

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Молекулярные биомаркеры
колоректального рака*

*Вирус Эпштейна–Барр и механизмы
молекулярного канцерогенеза*

*Роль пролина P325 в распознавании
эпитопа MX35 натрийзависимого
фосфатного транспортера NaPi2b*

*Влияние ингибитора обратной
транскриптазы эфавиренза на
повторы LINE1 и генетическую
нестабильность в клетках ОМЛ in vitro*

*Подкожный ксенографт меланомы
человека с экспрессией CD20*



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 .

2 **ТОМ 12**
'25

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

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

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

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

Выпускающий редактор

И.В. Пучкова

Корректор Е.С. Самойлова

Дизайн: Е.В. Степанова

Верстка: Е.В. Степанова

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

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

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

ISSN 2313-805X (Print)
ISSN 2413-3787 (Online)
Успехи молекулярной онкологии.
2025. Том 12. № 2. 1–124.

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

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562.

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

Тираж 1000 экз. Бесплатно.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Красильников Михаил Александрович, д.б.н., профессор, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза (НИИ канцерогенеза) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующий отделом экспериментальной биологии опухолей (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Боженко Владимир Константинович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории биохимии отдела патоморфологии и лабораторной диагностики, ФГБУ «Российский научный центр 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 Аида Фуадовна, д.б.н., главный научный консультант лаборатории генетики опухолевых клеток отдела молекулярной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Щербачев Александр Михайлович, заведующий лабораторией онкопротеомики отдела экспериментальной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



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

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

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC AND PRACTICAL JOURNAL

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

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

FOUNDED IN 2014

2 VOL. 12
'25

Founders:

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

Publisher

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

Editorial Office:

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

E-mail: abv@abvpress.ru

www.abvpress.ru

Article submission:

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

Managing editor I.V. Puchkova
Proofreader E.S. Samoylova

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

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

*The journal was registered at the Federal
Service for Surveillance of Communications,
Information Technologies, and Mass Media
(ITI No. ФЦ77-57560 dated 08 April 2014).*

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

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

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

Uspekhi molekulyarnoy onkologii.
2025. Vol. 12 No. 2. 1–124.

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

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

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

EXECUTIVE EDITOR

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

EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Общие правила

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

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

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

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

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

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

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

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

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

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

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

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

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

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

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

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

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

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

7. Иллюстративный материал

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

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

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

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

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

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

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

9. Список литературы

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

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

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

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

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

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

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

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

Общие положения:

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

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

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

<i>А.Д. Шахматова, Е.Д. Мирлина, Г.М. Бутрович, О.А. Вострюхина, В.Н. Вербенко</i> Прогностические и предиктивные молекулярные биомаркеры колоректального рака	8
<i>А.Д. Молчанов, А.С. Васильева, К.В. Смирнова, М.В. Немцова</i> Вирус Эпштейна—Барр и механизмы молекулярного канцерогенеза	22
<i>Л.Н. Любченко, С.В. Мухтарулина, М.А. Мешкова, З.А. Сидакова, Н.Н. Волченко, Е.Г. Новикова</i> Молекулярно-генетическая классификация рака эндометрия в контексте персонализированной медицины	35
<i>М.Е. Мельников, С.А. Кулева, Г.В. Кондратьев, М.М. Васильева, О.Е. Савельева</i> Механизмы цитотоксичности пассивной анти-GD2-иммунотерапии при опухолях детского возраста	47
<i>В.Е. Шевченко, Т.И. Кушнир, М.В. Гудкова, Н.Е. Арноцкая</i> Детерминанты ферроптоза — потенциальные предикторы и терапевтические мишени для острого миелоидного лейкоза	58

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>И.Н. Михайлова, Е.М. Трещалина, С.Ш. Каршиева, Д.А. Хоченков, Н.В. Андропова, И.Ж. Шубина, М.В. Киселевский</i> Подкожный ксенографт меланомы человека MelCher5k/<i>BRAF</i>⁺ с экспрессией CD20	68
<i>Л.Ф. Булатова, И.А. Слidyuk, А.В. Килунов, В.С. Скрипова, Р.Г. Киямова</i> Роль остатка пролина P325 в распознавании эпитопа MX35 натрийзависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках карциномы яичника	77
<i>Х.М. Магомедова, И.А. Антонова, М.С. Стрелков, В.А. Нуртдинова, В.Т. Чещевик, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, О.А. Власова</i> Влияние ингибитора обратной транскриптазы эфавиренза на индуцированную 5-азациитидином экспрессию длинных диспергированных повторов LINE1 и генетическую нестабильность в клетках острого миелоидного лейкоза	89
<i>И.Р. Мягдиева, Т.В. Абакумова, Д.Р. Долгова, О.Ю. Горшков, Т.П. Генинг, Р.Ш. Зайнеева, С.А. Тимофеева</i> Динамика субпопуляций циркулирующих нейтрофилов CD15CD66b и CD62LCD63 у пациентов с доброкачественными новообразованиями почки и с прогрессированием рака почки	104
<i>Е.Ю. Златник, С.Ю. Филиппова, Я.С. Енин, Т.В. Чембарова, Ф.Ф. Амирджанов, О.Н. Буров, А.Д. Загребаев, К.А. Онасенко, Ю.В. Дзигунова</i> Потенциальная противоопухолевая активность нового алкалоида растительного происхождения, выделенного из <i>Petasites hybridus</i> (L.), <i>in silico</i> и <i>in vitro</i>	112

REVIEWS

<i>A.D. Shakhmatova, E.D. Mirlina, G.M. Butrovich, O.A. Vostriukhina, V.N. Verbenko</i> Prognostic and predictive molecular biomarkers of colorectal cancer	8
<i>A.D. Molchanov, A.S. Vasilyeva, K.V. Smirnova, M.V. Nemtsova</i> Epstein–Barr virus and mechanisms of molecular carcinogenesis	22
<i>L.N. Lyubchenko, S.V. Mukhtarulina, M.A. Meshkova, Z.A. Sidakova, N.N. Volchenko, E.G. Novikova</i> Molecular genetic classification of endometrial cancer in the context of personalised medicine	35
<i>M.E. Melnikov, S.A. Kulyova, G.V. Kondratiev, M.M. Vasilyeva, O.E. Savelieva</i> Cytotoxicity mechanisms of passive anti-GD2 immunotherapy in pediatric tumors	47
<i>V.E. Shevchenko, T.I. Kushnir, M.V. Gudkova, N.E. Arnotskaya</i> Ferroptosis determinants – potential predictors and therapeutic targets for acute myeloid leukemia	58

EXPERIMENTAL REPORTS

<i>I.N. Mikhaylova, H.M. Treshalina, S.Sh. Karshieva, D.A. Khochenkov, N.V. Andronova, I.Zh. Shubina, M.V. Kiselevskiy</i> MelCher5k/<i>BRAF</i>⁺ subcutaneous human melanoma xenograft with CD20 expression	68
<i>L.F. Bulatova, I.A. Slidzduk, A.V. Kilunov, V.S. Skripova, R.G. Kiyamova</i> The role of proline P325 residue in the recognition of the MX35 epitope of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies in ovarian carcinoma cells.	77
<i>K.M. Magomedova, I.A. Antonova, M.S. Strelkov, V.A. Nurtdinova, V.T. Cheshchevik, K.I. Kirsanov, G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, O.A. Vlasova</i> Effect of the reverse transcriptase inhibitor efavirenz on 5-azacytidine-induced LINE1 long interspersed repeat expression and genetic instability in acute myeloid leukemia cells	89
<i>I.R. Myagdieva, T.V. Abakumova, D.R. Dolgova, O.Yu. Gorshkov, T.P. Gening, R.Sh. Zaineeva, S.A. Timofeeva</i> Dynamics of subpopulations of CD15⁺CD66b⁺ and CD62L⁺CD63⁺ circulating neutrophils in patients with benign neoplasms and progression of kidney cancer	104
<i>E.Yu. Zlatnik, S.Yu. Filippova, Ya.S. Enin, T.V. Chembarova, F.F. Amirdzhanov, O.N. Burov, A.D. Zagrebaev, K.A. Onasenko, Yu.V. Dzigunova</i> Potential antitumor activity of a new plant-derived alkaloid isolated from <i>Petasites hybridus</i> (L.), <i>in silico</i> and <i>in vitro</i>	112

