<i>ARID1A</i> p.Q1212HfsX4	Сдвиг рамки считывания Frameshift	—	—	—	—	—
<i>SMARCA4</i> p.E187fs	Сдвиг рамки считывания Frameshift	—	—	—	—	—
<i>PIM1</i> p.195_198del	Сдвиг рамки считывания Frameshift	—	—	—	—	—
<i>PIM1</i> p.L80L	Мутация в сайте сплайсинга Mutation at the splicing site	—	—	—	—	—
<i>CD79B</i> p.G198_D202del	Делеция в рамке считывания In-frame deletion	—	—	—	—	—
<i>CD79B</i> p.G160VfsX4	Сдвиг рамки считывания Frameshift	—	—	—	—	—
<i>CD79B</i> p.E197GfsX6	Сдвиг рамки считывания Frameshift	—	—	—	—	—
<i>KMT2D</i> p.Q3683X	Образование «стоп»-кодона “Stop”-codon formation	—	—	—	—	—
<i>CD58</i> p.C22X	Образование «стоп»-кодона “Stop”-codon formation	—	—	—	—	—
<i>CIITA</i> p.R809fs	Сдвиг рамки считывания Frameshift	—	—	—	—	—

Примечание. П — патогенная; НП — непатогенная.

Note. P — pathogenic; NP — not pathogenic.

Существуют предположения, что есть вероятность предсказать риск рецидива в ЦНС у пациентов с ДВККЛ на молекулярной основе [5]. Специфические генетические сигнатуры могут быть связаны с вовлечением ЦНС в опухолевый процесс при лимфоме, а их выявление поможет улучшить точность прогноза и обосновать выбор больных для профилактической терапии.

Применение методов секвенирования нового поколения значительно расширило понимание генетического ландшафта всех типов неходжкинских лимфом. В частности, в публикациях, содержащихся в базе PubMed, описаны результаты таргетного, полногеномного и полноэкзомного секвенирования более 2000 образцов системной ДВККЛ и более 150 образцов первичной ДВККЛ ЦНС [18–21].

Ранее мы провели анализ доступных баз данных, в которых содержалась информация о результатах профилирования методами секвенирования нового поколения случаев ДВККЛ с рецидивами в ЦНС. В поле нашего внимания попала C-Bioporlall for cancer

genomics database, в которой содержатся данные о молекулярно-генетическом профиле и клинических характеристиках более 1200 пациентов с ДВККЛ. В ней можно было выделить 355 случаев данной патологии без вовлечения ЦНС и 48 — с рецидивом опухоли в ЦНС [22].

Были проанализированы данные мутационного профиля этих 2 подгрупп ДВККЛ по мутационному ландшафту, определенному методами высокопроизводительного секвенирования. В группе больных с рецидивами ДВККЛ в ЦНС значимое увеличение частоты выявления мутаций по сравнению с группой без вовлечения ЦНС были получены по 5 генам: *MID88*, *PIM1*, *CD79B*, *ARID1A* и *INO80*. Обращала на себя внимание еще одна особенность: мутации в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B* достоверно сочетались друг с другом, тогда как мутации в генах системы ремоделирования хроматина *INO80*, *ARID1A* и *SMARCA4* имели тенденцию к взаимному исключению [1, 9].

Полученные нами в ходе эксперимента с использованием метода высокопроизводительного секвенирования

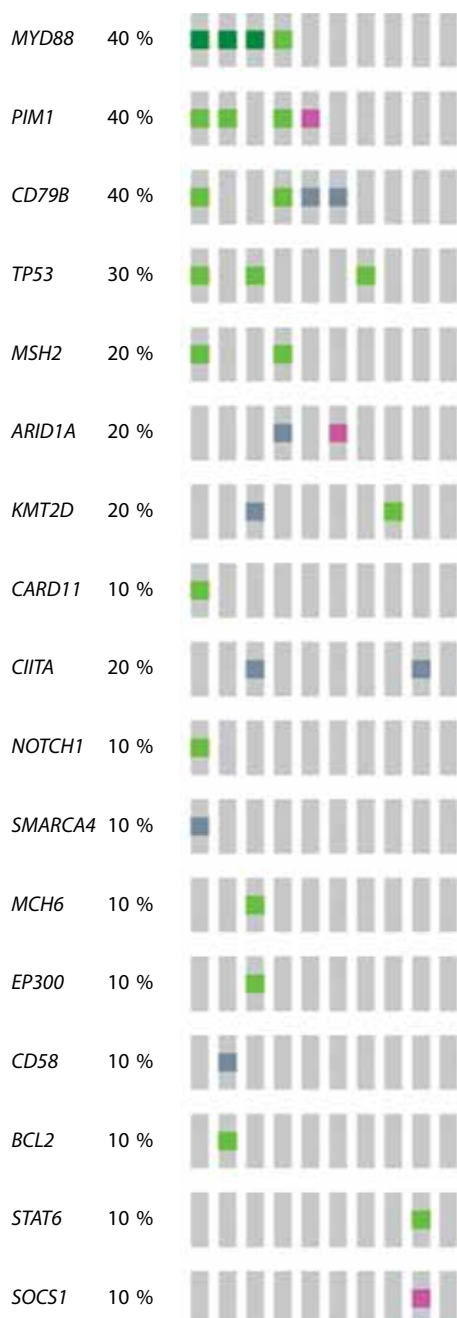


Рис. 2. Совместное выявление и взаимное исключение мутаций в группе исследования: темно-зеленым цветом выделены мутации с доказанным драйверным значением, светло-зеленым — миссенс-замены, серым — приводящие к синтезу усеченного варианта белка мутации, розовым — другие варианты мутаций

Fig. 2. Co-detection and mutual exclusion of mutations in the study group: dark green indicates mutations with a proven driver value, light green indicates missense substitutions, gray indicates mutations leading to the synthesis of a truncated protein variant, pink indicates other mutations

данные по мутационному профилю случаев ДВККЛ с поражением ЦНС в рецидиве в целом подтверждают результаты проведенного ранее анализа CBioPortal for Cancer Genomics database. В частности, отмечено наличие сочетанных мутаций в генах сигнальных путей NF-κB и JAK-STAT у ряда больных. Из 4 находок в *MYD88* 3 были представлены рекуррентной мутаци-

ей 265-го кодона. Мутации в гене *ARID1A* выявлены в 2 исследованных образцах, в гене *SMARCA4* — в 1.

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует о том, что среди ДВККЛ с рецидивом в ЦНС можно выделить по меньшей мере 2 подгруппы случаев. Согласно данным анализа CBioPortal for Cancer Genomics database, к каждой из этих подгрупп можно отнести около 1/3 случаев (37,5 и 31,2 % соответственно).

Первая по спектру мутаций (сочетанные мутации в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B*) близка первичной ДВККЛ ЦНС и соответствует молекулярному подтипу из активированных В-клеток, а точнее варианту MCD, согласно классификации ДВККЛ на основании мутационных профилей и геномных перестроек, предложенной N. Schmitz и соавт. [23], или варианту C5, согласно классификации ДВККЛ на основании мутационных профилей и оценки копийности генов, разработанной В. Chapuy и соавт. [23], каждый из которых ассоциирован с неблагоприятным исходом лимфомы.

Пути патогенеза первичной ДВККЛ ЦНС хорошо изучены и подробно описаны в литературе [24]. Отметим лишь, что ведущую роль в них играет активация транскрипционного фактора NF-κB, основным эффектом которой является аутокринная сигнализация посредством выделяемых провоспалительных цитокинов и цитокиновых рецепторов на поверхности злокачественных лимфоцитов, что способствует выживанию и росту опухолевых клеток [25]. Тот факт, что вариант MCD или молекулярный подтип из активированных В-клеток ассоциированы и с другими локализациями экстранодальных поражений лимфомы (яичко, молочные железы, кожа), позволяет предположить, что риск вовлечения в опухолевый процесс ЦНС при ДВККЛ имеет именно молекулярную основу [3, 26].

Обнаружение во 2-й подгруппе пациентов мутаций в генах системы ремоделирования хроматина (изолированных мутаций в генах *INO80*, *ARID1A* и *SMARCA4*) делает эти случаи схожими с лимфомой Беркитта [27, 28]. Анализ данных литературы за последние несколько лет показал, что среди самых часто мутирующих генов при данной лимфоме 4-е и 5-е места занимают *SMARCA4* и *ARID1A*. При этом лимфома Беркитта является вариантом неходжкинских злокачественных лимфом с очень частым (до 30–35 % случаев) вовлечением в опухолевый процесс ЦНС [27, 29–31].

Кодируемые генами *INO80*, *ARID1A* и *SMARCA4* белки являются ключевыми структурно-функциональными единицами 2 комплексов системы ремоделирования хроматина — SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) и INO80 (Inositol 80). Основная их функция — изменение структуры, состава и расположения нуклеосом для обеспечения посадки транскрипционных факторов, белков системы репарации

ДНК и репликации. Белки, кодируемые *SMARCA4* и *INO80*, являются каталитическими субъединицами и обеспечивают получение энергии аденозинтрифосфата (АТФ) для перемещения комплекса, а *ARID1A* обеспечивает доступность той или иной области генома [32].

Согласно данным литературы, мутации в генах семейств SMARC и ARID действительно возникают взаимоисключающим образом. Связывают это с их функциональной синонимичностью [33]. Кодируемые *ARID1A* и *SMARCA4* субъединицы комплекса SWI/SNF имеют паралоги, которые включаются в состав комплекса ремоделирования хроматина на место мутировавшего белка, что влияет на работу комплекса в целом [16, 34]. В частности, в опухолевых клетках с дефицитом функции *ARID1A* имеет место активация сигнального пути JAK-STAT, усиленная продукция интерлейкина 6 (ИЛ-6) и фактора некроза опухоли α (ФНО- α) [16].

Отдельно следует остановиться на мутациях в гене *TP53*. Известно, что основной его функцией является защита от опухолевого роста с помощью самых различных механизмов. Здесь же отметим, что, помимо прочего, кодируемый *TP53* белок p53 модулирует активность путей передачи сигналов через рецепторы цитокинов. Потеря функции p53 приводит к увеличению фосфорилирования STAT3, который опосредует усиленную аутокринную/паракринную передачу сигналов ИЛ-6. Кроме того, некоторые мутанты p53 могут приобретать новые активности, влияющие на передачу сигналов цитокинов. Напротив, экспрессия мутанта p53 R175H способна усиливать передачу сигналов NF- κ B — фактора транскрипции, реагирующего на провоспалительные сигналы и приводящего к повышению уровня ФНО- α , интерлейкина-1 β , ИЛ-6 и других провоспалительных медиаторов [35].