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-8-21>

Прогностические и предиктивные молекулярные биомаркеры колоректального рака

А.Д. Шахматова, Е.Д. Мирлина, Г.М. Бутрович, О.А. Вострюхина, В.Н. Вербенко*ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; Россия, 188300 Гатчина, мкр. Орлова роща, 1***Контакты:** Валерий Николаевич Вербенко verbenko_vn@pnpi.nrcki.ru

Поиск и применение генетических прогностических и предиктивных биомаркеров колоректального рака (КРР) направлены на выявление особенностей колоректальных опухолей для выбора стратегии терапии. В статье обобщены результаты научных и клинических исследований по этой теме.

Цель работы – проанализировать и обобщить мировую практику использования генетических и эпигенетических изменений в качестве прогностических и предсказательных биомаркеров при инициации и прогрессировании КРР. В статье проанализированы данные исследований, опубликованных в российских и международных базах данных научного цитирования: РИНЦ (Российский индекс научного цитирования), Medline и PubMed. Рассмотрены основные фенотипы патогенеза КРР, а также их возможные функциональные пересечения при развитии заболевания. Также проанализированы уже используемые в мировой клинической практике и потенциальные, перспективные биомаркеры, в том числе экспрессия генов, для выявления подгрупп пациентов повышенного онкологического риска на ранних стадиях КРР. С позиции персонализированной медицины в качестве нового подхода к диагностике и прогнозу в качестве биомаркеров рассматриваются дериваты опухоли в биологических средах, выявляемые при жидкостной биопсии: циркулирующие опухолевые клетки, циркулирующие ДНК, микроРНК, длинные некодирующие РНК. Выявлено, что совместное использование биомаркеров позволяет улучшить прогноз и выбрать оптимальное терапевтическое воздействие. Результаты анализа данных литературы подтверждают, что современные методы генетического анализа вносят значимый вклад в понимание молекулярных механизмов прогрессирования КРР и его устойчивости к противоопухолевой терапии, что облегчает выбор наиболее правильной стратегии лечения. Для оценки потенциала отдельных биомаркеров или биомаркерных панелей КРР необходимы крупномасштабные стандартизированные исследования и проверка этих биомаркеров в рамках проспективных международных программ.

Ключевые слова: генетический биомаркер, эпигенетический биомаркер, колоректальный рак, молекулярный патогенез, жидкостная биопсия, панель экспрессии генов, противоопухолевая терапия

Для цитирования: Шахматова А.Д., Мирлина Е.Д., Бутрович Г.М. и др. Прогностические и предиктивные молекулярные биомаркеры колоректального рака. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(2):8–21.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-8-21>

Prognostic and predictive molecular biomarkers of colorectal cancer

A.D. Shakhmatova, E.D. Mirlina, G.M. Butrovich, O.A. Vostriukhina, V.N. Verbenko*Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Center “Kurchatov Institute”; 1 Orlova Roshcha Microdistrict, Gatchina 188300, Russia***Contacts:** Valery Nikolaevich Verbenko verbenko_vn@pnpi.nrcki.ru

The search and application of genetic prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer (CRC) are aimed at identifying the characteristics of colorectal tumors for choosing a therapy strategy. The review is devoted to summarizing the achievements in scientific and clinical research on this topic.

Aim. Based on genetic and epigenetic changes in CRC to analyze and summarize the world practice of using them as prognostic and predictive biomarkers of CRC to assess the patient's prognosis and response to therapy.

The analysis of modern literature data published in leading peer-reviewed journals in the Russian and international databases of scientific citation RSCI (Russian Science Citation Index), Medline and PubMed is carried out. The main phenotypes of the CRC pathogenesis are considered, as well as their possible functional intersections during the development of the disease. Both biomarkers already used in global clinical practice and potential promising biomarkers, including

gene expression, are analyzed to identify subgroups of patients with high cancer risk at early stages of CRC. As a new approach from the perspective of personalized medicine, a set of tumor derivatives in biological media detected by liquid biopsy: circulating tumor cells, circulating DNA, microRNAs, and long non-coding RNAs is considered as biomarkers. It is noted that the joint use of biomarkers makes it possible to improve the prognosis and selection of therapeutic effects. A review of the literature confirms that modern methods of genetic analysis make a significant contribution to understanding the molecular mechanisms of CRC progression and resistance to antitumor therapy, thereby facilitating the selection of the most appropriate treatment strategy. To assess the potential of individual CRC biomarkers or biomarker panels, large-scale standardized studies and verification of these biomarkers in prospective international programs are necessary.

Keywords: genetic biomarker, epigenetic biomarker, colorectal cancer, molecular pathogenesis, liquid biopsy, gene expression panel, antitumor therapy

For citation: Shakhmatova A.D., Mirlina E.D., Butrovich G.M. et al. Prognostic and predictive molecular biomarkers of colorectal cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = Advances in Molecular Oncology 2025;12(2):8–21. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-8-21>

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний. Смертность от данной патологии составляет 10–13 % от общей смертности, связанной со злокачественными опухолями. Это обусловлено, прежде всего, тем, что большинство случаев КРР (около 60 %) выявляют на поздних стадиях из-за бессимптомного протекания заболевания на начальном этапе, а выживаемость больных коррелирует со стадией заболевания. Очевидно, что после установления диагноза выбрать оптимальную схему лечения может помочь анализ прогностических и предиктивных биомаркеров. Прогностические биомаркеры предоставляют информацию о вероятных исходе и прогнозе заболевания, в значительной степени независимо от специфического лечения. Предиктивные биомаркеры указывают на чувствительность или резистентность опухоли к терапии и позволяют оптимизировать ее схему.

Основным клиническим критерием прогноза при КРР по-прежнему является международная система стадирования опухолевого процесса Tumor Nodus and Metastasis (TNM), хотя в соответствии с ней некоторые пациенты могут получать недостаточное или, наоборот, избыточное лечение вследствие различных вариантов молекулярного патогенеза заболевания. В 8-е издание TNM (2017) введено молекулярное профилирование опухолей желудочно-кишечного тракта: в качестве дополнительных прогностических биомаркеров предложены микросателлитная нестабильность (microsatellite instability, MSI) и мутации в генах *KRAS* и *BRAF* [1].

Российское общество клинической онкологии (RUSSCO) регулярно обновляет практические рекомендации по лекарственному лечению опухолей различной локализации [2]. В них отражены современные представления о молекулярных вариантах заболевания. Понимание молекулярных механизмов малигнизации тканей необходимо как для разработки таргетных лекарственных препаратов, так и для оптимизации существующих схем терапии [3]. Ожидается, что пер-

сонализированный подбор терапии на основе результатов молекулярных тестов позволит увеличить частоту ответов на лечение и уменьшить расходы на лекарственные препараты [4].