Кроме того, статус p53 в злокачественных клетках формирует иммунный ландшафт опухоли. Нарушения в p53 не только помогают опухолевым клеткам ускользать от иммунного надзора за счет выраженной генетической нестабильности, но и способствуют созданию иммуносупрессивной среды. Делеции или мутации p53 в опухоли нарушают иммунное распознавание с помощью таких механизмов, как снижение на поверхности опухолевых клеток экспрессии главного комплекса гистосовместимости класса I (major histocompatibility complex class I, МНС-I) и других необходимых для презентации эндогенного антигена молекул [36].

Описано также увеличение экспрессии лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) на поверхности опухолевых клеток при потере активности p53. Происходит это из-за снижения уровня транскрипционной мишени p53 — miR-34a, которая является репрессором экспрессии PD-L1. Посредством нее опухолевые клетки также участвуют в прямом подавлении функции

Т-клеток. Контакт этих лигандов с рецепторами рецептора программируемой клеточной гибели 1 (programmed cell death 1, PD1) на поверхности Т-лимфоцитов приводит к снижению их противоопухолевой активности и гибели [37].

Следует обратить внимание также на тот факт, что в 5/9 изученных нами образцах, помимо мутаций *TP53*, наблюдались нарушения в генах *СИТА* и *CD58*, также имеющих значение в уклонении опухолевых клеток от иммунного надзора.

Так, белок СИТА постоянно экспрессируется в В-клетках и является основным регулятором транскрипции гена главного комплекса гистосовместимости класса II (major histocompatibility complex class II, МНС-II). Функции последнего — связывание пептидных фрагментов, полученных при внутриклеточном расщеплении белковых молекул, и презентация этих пептидов на поверхности клеток для распознавания Т- и НК-клеточными рецепторами. Мутации в гене *СИТА* являются наиболее распространенным механизмом подавления экспрессии МНС-II в опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ, и их наличие коррелирует с уменьшением количества лимфоцитов (в первую очередь Т-клеток), инфильтрирующих опухоль, и плохими исходами заболеваниями [35].

Белок CD58 экспрессируется на поверхности иммунных клеток, в том числе В-лимфоцитов, и участвует в усилении адгезии между ними и Т-лимфоцитами. Этот процесс предшествует взаимодействию рецепторов МНС с Т-клеточными рецепторами и активации Т-клеток. Мутации CD58 являются характерной чертой первично-рефрактерных и рецидивирующих случаев ДВККЛ [38, 39].

В настоящее время становится очевидным, что успешное лечение злокачественных новообразований невозможно без учета их генетических особенностей. В будущем внедрение высокопроизводительного секвенирования в рутинную клиническую диагностику сделает генетическое профилирование опухоли более доступным и предоставит возможность выбора персонализированных комбинаций лекарственных средств и индивидуальных стратегий ведения пациентов [40].

Полученные в ходе анализа C-Bioporlal for cancer genomics database и собственного эксперимента данные о мутационном спектре ДВККЛ с рецидивами в ЦНС позволяют предположить несколько подходов к терапии, направленных на лечение ДВККЛ в момент клинической манифестации рецидива и санацию ЦНС от опухолевых клеток еще на досимптомных этапах. Хорошую терапевтическую мишень для профилактики и лечения ДВККЛ с поражением ЦНС представляет собой *MYD88* p.L265P, поскольку данная рекуррентная мутация приводит к активации киназы, ассоциированной с рецептором интерлейкина 1 (interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK) и Брутон-тирозинкиназы с последующей нисходящей сигнализацией сразу по 2 путям: BCR-NF- κ B и JAK/STAT. При этом

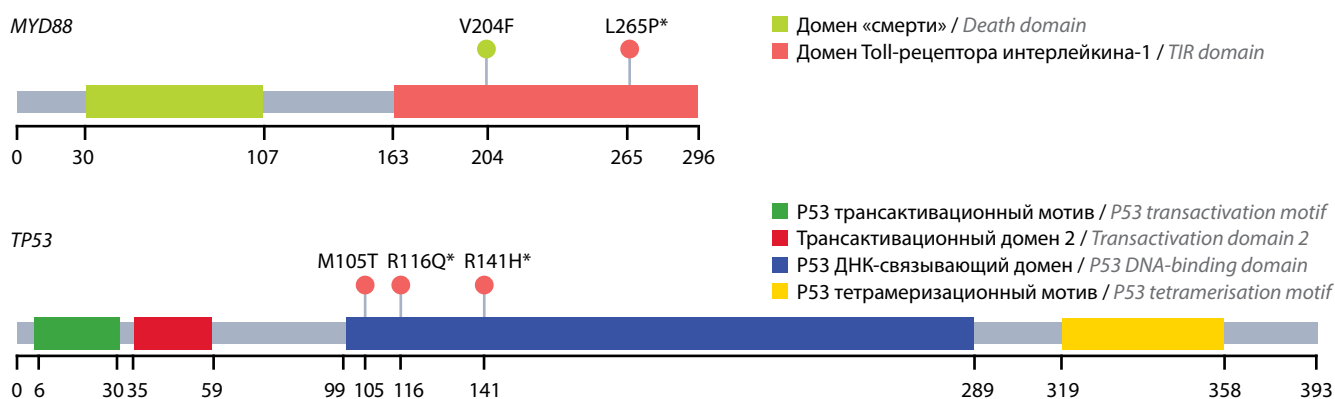


Рис. 3. Распределение мутаций, выявленных в группе исследования, по функциональным доменам генов MYD88 и TP53: красным цветом обозначены патогенные замены, зеленым — непатогенные замены, звездочкой — мутации в «горячих» точках

Fig. 3. Distribution of mutations identified in the study group according to the functional domains of the MYD88 and TP53 genes: pathogenic substitutions are highlighted in red, non-pathogenic substitutions are highlighted in green, mutations in hot spots are marked with an asterisk

забарьерное расположение опухоли требует поиска и применения препаратов, способных преодолевать ГЭБ и создавать в ЦНС терапевтические концентрации [41]. К таковым можно отнести ингибиторы Брутон-тирозинкиназы 1-го (ибрутиниб) [42] и 2-го (тиабрутиниб) [43] поколений.

Отдельное нацеливание на путь JAK-STAT также представляется перспективным, поскольку его ингибирование может оказывать двойное терапевтическое воздействие — на злокачественные клетки и на микроокружение опухоли [44]. Так, селективный ингибитор JAK/STAT руксолитиниб является привлекательной молекулой для изучения в качестве препарата, направленного на лечение ДВККЛ с вовлечением ЦНС, в силу его способности проникать через ГЭБ [45].

К еще одному направлению терапии ДВККЛ с рецидивами в ЦНС можно отнести иммунонаправленную терапию: иммуномодулирующими препаратами (леналидомидом) [46, 47], CD19-направленными CAR-T-клетками (chimeric antigen receptor) [48, 49] и ингибиторами контрольных точек иммунитета (ниволумабом и пембролизумабом) [50, 51].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, несмотря на гетерогенность мутационного профиля ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, в большей части случаев для опухолевых клеток характерны генетические нарушения, приводящие к продукции злокачественными лимфоцитами большого количества провоспалительных цитокинов, а также aberrации, снижающие иммуногенность и способствующие избеганию опухоли иммунного надзора.

С одной стороны, достоверно известно, что высокий уровень провоспалительных цитокинов повышает проницаемость ГЭБ, что может способствовать проникновению опухолевых В-клеток из системного кровотока в ткань мозга. С другой стороны, трансформированные клетки выживают только в соответствующей окружающей среде, а устойчивость к запрограммированной клеточной смерти и способность опухолевых

лимфоидных клеток к пролиферации в большой степени зависят от внешних стимулов [52].

Можно предположить, что на первых этапах выживание лимфомных В-клеток в бедной на ростовые факторы среде ЦНС обеспечивается мутациями, приводящими к активации сигнальных путей JAK-STAT и BCR-NF-κB, и аутокринной стимуляцией через цитокиновые рецепторы. И только позднее посредством секреции провоспалительных цитокинов, хемокинов и/или экзосом опухолевые клетки модулируют свое окружение в нервной ткани, подстраивая его под собственные нужды. Так, результаты недавних экспериментов показали, что экзосомы, полученные из клеток ДВККЛ, с высокой эффективностью могут быть интернализованы макрофагами микроокружения опухоли, что приводит к повышенной продукции такими макрофагами провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, интерлейкина 12 и CXCL10) [36]. Фактически речь идет о возможном механизме перестраивания макрофагов ЦНС (микроглии) на паракринную стимуляцию роста лимфомы.

Само по себе забарьерное расположение клеток лимфомы делает их недоступными для воздействия большего числа препаратов, применяемых для лечения опухоли. Анатомическая и функциональная обособленность ЦНС, обеспечиваемая ГЭБ, также препятствует полноценному функционированию иммунной системы в нервной ткани [53]. Не менее важным для развития ДВККЛ в ЦНС представляется и избегание лимфомными клетками иммунного надзора, что может быть вызвано как генетическими нарушениями в механизмах презентации антигена, так и прямым подавлением иммунитета путем экспрессии иммуносупрессивных молекул.

Таким образом, иммунонаправленная терапия и нацеливание на сигнальные каскады BCR-NF-κB и JAK-STAT являются наиболее перспективными направлениями лечения ДВККЛ в момент клинической манифестации рецидива и санации ЦНС от опухолевых клеток еще на досимптомных этапах.