Молекулярный патогенез КРР предполагает поэтапное накопление генетических и эпигенетических изменений, которые приводят к прогрессии злокачественного образования и сопровождаются disregулированной экспрессией генов-супрессоров опухолей и онкогенов. Наблюдаемые изменения могут быть рассмотрены в качестве потенциальных молекулярных биомаркеров, предсказывающих исход заболевания.

Цель работы — обобщение мирового опыта использования генетических и эпигенетических изменений, ассоциированных с прогрессированием КРР, в качестве как признанных, так и потенциальных прогностических и предиктивных биомаркеров КРР.

БИОМАРКЕРЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

В 65 % случаев КРР возникает спорадически [5]. В большинстве ранних неоплазий (например, при аномальных поражениях крипт, аденомах и зубчатых полипах) наблюдается потеря геномной и/или эпигеномной стабильности, что ускоряет накопление мутаций в ключевых сигнальных путях MAPK, p53, WNT, фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и трансформирующего фактора роста β (TGF- β), а также эпигенетических изменений, из которых чаще всего встречается метилирование промотора гена *SEPT9* [6]. Анализ материала биопсии и ДНК, выделенной из физиологических жидкостей пациента, позволяет определить факторы риска развития КРР. Сопоставление изменений экспрессии генов и частоты мутаций с показателями общей выживаемости (ОВ) и эффективности терапии указывает на прогностические и предиктивные биомаркеры соответственно.

Хромосомная нестабильность генома. Хромосомная нестабильность генома (chromosomal instability, CIN) определяется как приобретение или потеря больших

частей или целых хромосом, что приводит к анеуплоидии, потере гетерозиготности (loss of heterozygosity, LOH), амплификациям и транслокациям генов в опухолевых клетках. CIN является наиболее распространенной формой геномной нестабильности и присутствует примерно в 60 % случаев спорадического КРР [7].

Результаты метаанализа показали, что фенотип CIN, количественно оцениваемый степенью анеуплоидии ДНК, связан с худшим прогнозом при КРР [8–11] (табл. 1) и устойчивостью к 5-фторурацилу [12] (табл. 2). Он также является прогностическим биомаркером прогрессии и рецидивов на ранней стадии заболевания.

Таблица 1. Прогностические генетические биомаркеры колоректального рака (КРР)

Table 1. Prognostic genetic biomarkers of colorectal cancer (CRC)

Биомаркер Biomarker	Признак Trait	Число исследуемых образцов, <i>n</i> Number of samples studied, <i>n</i>	Прогноз Prognosis	Источник Reference
CIN (18q)	CIN	108	Неблагоприятный Unfavorable	[9]
18qLOH	CIN	2189	Неблагоприятный Unfavorable	[10]
CIN (2p, 5q, 17p, 18q)	CIN	1103	Неблагоприятный Unfavorable	[11]
<i>APC(2)/KRAS/TP53</i>	Конститутивная активация пути Wnt Constitutive activation of the Wnt pathway	468	Неблагоприятный Unfavorable	[13]
<i>KRAS, NRAS, BRAF</i>	Конститутивная активация пути RTK-RAS-RAF-MEK-ERK Constitutive activation of the RTK-RAS-RAF-MEK-ERK pathway	37	Неблагоприятный Unfavorable	[14]
<i>KRAS, BRAF</i>	Конститутивная активация пути RTK-RAS-RAF-MEK-ERK Constitutive activation of the RTK-RAS-RAF-MEK-ERK pathway	461	Неблагоприятный Unfavorable	[15]
<i>NRAS</i>	Конститутивная активация пути RTK-RAS-RAF-MEK-ERK Constitutive activation of the RTK-RAS-RAF-MEK-ERK pathway	225	Неопределенный Indifferent	[16]
<i>NRAS</i>	Конститутивная активация пути RTK-RAS-RAF-MEK-ERK Constitutive activation of the RTK-RAS-RAF-MEK-ERK pathway	786	Неблагоприятный при метастатическом КРР Unfavorable in metastatic CRC	[17]
<i>NRAS</i>	Конститутивная активация пути RTK-RAS-RAF-MEK-ERK Constitutive activation of the RTK-RAS-RAF-MEK-ERK pathway	1022	Неблагоприятный Unfavorable	[18]
<i>BRAF</i>	Конститутивная активация пути RTK-RAS-RAF-MEK-ERK Constitutive activation of the RTK-RAS-RAF-MEK-ERK pathway	1055	Неблагоприятный Unfavorable	[19]
<i>TP53</i>	Нарушение контроля над клеточным циклом Violation of cell cycle control	3583	Неблагоприятный Unfavorable	[20]
<i>CDH1*</i> ↓	Конститутивная активация пути Wnt Constitutive activation of the Wnt pathway	9591	Неблагоприятный Unfavorable	[21]
<i>PIK3CA(2)</i>	Активация пути PI3K Activation of the PI3K pathway	1170	Неблагоприятный Unfavorable	[22]
<i>PIK3CA</i>	Активация пути PI3K Activation of the PI3K pathway	450	Неблагоприятный Unfavorable	[23]
<i>SMAD4*</i> ↓	Активация пути TGF-β Activation of the TGF-β pathway	75	Неблагоприятный Unfavorable	[24]
<i>SMAD4/TP53</i>	Активация пути TGF-β Activation of the TGF-β pathway	433	Неблагоприятный при метастатическом КРР Unfavorable in metastatic CRC	[25]

Окончание табл. 1

End of table 1

Биомаркер Biomarker	Признак Trait	Число исследу- емых образцов, <i>n</i> Number of samples studied, <i>n</i>	Прогноз Prognosis	Источ- ник Reference
<i>MYC</i>	Активация пути <i>MYC</i> Activation of the <i>MYC</i> pathway	344	Неблагоприятный при шистосомозе Unfavorable in shistamose	[26]
MSI	Дефицит КНО MMR deficiency	101	Благоприятный Favorable	[9]
MSI	Дефицит КНО MMR deficiency	287	Благоприятный Favorable	[12]
MSI	Дефицит КНО MMR deficiency	613	Благоприятный Favorable	[27]
CIMP	Метилаторный фенотип Methylator phenotype	103	Неблагоприятный Unfavorable	[28]
CIMP, <i>MGMT/APC/CDH13</i>	Метилаторный фенотип Methylator phenotype	25	Неблагоприятный Unfavorable	[29]
LINE-1 hypo	Дерегуляция функций генов Dysregulation of gene functions	643	Неблагоприятный Unfavorable	[30]
Субтип CMS4 I–IV стадий (преимуще- ственно III–IV стадий) CMS4 subtype I–IV stages (mainly III–IV stages)	Активация пути <i>TGF-β</i> Activation of the <i>TGF-β</i> pathway	2129	Неблагоприятный Unfavorable	[31]
Субтип CMS2 CMS2 subtype	Активация WNT WNT activation	242	Неблагоприятный при метастатическом КРР Favorable in metastatic CRC	[32]
Субтип CMS1 CMS1 subtype	MSI, мутации в гене <i>BRAF</i> , иммунная инфильтрация MSI, <i>BRAF</i> mutation, and immune infiltration	104	Неблагоприятный при метастатическом КРР Unfavorable in metastatic CRC	[32]
<i>MK167/MYC/MYBL2*</i> ↑	Нарушение клеточного цикла Cell cycle disturbance	1851	Благоприятный Favorable	[33]
<i>FAP/BGN/INHBA*</i> ↑	Индукция пролиферации Induction of proliferation	1851	Неблагоприятный Unfavorable	[33]
цсДНК ↑ cfDNA ↑	Корреляция экспрессии со снижением показателей общей выживаемости Correlation of expression with decreased overall survival rates	97	Неблагоприятный при метастатическом КРР Unfavorable in metastatic CRC	[34]
цсДНК ↑ ctDNA ↑	Корреляция экспрессии со снижением показателей общей выживаемости Correlation of expression with decreased overall survival rates	153	Неблагоприятный Unfavorable	[35]
цсДНК ↑ ctDNA ↑	Корреляция экспрессии со снижением показателей общей выживаемости Correlation of expression with decreased overall survival rates	61	Неблагоприятный при метастатическом КРР Unfavorable in metastatic CRC	[36]
miR-21/miR-29a/ miR-92a/miR-125b ↑	Дерегуляция функций генов Dysregulation of gene functions	85	Неблагоприятный Unfavorable	[37]
днРНК HOTAIR ↑ dsRNA HOTAIR ↑	Секвестрирование miR-206 и активация CCL2 Sequestration of miR-206 and activation of CCL2	32	Неблагоприятный Unfavorable	[38]

*Определялась экспрессия.

Примечание. ↑ — повышенная экспрессия; ↓ — пониженная экспрессия; CIN — хромосомная нестабильность генома; PI3K — фосфоинозитид-3-киназа; MSI — микросателлитная нестабильность; TGF-β — трансформирующий фактор роста β; КНО — коррекция неспаренных оснований ДНК; цсДНК — циркулирующая свободная ДНК; цсДНК — циркулирующая опухолевая ДНК; днРНК — двунитевые РНК.

*Expression was determined.

Note. ↑ — increased expression; ↓ — decreased expression; CIN — chromosomal instability of the genome; PI3K — phosphoinositide-3-kinase; MSI — microsatellite instability; TGF-β — transforming growth factor β; MMR — mismatch repair; cfDNA — cell-free DNA; ctDNA — circulating tumor DNA; dsRNA — double-stranded RNA.

Таблица 2. Предиктивные генетические биомаркеры колоректального рака (КРР)

Table 2. Predictive genetic biomarkers of colorectal cancer (CRC)

Биомаркер Biomarker	Терапия Therapy	Число исследуемых образцов, <i>n</i> Number of samples studied, <i>n</i>	Прогноз Prognosis	Источник Reference
18qLOH/MSS	5-фторурацил 5-fluorouracil	155	Неблагоприятный Unfavorable	[12]
<i>TGFB2</i> /MSI	5-фторурацил 5-fluorouracil	62	Благоприятный Favorable	[12]
MSS	5-фторурацил 5-fluorouracil	283	Благоприятный Favorable	[12]
<i>BRAF</i>	Цетуксимаб + FOLFIRI Cetuximab + FOLFIRI	2020	Неблагоприятный при метастатическом КРР Unfavorable in metastatic CRC	[39]
<i>KRAS</i> (G13D)	Цетуксимаб Cetuximab	32	Благоприятный при метастатическом КРР Favorable in metastatic CRC	[40]
<i>KRAS</i>	Капецитабин, бевацизумаб Capecitabine, bevacizumab	111	Неопределенный Indifferent	[41]
<i>BRAF</i>	Капецитабин, бевацизумаб Capecitabine, bevacizumab	111	Неблагоприятный Unfavorable	[41]
<i>KRAS, BRAF</i>	Оксалиплатин, иринотекан, бевацизумаб Oxaliplatin, irinotecan, bevacizumab	461	Неблагоприятный при метастатическом КРР Unfavorable in metastatic CRC	[15]
<i>NRAS</i>	Панитумумаб, цетуксимаб, иринотекан Panitumumab, cetuximab, irinotecan	47	Неблагоприятный при метастатическом КРР Unfavorable in metastatic CRC	[17]
<i>KRAS</i>	Цетуксимаб Cetuximab	1022	Неблагоприятный при метастатическом КРР Unfavorable in metastatic CRC	[18]
<i>NRAS</i>	Цетуксимаб Cetuximab	1022	Неблагоприятный при метастатическом КРР Unfavorable in metastatic CRC	[18]
<i>PIK3CA</i>	Цетуксимаб Cetuximab	1022	Слабый ответ Weak response	[18]
<i>PTEN</i>	Цетуксимаб Cetuximab	1022	Неблагоприятный при метастатическом КРР Unfavorable in metastatic CRC	[18]
<i>TP53</i>	5-фторурацил 5-fluorouracil	3583	Благоприятный только при локализации в проксимальном отделе толстой кишки Favorable only when localized in the proximal colon	[20]
<i>TP53</i>	5-фторурацил 5-fluorouracil	223	Неблагоприятный Unfavorable	[42]
<i>PIK3CA</i>	Аспирин Aspirin	964	Благоприятный Favorable	[43]
<i>PTEN</i>	Анти-EGFR-терапия Anti-EGFR therapy	76	Неблагоприятный при метастатическом КРР Unfavorable in metastatic CRC	[44]

Окончание табл. 2

End of table 2

Биомаркер Biomarker	Терапия Therapy	Число исследуемых образцов, <i>n</i> Number of samples studied, <i>n</i>	Прогноз Prognosis	Источник Reference
SMAD4* ↓	5-фторурацил 5-fluorouracil	75	Неблагоприятный Unfavorable	[24]
<i>ERBB2</i>	Анти-EGFR-терапия Anti-EGFR therapy	98	Неблагоприятный при метастатическом КРР Unfavorable in metastatic CRC	[45]
Субтип CMS4 CMS4 subtype	FOLFIRI + цетуксимаб FOLFIRI + cetuximab	438	Благоприятный при метастатическом КРР Favorable in metastatic CRC	[46]
CIMP	5-фторурацил 5-fluorouracil	103	Благоприятный Favorable	[28]
CIMP	5-азациитидин 5-azacitidine	47	Благоприятный Favorable	[47]
LINE-1 hypo	FOLFOX	40	Неблагоприятный Unfavorable	[48]
Субтип CMS2 CMS2 subtype	Цетуксимаб Cetuximab	242	Благоприятный при метастатическом КРР Favorable in metastatic CRC	[32]
цДНК ↑ ctDNA ↑	5-фторурацил 5-fluorouracil	42	Неблагоприятный Unfavorable	[49]
miR-21 ↑	5-фторурацил 5-fluorouracil	92	Неблагоприятный Unfavorable	[50]
miR-92a ↓	5-фторурацил, оксали- платин 5-fluorouracil, oxaliplatin	210	Благоприятный Favorable	[51]
miR-31-3p ↓	Цетуксимаб Cetuximab	93	Благоприятный при метастатическом КРР Favorable in metastatic CRC	[52]

*Определялась экспрессия.

Примечание. ↑ — повышенная экспрессия; ↓ — пониженная экспрессия; MSS — микросателлитная стабильность; MSI — микросателлитная нестабильность; EGFR — рецептор эпидермального фактора роста; цДНК — циркулирующая опухолевая ДНК.

*Expression was determined.

Note. ↑ — increased expression; ↓ — decreased expression; MSS — microsatellite stability; MSI — microsatellite instability; EGFR — epidermal growth factor receptor; ctDNA — circulating tumor DNA.