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

1. Воропаева Е.Н., Пospelova Т.И., Максимов В.Н. и др. Мутации в генах *ARID1A* и *SMARCA4* при рецидивах диффузной В-крупноклеточной лимфомы с поражением ЦНС. Медицинская генетика 2020;19(6):90–2. DOI: 10.25557/2073-7998.2020.06.90-92
2. Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Maximov V.N. et al. Mutations in the *ARID1A* and *SMARCA4* genes in relapses of diffuse large B-cell lymphoma with CNS damage. Medicinskaya genetika = Medical genetics 2020;19(6):90–2. (In Russ.). DOI: 10.25557/2073-7998.2020.06.90-92
3. Savage K.J. Secondary CNS relapse in diffuse large B-cell lymphoma: defining high-risk patients and optimization of prophylaxis strategies. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2017;2017(1):578–86. DOI: 10.1182/asheducation-2017.1.578
4. Ollila T.A., Olszewski A.J. Extranodal diffuse large B cell Lymphoma: molecular features, prognosis, and risk of central nervous system recurrence. Curr Treat Options Oncol 2018;19(8):38. DOI: 10.1007/s11864-018-0555-8
5. Grimm K.E., O'Malley D.P. Aggressive B cell lymphomas in the 2017 revised WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Ann Diagn Pathol 2019;38:6–10. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2018.09.014
6. Illerhaus G. CNS relapse in DLBCL: a calculable risk? Blood 2021;137(8):1011–2. DOI: 10.1182/blood.202009269
7. Hall K.H., Panjic E.H., Valla K. et al. How to decide which DLBCL patients should receive CNS prophylaxis. Oncology (Williston Park) 2018;32(6):303–9.
8. Ma'koseh M., Tamimi F., Abufara A. et al. Impact of Central Nervous System International Prognostic Index on the treatment of diffuse large B cell lymphoma. Cureus 2021;13(8):e16802. DOI: 10.7759/cureus.16802
9. Nagpal S., Glantz M.J. Treatment and prevention of secondary CNS lymphoma. Semin Neurol 2010;30(3):263–72. DOI: 10.1055/s-0030-1255222
10. Voropaeva E., Beresina O., Pospelova T. et al. Mutational profile of diffuse large B-cell lymphoma with central nervous system relapse: analysis of CBioPortal for Cancer Genomics database. 2020 Cognitive Sciences, Genomics and Bioinformatics (CSGB) 2020:190–4. DOI: 10.1109/CSGB51356.2020.9214638.
11. NGS WIZARD by Genomenal. Доступно по: <https://www.genomenal.ru/>; NGS WIZARD by Genomenal. (In Russ.). Available at: <https://www.genomenal.ru/>.
12. Gao J., Aksoy B.A., Dogrusoz U. et al. Integrative analysis of complex cancer Genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal 2013;6(269):p11. DOI: 10.1126/scisignal.2004088.
13. Jay J.J., Brouwer C. Lollipops in the clinic: information dense mutation plots for precision medicine. PLoS One 2016;11(8):e0160519. DOI: 10.1371/journal.pone.0160519
14. Salem M.E., Bodor J.N., Puccini A. et al. Relationship between MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6 gene-specific alterations and tumor mutational burden in 1057 microsatellite instability-high solid tumors. Int J Cancer 2020;147(10):2948–56. DOI: 10.1002/ijc.33115
15. Ortega-Molina A., Boss I., Canela A. et al. The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. Nat Med 2015;21:1199–208. DOI: 10.1038/nm.3943. DOI: 10.1038/nm.3943
16. Garbati M.R., Thompson R.C., Haery L., Gilmore T.D. A rearranged EP300 gene in the human B-cell lymphoma cell line RC-K8 encodes a disabled transcriptional co-activator that contributes to cell growth and oncogenicity. Cancer Letters 2011;302:76–83. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.12.018
17. Hu B., Lin J.-Z., Yang X.-B., Sang X.-T. The roles of mutated SWI/SNF complexes in the initiation and development of hepatocellular carcinoma and its regulatory effect on the immune system: A review. Cell Proliferation 2020;00:e12791. DOI: 10.1111/cpr.12791
18. Schmitz N., Nickelsen M., Savage K.J. Central nervous system prophylaxis for aggressive B-cell lymphoma: who, what, and when? Hematol Oncol Clin North Am 2016;30:1277–91. DOI: 10.1016/j.hoc.2016.07.008
19. Karube K., Enjuanes A. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. Leukemia 2018;32(3):675–84. DOI: 10.1038/leu.2017.251
20. Schmitz R., Wright G.W. Genetics and pathogenesis of diffuse large B-Cell lymphoma. N Engl J Med 2018;378(15):1396–407. DOI: 10.1056/NEJMoa1801445
21. Jardin F. Next generation sequencing and the management of diffuse large B-cell lymphoma: from whole exome analysis to targeted therapy. Discov Med 2014;18(97):51–65.
22. Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Voevoda M.I., Maksimov V.N. Frequency, spectrum and the functional significance of mutations in TP53 gene in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Mol Biol (Mosk) 2017;51(1):64v72. DOI: 10.7868/S0026898416060227
23. cBioPortal for Cancer Genomics. Available at: <https://www.cbioportal.org/>.
24. Chapuy B., Stewart C., Dunford A.J. et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. Nat Med 2018;24:679–90. DOI: 10.1038/s41591-018-0016-8
25. Lauw M.I.S., Lucas C.-H.G., Ohgami R.S., Wen K.W. Primary central nervous system lymphomas: a diagnostic overview of key histomorphologic, immunophenotypic, and genetic features. Diagnostics (Basel) 2020;10(12):1076. DOI: 10.3390/diagnostics10121076
26. deGroen R.A.L., Schrader A.M.R., Kersten M.J. et al. MYD88 in the driver's seat of B-cell lymphomagenesis: from molecular mechanisms to clinical implications. Haematologica 2019;104(12):2337–48. DOI: 10.3324/haematol.2019.227272
27. Wright G.W., Huang D.W., Phelan J.D. et al. A probabilistic classification tool for genetic subtypes of diffuse large B cell lymphoma with therapeutic implications. Cancer Cell 2020;37(4):551–68 e514. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.015
28. Wägener R., Seufert J. The mutational landscape of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration is distinct from that of Burkitt lymphoma. Blood 2019;133(9):962–6. DOI: 10.1182/blood-2018-07-864025
29. Smith M.C., Kressin M.K., Crawford E. et al. B lymphoblastic leukemia with a novel t(11;15) (q23;q15) and unique Burkittoid morphologic and immunophenotypic findings in a 9-year-old boy. Lab Med Fall 2015;46(4):320–6. DOI: 10.1309/LM0BOC84GSQGHYKD
30. Greenough A., Dave S.S. New clues to the molecular pathogenesis of Burkitt lymphoma revealed through next-generation sequencing. Curr Opin Hematol 2014;21(4):326–32. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000059
31. Giulino-Roth L., Wang K. Targeted genomic sequencing of pediatric Burkitt lymphoma identifies recurrent alterations in antiapoptotic and chromatin-remodeling genes. Blood 2012;120(26):5181–4. DOI: 10.1182/blood-2012-06-437624.
32. Love C., Sun Z., Jima D. et al. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. Nat Genet 2012;44(12):1321–5. DOI: 10.1038/ng.2468
33. Helming K.C., Wang X. Vulnerabilities of mutant SWI/SNF complexes in cancer. Cancer Cell 2014;26(3):309–17. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.07.018