Хромосомная нестабильность генома обычно ассоциирована с дисфункцией сверхочных точек клеточного цикла вследствие накопления мутаций в онкогенах и генах опухолевых супрессоров, в частности *APC*, *KRAS*, *TP53*, *PTEN*, *RBI*, *MYC* и др. Для CIN-фенотипа характерна инактивация гена *APC* [53], что приводит к активации сигнального пути WNT/β-катенин. Результаты полноэкзомного секвенирования 468 опухолей продемонстрировали прогностическую роль мутаций в гене *APC*. Пациенты с опухолями, в которых отсутствуют мутации в гене *APC*, имеют худший прогноз, чем пациенты с 1 мутацией в нем, однако при опухолях с наличием 2 мутаций в этом гене в сочетании

с мутациями в генах *KRAS* и *TP53* наблюдается самая низкая выживаемость среди всех исследованных подгрупп [13] (см. табл. 1).

Высокие уровни вариантных форм белка β-катенина в ядре связаны с плохим прогнозом у пациентов с КРР [54]. Для последующей прогрессии опухоли до ранних карцином требуется мутация в гене *KRAS*, активирующая сигнальный путь Ras, что приводит к каскадной активации других сигнальных путей (MAPK, RAF и PI3K).

Постоянная активация сигнального каскада рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) приводит к инициации опухолевой трансформации

и прогрессии, в том числе при КРР. Терапия моноклональными антителами анти-EGFR цетуксимабом и панитумумабом эффективна лишь в 25 % случаев. Причиной этого является наличие в 40 % карцином толстой кишки активирующих мутаций в гене *KRAS* [6, 14] (см. табл. 1). Более чем в 90 % случаев эти мутации находятся в 12-м и 13-м кодонах 2-го экзона данного гена. Таким образом, мутации в гене *KRAS* являются идеальным биомаркером для прогнозирования: они ограничены горячими точками, легко выявляются, их предиктивная ценность очень высокая (у 99 % пациентов с мутантным геном *KRAS* не отмечается ответ на ингибирование EGFR), поэтому данный биомаркер используется в клинической практике для выбора терапии [3]. Применение цетуксимаба вместе с FOLFIRI (ириротекан, лейковорин, 5-фторурацил) улучшает терапевтические результаты в случаях отсутствия мутаций в гене *KRAS* [39] (см. табл. 2). Тем не менее обнаружено, что влияние мутации в 12-м и 13-м кодонах этого гена на биологию опухоли различается. У пациентов с необычной мутацией G13D в 13-м кодоне, получающих цетуксимаб, выживаемость была выше по сравнению с пациентами с другими мутациями и аналогична выживаемости больных без мутаций в гене *KRAS* [40] (см. табл. 2). В настоящее время считается, что антитела против EGFR не следует использовать для лечения пациентов с опухолями с мутацией G12V в 12-м кодоне гена *KRAS*.

Мутация в гене *KRAS* не является предиктивным фактором для прогноза исхода лечения бевацизумабом пациентов с прогрессирующим КРР [41] (табл. 2). Кроме того, существенное значение в определении противоопухолевого ответа играют и другие участники сигнального каскада RTK-RAS — гены *EGFR1-RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK* [5].

Мутации в гене *BRAF* встречаются примерно у 5 % больных спорадическим КРР. У пациентов с метастатическим КРР, носителей мутации V600E в гене *BRAF*, наблюдаются низкие показатели выживаемости. Лечение ингибитором серин-треонин протеинкиназы B-Raf энкорафенибом и антителом к EGFR цетуксимабом значительно увеличивает ОВ [55].

Мутации в гене *BRAF* выявляют у всех пациентов с метастазами для определения прогноза и уточнения объема химиотерапии (ХТ) 1-й линии. У больных с наследственным неполипозным КРР мутации в данном гене отсутствуют, поэтому их можно использовать как диагностический инструмент дифференциальной диагностики семейного и спорадического КРР [2]. Также показано, что мутации в генах *KRAS* и *BRAF* чаще являются взаимоисключающими: если в опухоли есть мутации в гене *BRAF*, значит, скорее всего, не будут найдены мутации в гене *KRAS*, и наоборот [56]. Эти мутации служат независимыми прогностическими факторами для определения ОВ и выживаемости без прогрессирования у пациентов с метастатическим КРР [15] (см. табл. 1, 2).

Мутация в гене *NRAS*, по-видимому, не связана с прогнозом [16] (см. табл. 1), но в подгруппе пациентов с метастатическим КРР она ассоциируется с сокращением продолжительности жизни [17] (см. табл. 1). Поскольку мутация в гене *NRAS* связана с резистентностью к терапии против EGFR [18] (см. табл. 2), целесообразно провести тест для ее определения в случаях, если мутации в гене *KRAS* не выявлены.

Мутационный статус *KRAS/NRAS* и *BRAF* оценивается перед назначением моноклональных антител анти-EGFR (цетуксимаба, панитумумаба) в сочетании с ХТ. Данная стратегия наиболее результативна при левосторонних опухолях. В то же время при правосторонних опухолях рекомендуется терапия с добавлением к ХТ бевацизумаба, поскольку у пациентов данной группы улучшение показателей выживаемости без прогрессирования и ОВ на фоне анти-EGFR-терапии менее выражено [19].

При переходе от поздней аденомы к карциноме в 60–80 % опухолей с CIN наблюдается потеря функции гена *TP53* [53], что приводит к неконтролируемой пролиферации клеток. Инактивация этого гена является одним из наиболее распространенных событий в канцерогенезе. Мутации в гене *TP53* обнаруживаются в 35–55 % случаев КРР, подавляющее большинство из них локализовано в 5–8-м экзонах, кодирующих ДНК-связывающий домен белка p53. Наличие этих мутаций ассоциировано с худшим исходом, включая низкие показатели безрецидивной выживаемости и ОВ [20] (см. табл. 1). Мутационный статус *TP53* связан с положительным ответом на адъювантную терапию 5-фторурацилом у пациентов с КРР III стадии. Данные, полученные в ходе исследования, в котором приняли участие более 3500 больных КРР, подтверждают предиктивную ценность мутации в гене *TP53*, которая, по-видимому, связана с локализацией первичной опухоли. У больных с мутацией в этом гене и опухолью в проксимальном отделе толстой кишки наблюдались лучшие показатели ОВ при проведении адъювантной ХТ по сравнению с теми, кому назначалось только хирургическое лечение [20] (см. табл. 2). Однако у пациентов с КРР с мутациями в гене *TP53* или сверхэкспрессией *TP53*, получающих адъювантную терапию, чаще отмечались худшие показатели выживаемости [42] (см. табл. 2).

Низкий уровень экспрессии *CDH1* (кадгерин 1) у пациентов с КРР связан с плохим прогнозом [21] (см. табл. 1).

Ген *PIK3CA* мутирует в 10–20 % КРР. PI3K регулирует, наряду с *KRAS*, нижестоящие сигнальные пути EGFR. Более того, иницируемая PI3K передача сигналов ингибируется фосфатазой и гомологом тензина PTEN. В ходе ряда исследований выявлено увеличение специфической смертности от рака толстой кишки у пациентов с опухолями, содержащими мутации в гене *PIK3CA*, по сравнению с пациентами с опухолями с *PIK3CA* дикого типа [22] (см. табл. 1). При этом

сообщалось, что только сосуществование мутаций в 9-м и 20-м экзонах гена *PIK3CA*, но не мутация лишь в 9-м или 20-м экзонах этого гена, связано с худшим прогнозом [23] (см. табл. 1). Среди пациентов с опухолями с *KRAS* дикого типа наличие мутации в гене *PIK3CA* коррелировало со значительным увеличением специфической смертности от КРР. Напротив, мутации в гене *PIK3CA* существенно не влияли на смертность среди больных с *KRAS*-мутировавшими опухолями. Таким образом, влияние мутации в гене *PIK3CA* может потенциально наблюдаться у пациентов с опухолями *KRAS* дикого типа [22]. В ряде исследований изучалась роль мутаций в гене *PIK3CA* в объективном ответе (выживаемость без прогрессирования заболевания и ОВ) на цетуксимаб или панитумумаб при КРР. Полученные к настоящему времени данные указывают на то, что КРР с мутациями в гене *PIK3CA* (особенно в его 20-м экзоне) в значительной степени устойчив к антителам против EGFR [18] (см. табл. 2). Мутации в гене *PIK3CA* также могут служить предиктивным биомаркером для назначения адъювантной терапии аспирин при КРР [43] (см. табл. 2). Регулярный прием этого препарата после установления диагноза связан с более длительной выживаемостью пациентов с мутантным *PIK3CA*, но не пациентов с *PIK3CA* дикого типа.

Супрессор опухолей *PTEN* часто инактивируется при раке в результате мутации, эпигенетического подавления или посттрансляционных модификаций. Изменения в передаче сигналов *PIK3* и потеря экспрессии *PTEN*, как правило, связаны с отсутствием ответа на терапию, направленную против EGFR (см. табл. 2) [44]. Функциональная значимость делеции супрессора опухоли *PTEN* остается не до конца понятной вследствие множества способов регуляции его активности.

Низкий уровень матричной РНК *SMAD4* связан с меньшей продолжительностью жизни пациентов и плохим прогнозом при применении адъювантной ХТ (см. табл. 1, 2) [24]. При одновременном наличии мутаций в генах *SMAD4* и *TP53* отмечается почти 2-кратное уменьшение продолжительности жизни пациентов с метастатическим КРР по сравнению с остальной выборкой (24,2 мес против 42,2 мес) (см. табл. 1) [25].

Онкоген *ERBB2*, обычно называемый рецептором эпидермального фактора роста человека 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) и кодирующий трансмембранную рецепторную тирозинкиназу, часто амплифицируется или сверхэкспрессируется, а иногда мутирует при различных видах рака человека. Его амплификация наблюдается в 2,9 % случаев КРР [57] и связана с устойчивостью к анти-EGFR-терапии у пациентов с *RAS/RAF* дикого типа [45].

Амплификация *MYC* может предсказать плохой прогноз при КРР, ассоциированном с шистосомозом [26] (см. табл. 1).

Микросателлитная нестабильность генома. Микросателлитная нестабильность генома служит индикатором нарушений в работе системы коррекции неспа-

ренных оснований ДНК (MMR). Она возникает *de novo*, но встречается и при наследственном неполипозном КРР (2–4 % пациентов). Наличие MSI указывает на высокий риск появления независимого, первично-множественного новообразования [58]. Тест на MSI с использованием панели с мононуклеотидными биомаркерами (BAT25, BAT26, NR21, NR24 и NR27) относительно прост, доступен и может быть выполнен на ретроспективном (архивном) биологическом материале, а также в циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК). Кроме того, для определения MSI применяют разные методы: полимеразную цепную реакцию, иммуногистохимическое исследование и секвенирование нового поколения. Согласно клиническим рекомендациям RUSSCO (2024) необходимо осуществлять поиск крупных делеций/вставок в случаях, когда не обнаружен патогенный вариант генов системы MMR [2].

При КРР ранних стадий, особенно II стадии, MSI-статус является положительным прогностическим фактором (см. табл. 1) [27]. Пациенты с КРР и MSI могут получить пользу от иммунотерапии, но не от схем ХТ на основе 5-фторурацила [59].

Определение MSI-статуса содержится в рекомендациях Всемирной организации здравоохранения по диагностике при КРР муцинозного типа: высокий уровень MSI указывает на хороший прогноз, низкий уровень MSI или микросателлитная стабильность (MSS) — на плохой исход. В настоящее время не выделяют MSI высокого и низкого уровней, и в качестве прогностических маркеров рассматривают MSI и MSS. На качество MSI как прогностического биомаркера могут влиять мутации в ключевых генах, вовлеченных в развитие колоректального канцерогенеза, таких как *BRAF*. Кроме того, наличие гиперметилирования промоторных областей некоторых генов в совокупности с MSI сильно ухудшает прогноз (см. подраздел «Фенотип CIMP»).

БИОМАРКЕРЫ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ

Фенотип CIMP (CpG island methylator phenotype).

Для фенотипа CIMP характерно локальное гиперметилирование промоторных участков определенных генов. Обычно в опухолевых клетках тотальное гипометилирование генома сочетается с локальным гиперметилированием ДНК [60]. Тотальное гипометилирование генома обуславливает предрасположенность клеток к хромосомным транслокациям и анеуплоидии и, соответственно, ассоциировано с CIN [7]. Локальное гиперметилирование происходит за счет одновременного aberrантного метилирования промоторных участков ряда генов, таких как *VHL*, *CDKN2A*, *MLH1*, *APC*, *CDH13*, *MGMT* и др., практически никогда не подвергающихся метилированию в нормальных тканях. Метилирование промоторных областей гена приводит к угнетению его транскрипции, что функционально эквивалентно инактивирующей мутации [60].

Частота обнаружения CIMP в случаях спорадического KPP, по разным оценкам, колеблется от 15 до 50 %. Фенотип CIMP присутствует в той или иной степени почти во всех случаях KPP; как правило, значимым показателем его проявления считается наличие метилирования не менее 3 из 5 локусов для панели генетических локусов *MINT1*, *MINT2*, *MINT31*, *CDKN2A*, *MLH1* или панели *CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3*, *SOC31* [60]. У пациентов с фенотипом CIMP, получавших только хирургическое лечение, наблюдаются более низкие показатели ОБ по сравнению с когортой CIMP⁺ (см. табл. 1) [28].

Фенотип CIMP при KPP тесно связан с MSI. Так, наличие CIMP может обуславливать многие случаи MSI при спорадической форме рака толстого кишечника. При этом у более чем 15 % пациентов MSI чаще всего определяется не мутацией в соответствующих генах, а гиперметилированием промотора гена *MLH1*. В таких опухолях часто встречается мутация V600E в гене *BRAF*, которая не обнаруживается при наследственном неполипозном KPP [58]. Показано, что CpG-островки промотора гена *MLH1* при этой форме рака метилированы (мутаций в данном гене в таких случаях обычно нет), что приводит к каскаду нарушений микросателлитных локусов и в других генах [6].

Нарушения процесса метилирования ДНК регистрируются на самых ранних стадиях канцерогенеза [60] и, следовательно, могут служить диагностическими и прогностическими биомаркерами как для оценки риска развития KPP, так и для прогноза уже имеющихся заболеваний. Использование метилтрансфераз в качестве мишени для ингибиторов позволит изменять статус метилирования ДНК в клетке при противоопухолевом лечении [24]. Продemonстрировано статистически значимое увеличение уровня метилирования промоторных участков генов-онкосупрессоров *APC*, *CDH13* и *MGMT* в KPP по сравнению с образцами нормальной ткани (см. табл. 1) [29]. Количественная оценка уровня CpG-метилирования промоторов этих генов может быть использована в качестве чувствительных биомаркеров прогрессирования и метастазирования KPP, причем независимо от наличия активирующих мутаций в генах *KRAS* и *BRAF*.