33. Bögershausen N., Wollnik B. Mutational landscapes and phenotypic spectrum of SWI/SNF-related intellectual disability disorders. *Front Mol Neurosci* 2018;11:252. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00252
34. Dhodapkar M.V. Navigating the Fas lane to improved cellular therapy for cancer. *J Clin Invest* 2019;129(4):1522–3. DOI: 10.1172/JCI127581
35. Rimsza L.M., Roberts R.A., Campo E. et al. Loss of major histocompatibility class II expression in non-immune privileged site diffuse large B cell lymphoma is highly coordinated and not due to chromosomal deletions. *Blood* 2006;107:1101–7. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1510
36. Blagih J., Buck M.D. p53, cancer and the immune response. *J Cell Sci* 2020;133(5):jcs237453. DOI: 10.1242/jcs.237453
37. Cortez M.A., Ivan C., Valdecanas D. et al. PDL1 regulation by p53 via miR-34. *J Natl Cancer Inst* 2016;108:djv303. DOI: 10.1093/jnci/djv303
38. Broséus J., Chen G., Valdecanas D. et al. Relapsed diffuse large B-cell lymphoma present different genomic profiles between early and late relapses. *Oncotarget* 2016;7(51):83987–4002. DOI: 10.18632/oncotarget.9793
39. Lee B., Lee H., Cho J. et al. Mutational profile and clonal evolution of relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Front Oncol* 2021;11:628807. DOI: 10.3389/fonc.2021.628807
40. Coccato N., Anelli L., Zagaria A. et al. Molecular complexity of diffuse large B-cell lymphoma: can it be a roadmap for precision medicine? *Cancers* 2020;12(1):185. DOI: 10.3390/cancers12010185
41. Angeli E., Nguyen T.T., Janin A. et al. How to make anticancer drugs cross the blood-brain barrier to treat brain metastases. *Int J Mol Sci* 2019;21(1):22. DOI: 10.3390/ijms21010022
42. Tsang M., Rubenstein J.L., Rubenstein J.L. Primary central nervous system lymphoma in older adults and the rationale for maintenance strategies: a narrative review. *Ann Lymphoma* 2021;5:25. DOI: 10.21037/aol-20-43
43. Mukasa A. Genome medicine for brain tumors: current status and future perspectives. *Neurol Med Chir* 2020;60(11):531–42. DOI: 10.2176/nmc.ra.2020-0175
44. Haile W.B., Gavegnano C., Tao S. et al. The Janus kinase inhibitor ruxolitinib reduces HIV replication in human macrophages and ameliorates HIV encephalitis in a murine model. *Neurobiol Dis* 2016;92(Pt. B):137–43. DOI: 10.1016/j.nbd.2016.02.007
45. Annese T., Tamma R., De Giorgis M. et al. RNAscope dual ISH-IHC technology to study angiogenesis in diffuse large B-cell lymphomas. *Histochem Cell Biol* 2020;153(3):185–92. DOI: 10.1007/s00418-019-01834-z
46. Rubenstein J.L., Geng H., Fraser E.J. et al. Phase 1 investigation of lenalidomide/rituximab plus outcomes of lenalidomide maintenance in relapsed CNS lymphoma. *Blood Adv* 2018;2(13):1595–607. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017014845
47. Ghesquieres H., Chevrier M., Laadhari M. et al. Lenalidomide in combination with intravenous rituximab (REVRI) in relapsed/refractory primary CNS lymphoma or primary intraocular lymphoma: a multicenter prospective 'proof of concept' phase II study of the French Oculo-Cerebral lymphoma (LOC) Network and the Lymphoma Study Association (LYSA). *Ann Oncol* 2019;30(4):621–8. DOI: 10.1093/annonc/mdz032
48. De Groen R.A.L., Schrader A.M.R., Kersten M.J. et al. MYD88 in the driver's seat of B-cell lymphomagenesis: from molecular mechanisms to clinical implications. *Vermaat Haematologica* 2019;104(12):2337–48. DOI: 10.1093/annonc/mdz032
49. Wudhikarn K., Pennisi M., Garcia-Recio M. et al. DLBCL patients treated with CD19 CAR T cells experience a high burden of organ toxicities but low nonrelapse mortality. *Blood Adv* 2020;4(13):3024–33. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020001972
50. Nayak L., Iwamoto F.M., LaCasce A. et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed/refractory primary central nervous system and testicular lymphoma. *Blood* 2017;129(23):3071–3. DOI: 10.1182/blood-2017-01-764209
51. Grommes C., Nayak L., Tun H.W., Batchelor T.T. Introduction of novel agents in the treatment of primary CNS lymphoma. *Neuro Oncol* 2019;21(3):306–13. DOI: 10.1093/neuonc/noy193
52. Wellenstein M.D., de Visser K.E. Cancer-cell-intrinsic mechanisms shaping the tumor immune landscape. *Immunity* 2018;48(3):399–416. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.03.004
53. Яшин К.С., Медяник И.А. Иммуноterapia злокачественных опухолей головного мозга (обзор). *СТМ* 2014;6(4):189–200. Yashin K.S., Medyanik I.A. Immunotherapy of malignant brain tumors (review). *STM = Modern Technologies in Medicine* 2014;6(4):189–200. (In Russ.).

Благодарность. Авторы выражают благодарность Штокало Дмитрию Николаевичу за поддержку биоинформационной обработки данных высокопроизводительного секвенирования.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to Dmitry N. Shtokalo for supporting bioinformatic processing of high-performance sequencing data.

Вклад авторов

Е.Н. Воропаева: разработка концепции и дизайна исследования, выполнение секвенирования образцов, анализ и интерпретация данных, написание черновика варианта текста статьи, окончательное одобрение статьи;

Т.И. Поспелова: внесение дополнений в дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, научное редактирование;

В.С. Карпова: сбор и анализ клинических данных, статистический анализ, анализ и интерпретация данных, научное редактирование;

М.И. Чуркина, Т.А. Агеева: сбор биологического материала, обзор публикаций по теме статьи, научное редактирование;

Ю.В. Вяткин: биоинформационный анализ полученных данных, научное редактирование;

В.Н. Максимов: обзор публикаций по теме статьи, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи, научное редактирование.

Authors' contribution

E.N. Voropaeva: development of the concept and design of the study, sequencing of samples, analysis and interpretation of data, writing a draft version of the text of the article, final approval of the article;

T.I. Pospelova: making additions to the research design, data analysis and interpretation, scientific editing;

V.S. Karpova: collection and analysis of clinical data, statistical analysis, analysis and interpretation of data, scientific editing;

M.I. Churkina, T.A. Ageeva: collection of biological material, review of publications on the topic of the article, scientific editing;

Yu.V. Vyatkin: bioinformatic analysis of the data obtained, scientific editing;

V.N. Maksimov: review of publications on the topic of the article, analysis and interpretation of data, scientific editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.Н. Воропаева / E.N. Voropaeva: <http://orcid.org/0000-0001-7542-7285>

Т.И. Поспелова / T.I. Pospelova: <http://orcid.org/0000-0002-1261-547>

В.С. Карпова / V.S. Karpova: <http://orcid.org/0000-0001-6887-3172>

М.И. Чуркина / M.I. Churkina: <http://orcid.org/0000-0002-1301-5944>

Т.А. Агеева / T.A. Ageeva: <http://orcid.org/0000-0001-7933-8394>

В.Н. Максимов / V.N. Maksimov: <http://orcid.org/0000-0002-7165-4496>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ молодым ученым МД-2706.2019.7. Работа выполнена в рамках бюджетной темы по Государственному заданию № АААА-А17-117112850280-2.

Funding. The work was performed with the financial support of the grant of the President of the Russian Federation to young scientists MD-2706.2019.7. The work was carried out within the framework of the budget topic under the State task No. ААААА-А17-117112850280-2.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен Комитетом по этике ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The local ethics committee of the Novosibirsk State Medical University, Ministry of Health of Russia, Ministry of Health of Russia approved the protocol of the study.

All patients signed an informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 16.02.2022. **Принята к публикации:** 11.06.2022.

Article submitted: 16.02.2022. **Accepted for publication:** 11.06.2022.



К 95-летию профессора Н.В. МЯСИЩЕВОЙ

To the 95th anniversary of Professor N.V. MYASISHCHEVA

19 августа 2022 г. исполнилось 95 лет доктору медицинских наук, профессору Нине Владимировне Мясичевой – выдающемуся ученому в области патофизиологии и биохимии злокачественного роста.