Гиперметилирование промоторов *MGMT* и *MLH1* можно рассматривать как предиктивный биомаркер, поскольку выявлена его корреляция с улучшением показателей ОБ в ответ на лечение 5-фторурацилом и 5-азациитидином (см. табл. 2) [28, 47].

Гипометилирование элементов LINE-1. Элементы LINE-1 (long interspersed nuclear elements) занимают 17 % генома человека и, будучи активированными посредством гипометилирования, могут внедряться в отдаленные нестабильные участки генома, приводя к CIN, активации онкогенов и подавлению онкосупрессоров. Гипометилирование LINE-1 является независимым биомаркером плохого прогноза при KPP (см. табл. 1) [30] и способно предсказывать отсутствие

ответа на комбинированную ХТ FOLFOX (лейковрин, 5-фторурацил и оксалиплатин) [48] (см. табл. 2). Степень гипометилирования LINE-1 можно оценить количественно [61]. В качестве перспективной стратегии контроля над опухолевым процессом при KPP рассматривается специфическое сайленсирование ретротранспозонов с помощью комплементарных РНК и стимуляции экспрессии не участвующих в канцерогенезе, но активирующих иммунный ответ элементов [62].

РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛНОГЕНОМНЫХ АССОЦИАТИВНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Аллели низкого риска. Полногеномные ассоциативные исследования (GWAS) позволили идентифицировать сотни распространенных генетических вариантов, связанных с предрасположенностью к KPP [63]. Выявлено, что только 13 % случаев KPP обусловлены наследуемыми патогенными вариантами генов с высокой пенетрантностью. Это позволяет сделать вывод, что возникновение данной патологии во многих случаях также ассоциировано с накоплением генетических вариантов с низким или умеренным влиянием на предрасположенность к раку. Оценка полигенного риска на основе ассоциативных сигналов может повлиять на клинические решения о проведении профилактического скрининга KPP в популяциях. Аллели низкого риска создают фон, который благоприятствует проявлению мутаций в генах, однозначно ассоциированных с опухолевыми синдромами.

Молекулярные подтипы колоректального рака. В последнее десятилетие в дополнение к генетическим aberrациям, имеющим клиническую ценность, таким как мутации в гене *KRAS* и MSI-статус, были предложены молекулярные классификации, основанные на экспрессии генов, наиболее известная из которых — консенсусная молекулярная классификация подтипов (consensus molecular subtypes, CMS) [64]. Однако, несмотря на доступность эпигенетических данных, их клиническая польза до сих пор неоднозначна.

В 2015 г. совместные международные усилия по согласованию различий в этих таксономиях, принятые Консорциумом по подтипированию KPP (The Colorectal Cancer Subtyping Consortium, CRCSC), привели к созданию классификации KPP, в которую вошли 4 CMS данной патологии [31]. Определение этих подтипов должно помочь адаптировать методы лечения к индивидуальным особенностям пациентов.

К 1-му подтипу CMS (иммунному) относятся гипермутированные опухоли, многие из которых имеют положительный MSI-статус, с сильной иммунной активацией, CIMP и мутацией V600E в гене *BRAF* (14 % случаев). Второй подтип CMS (канонический) встречается чаще всего (37 % случаев) и характеризуется наличием CIN и выраженной активацией сигналов WNT и MYC. Наименее распространенным является 3-й подтип CMS (метаболический) (13 % случаев).

К нему относятся опухоли с мутантным геном *KRAS* эпителиоподобного подтипа с явной метаболической дерегуляцией. Четвертый подтип CMS (мезенхимальный) характеризуется высоким содержанием стромы, самым плохим прогнозом, наличием эпителиально-мезенхимального перехода со стромальной инвазией и ангиогенезом, выраженной активацией TGF- β и стволовостью [65]. Существуют также смешанные или неопределенные подтипы CMS (13 % случаев). Возможно, они представляют собой переходный фенотип или характеризуются внутриопухолевой гетерогенностью.

Молекулярный подтип и спектр мутаций KPP существенно влияют на прогноз и ответ на терапию. В популяции *RAS* дикого типа ОВ при 4-м подтипе CMS была значительно выше при назначении FOLFIRI в сочетании с цетуксимабом по сравнению с терапией FOLFIRI в комбинации с бевацизумабом. При 3-м подтипе CMS наблюдалась тенденция к увеличению ОВ при использовании цетуксимаба. При 1-м и 2-м подтипах CMS ОВ была сопоставима и не зависела от таргетной терапии (см. табл. 2) [46]. Н.-J. Lenz и соавт. провели субанализ исследования CALGB 80405 III фазы, включавшего 581 пациента с метастатическим KPP, получавших лечение FOLFIRI или FOLFOX + бевацизумаб/цетуксимаб в качестве терапии 1-й линии. Результаты анализа продемонстрировали, что подтипы CMS были высокопрогностическими показателями выживаемости (см. табл. 1, 2) [32]. В этой работе у пациентов с KPP и 1-м подтипом CMS, получавших лечение бевацизумабом, выявлены лучшие показатели ОВ по сравнению с теми, кому назначали цетуксимаб. Противоположная зависимость наблюдалась при 2-м подтипе CMS (см. табл. 2) [32]. Полученные результаты дают представление о молекулярных профилях, которые могут обуславливать ответ на антиангиогенное лечение при метастатическом KPP.

Экспрессия генов клеточного цикла и стромальных генов. Более высокая экспрессия группы генов клеточного цикла *MKI67*, *MYC* и *MYBL2* определяет лучший исход при KPP II и III стадий после операции. В противоположность, высокая экспрессия группы стромальных генов *FAP*, *BGN* и *INHBA* связана с плохим исходом при KPP. Валидация перечисленной панели генов проведена в ходе 4 крупных независимых исследований QUASAR, CALGB 9581, NSABP C-07 и SUNRISE, включавших более 3000 пациентов с KPP II и III стадий [33]. Ограничения для данного анализа заключаются в том, что невозможно предсказать ответ на адъювантную терапию.

БИОМАРКЕРЫ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Циркулирующие опухолевые клетки, свободно циркулирующая ДНК и циркулирующая опухолевая ДНК. Циркулирующие опухолевые клетки происходят из первичной опухоли и определяются в периферичес-

кой крови больных с различными формами солидного рака. Их генетический профиль, по-видимому, меняется по сравнению с первичной опухолью, поскольку более согласуется со спектром мутаций в метастазах [66]. При метастатических формах рака циркулирующие опухолевые клетки обнаруживают у 70 % пациентов, при локализованных формах — у 30–40 %. Выявление этих клеток у больных после завершения адъювантной ХТ свидетельствует о прогрессировании заболевания в 70 % случаев [66]. Циркулирующие опухолевые клетки могут нести опухолевые антигены и потенциально индуцировать иммунный ответ, неодинаковый при различных стадиях заболевания: у больных KPP II–III стадии такие изменения можно рассматривать как стимулирующие, а при KPP IV стадии — как супрессивные.