Н.В. Мясичева родилась 19 августа 1927 г. в Ленинграде в семье известного отечественного психиатра, медицинского психолога, основателя ленинградской школы психотерапии Владимира Николаевича Мясичева.

После возвращения из эвакуации в постблокадный Ленинград Нина Владимировна поступает в 1-й Ленинградский медицинский институт им. И.П. Павлова, который успешно заканчивает в 1951 г. По направлению Министерства здравоохранения работает врачом-хирургом областной больницы Тамбова, затем врачом общей практики в отдаленном районе Тамбовской области. Позднее, в период прохождения клинической ординатуры Ленинградского научно-исследовательского института гематологии и переливания крови, совмещает практическую деятельность в клинике с научными исследованиями: активно участвует в городских конференциях молодых хирургов с научными и экспериментальными докладами, которые были отмечены почетной грамотой Хирургического общества Н.И. Пирогова. По окончании клинической ординатуры в Ленинградском научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови в 1957 г. Нина Владимировна начинает свою

научную деятельность и на базе Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова в 1960 г. защищает кандидатскую диссертацию на тему «Содержание витамина В₁₂ в крови здоровых людей и при некоторых гематологических и хирургических заболеваниях», а в 1973 г. в Институте экспериментальной и клинической онкологии (предшественнике Онкологического центра на Каширке) – диссертацию «Характеристика обмена соединений В₁₂ (кобаламинов) при лейкозах» на соискание ученой степени доктора медицинских наук.

В 1981 г. на базе лаборатории эндогенных канцерогенов, руководимой профессором М.О. Раушенбахом, Нина Владимировна Мясичева создает новое структурное подразделение Научно-исследовательского института канцерогенеза Всесоюзного онкологического научного центра АМН СССР – лабораторию эндогенных модифицирующих факторов канцерогенеза – и остается ее бессменным руководителем в течение 27 лет (с 1981 по 2008 г.).

Под руководством Н.В. Мясичевой исследованы механизмы модифицирующего действия кобаламиновых коферментов в процессах опухолевого роста и химическом канцерогенезе, разработан принципиально новый подход в химио-

терапии опухолей с использованием кобаламинзависимой метионинсинтетазы для повышения эффективности противоопухолевых метаболитов. Были разработаны и внедрены в практику оригинальный метод количественного анализа кобаламинов в сыворотке крови и лейкозных клетках, радиоизотопный метод определения поверхностных рецепторов лейкозных клеток к транскобаламину плазмы крови человека. Впервые исследованы механизмы нарушенного обмена кобаламинов у детей с острым лейкозом и разработаны практические рекомендации для выявления путей метаболической коррекции.

Дальнейшие исследования лаборатории Н.В. Мясичевой были сфокусированы на изучении особенностей биосинтеза в нормальных и опухолевых тканях эйкозаноидов каскада арахидоновой кислоты, которые являются мощной системой локальных химических медиаторов и играют большую роль во всех ключевых событиях канцерогенеза. Особое внимание в исследованиях уделялось изучению сопряженного действия эйкозаноидов с медиаторами межклеточных взаимодействий – гликозаминогликанами и факторами роста в злокачественных опухолях разного гистогенеза. Работы Н.В. Мясичевой

поставили ее в один ряд с выдающимися отечественными онкологами и, несмотря на прошедшие годы, во многом остаются актуальными и сегодня.

Профессор Н.В. Мясичева – автор более 100 научных работ, опубликованных в отечественных и зарубежных изданиях, 2 монографий. Большое внимание Нина Владимировна уделяла подготовке кадров; под ее руководством защищены 3 докторские и 8 кандидатских дис-

сертаций. Н.В. Мясичева работала в научных лабораториях Швеции, Англии и США по программе международного сотрудничества Онкологического научного центра РАМН.

За теоретическое обоснование, экспериментальную разработку и внедрение в клиническую практику анализа нового типа рецепторов поверхностной мембраны лейкоэмических клеток к трансобаламину II сыворотки крови у детей с острым лейкозом в 1988 г. на выставке «Наука – здра-

воохранению» Нина Владимировна награждена Золотой медалью ВДНХ СССР. В 2002 г. Н.В. Мясичевой присвоено почетное звание «Заслуженный работник здравоохранения Российской Федерации».

Нина Владимировна пользовалась огромным уважением коллег. Сотрудники ее лаборатории с благодарностью вспоминают своего руководителя как доброго, мудрого, принципиального и справедливого человека.

В день Вашего юбилея, дорогая Нина Владимировна, коллектив Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, редакция журнала «Успехи молекулярной онкологии», Ваши друзья и коллеги сердечно поздравляют Вас с этим событием и желают Вам крепкого здоровья и активного долголетия!

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. **Бланк сопроводительного письма** (заполненный, подписанный всеми авторами, с подписью руководителя и круглой печатью учреждения) отсканировать и загрузить как дополнительный файл при подаче рукописи в редакцию (в формате *.pdf или *.jpg). Файл назвать «... (фамилия, инициалы) первого автора. Сопроводительное письмо». Для каждой указанной в рукописи организации необходимо представить отдельное сопроводительное письмо.

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 подрисуночными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита — «а», «б» и т. д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т. д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подрисуночной подписи. Подписи к рисункам даются на 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, полимерная 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.