Результаты полногеномного секвенирования ДНК плазмы крови онкологических пациентов продемонстрировали, что часть циркулирующей свободной ДНК (цсДНК) содержит последовательность всего генома опухоли — цоДНК, которая может отражать клональную эволюцию опухоли. Циркулирующая опухолевая ДНК представляет собой лишь небольшую часть всей цсДНК; ее концентрация может превышать 10 % от концентрации общей цсДНК у пациентов с раком поздней стадии, но составлять <1 % от общей концентрации цсДНК у больных с низкой опухолевой нагрузкой и с некоторыми типами рака, включая KPP. Из этого следует, что метод детекции мутаций в цоДНК важен для достижения соответствия опухолевого материала мутационному статусу. Использование секвенирования нового поколения послеоперационной цоДНК в плазме крови позволяет выявить минимальную остаточную болезнь и определить пациентов с высоким риском развития рецидива локализованного KPP [67].

Высокая концентрация цсДНК сама по себе коррелирует с меньшими показателями ОВ пациентов с метастатическим KPP (см. табл. 1) [34]. Анализ цоДНК у пациентов с известным мутационным статусом опухоли [34] выявил мутации в гене *KRAS* у больных с поздними стадиями KPP, тогда как ни у одного пациента с заболеванием I стадии мутаций найдено не было. Полученные результаты согласуются с данными исследований, согласно которым высокая концентрация цоДНК связана с низкими показателями выживаемости при KPP и высоким риском развития рецидива заболевания (см. табл. 1) [35].

Результаты исследования J. Tie и соавт. подтвердили прогностическое значение обнаружения цоДНК после операции у пациентов с метастатическим KPP [49] (см. табл. 1). Кроме того, продемонстрирована потенциальная важность анализа цоДНК в ходе адъювантной ХТ в качестве раннего биомаркера эффективности лечения. Определение цоДНК позволяет разделить пациентов на группы низкого и высокого рисков развития рецидива. Этот подход оправдал себя, поскольку у больных с отрицательным цоДНК-статусом,

которым не проводили адъювантную ХТ, риск рецидива в течение 5 лет наблюдения оказался низким. Анализ цодНК открывает путь к персонализации терапии, позволяет принять решение о целесообразности назначения адъювантной ХТ и оценить ее эффективность [36, 49].

Еще одной перспективой применения цодНК как биомаркера является выявление опухолей с высокой мутационной нагрузкой. Предполагается, что сильно мутировавшие опухоли с большей вероятностью несут неоантигены, и их клетки, имеющие много генных мутаций, будут распознаны как аномальные и атакованы иммунной системой организма.

МикроРНК и длинные некодирующие РНК. МикроРНК могут функционировать как онкогенные микроРНК, ингибируя экспрессию генов-супрессоров опухолей, или как супрессорные микроРНК, ингибируя экспрессию онкогенов.

Одним из наиболее изученных и многообещающих биомаркеров КРР, прогнозирования развития заболевания и ответа на лечение является miR-21 — onco-miRNA, мишенями которой выступают различные опухолевые супрессоры, такие как *BCL2*, *PTEN* и др. Повышенная экспрессия miR-21 приводит к нарушениям в сигнальном пути PI3K/AKT. Также эта miR-21 регулирует проапоптотический ген *PDCD4* (programmed cell death protein 4) и по этой причине является антиапоптотической микроРНК [68].

Показано, что экспрессия miR-21 в сыворотке крови и стуле отражает ее уровни в КРР и, следовательно, может служить как диагностическим, так и прогностическим биомаркером, предсказывающим стадию по классификации TNM, потенциальное метастазирование и чувствительность к ХТ. Экспрессию miR-21 в тканях и крови предлагается рассматривать в качестве предиктивного биомаркера для определения ответов на неоадъювантную химиолучевую терапию при распространенном раке прямой кишки и на неоадъювантную и адъювантную ХТ при КРР поздних стадий [50] (см. табл. 2).

Еще одним потенциальным биомаркером является экспрессия miR-92a. Ее повышенный уровень как в ткани, так и в крови может указывать на низкие показатели выживаемости [64]. Также обнаружено, что экспрессия miR-92a подавляется после ХТ 5-фторурацилом и оксалиплатином и, следовательно, может выступать предиктивным биомаркером (см. табл. 2) [51].

Экспрессию miR-31-3р рассматривают в качестве многообещающего прогностического биомаркера при метастатическом КРР и отсутствии мутаций в гене *KRAS*. Низкий уровень экспрессии miR-31-3р в образцах опухоли таких пациентов коррелирует с хорошим ответом на терапию моноклональными антителами анти-EGFR (цетуксимаб) и лучшими показателями выживаемости без прогрессии заболевания по сравнению с пациентами с высоким уровнем экспрессии этой микроРНК (табл. 2) [52]. Эти данные подтверждены

результатами исследования французской компании IntegraGen. Тест для выявления уровня miR-31-3р (miRpredX) в фиксированных в формалине парафинизированных тканях на основе полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией помогает клиницисту спрогнозировать эффективность применения блокаторов EGFR в 1-й и 2-й линиях терапии у пациентов с метастатическим КРР и диким типом гена *KRAS* [58].

Использование панелей, включающих 2 и более микроРНК, часто предлагают в качестве более точного и надежного диагностического подхода. Так, предложены панель для анализа образцов сыворотки крови, содержащая 4 микроРНК (miR-21, -29a, -92a и -125b) [37], панель для анализа образцов крови и стула, состоящая из 2 микроРНК (miR-223 и miR-92a), и панель для анализа образцов плазмы, содержащая 6 микроРНК (miR-19a, -19b, -15b, -29a, -335 и -18a) [37]. Прогностический потенциал этих наборов биомаркеров еще предстоит выяснить.

Длинные некодирующие РНК (днкРНК) являются большой группой некодирующих РНК длиной более 200 нуклеотидов. Длинная некодирующая РНК HOTAIR, рассматриваемая как онкоген, способствует прогрессии многих видов рака. J. Shengnan и соавт. исследовали роль регуляции сигнальной оси HOTAIR/miR-206/CCL2 при КРР [38]. Авторы выявили, что сверхэкспрессия CCL2 ослабляет пролиферацию, миграцию и инвазию клеток КРР. В целом результаты этого исследования впервые показали, что днкРНК HOTAIR играет роль онкогена в КРР напрямую, являясь «губкой» miR-206 для активации нижележащего CCL2.

Поскольку днкРНК (CACS15, CYTOR, HOTAIR, MALAT1, TUG1, NEAT1, PVT1, XIST и MIR17HG) часто задействованы на поздних стадиях КРР, они могут служить в качестве прогностических факторов. Что еще более важно, нокдаун или сверхэкспрессия вышеупомянутых днкРНК может не только существенно подавлять прогрессию КРР, но и преодолевать лекарственную устойчивость, предполагая их потенциальную терапевтическую роль.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогностические и предиктивные биомаркеры КРР стоят в одном ряду с диагностическими маркерами, поскольку раннее обнаружение новообразования во многом определяет прогноз и успех лечения. При КРР фенотип CIN встречается чаще, чем MSI. Пациенты с опухолями с CIN имеют худший прогноз. Наличие MSI у больных КРР II стадии связано с лучшим прогнозом и показателями ОВ при терапии 5-фторурацилом, однако MSI не имеет прогностической ценности для заболевания III стадии. У пациентов с опухолями с фенотипом CIMP наблюдается неблагоприятный прогноз, что подтверждено результатами ряда исследований. Однако есть противоречия: по одним данным, прогноз при CIMP зависит от статуса MSI, по другим, прогноз пациентов с CIMP связан

с наличием/отсутствием мутации V600E в гене *BRAF*. В любом случае CIMP-статус по-прежнему является многообещающим прогностическим фактором. Мутации в гене *KRAS* предсказывают плохой прогноз при КРР III стадии, но не имеют прогностического значения при КРР II стадии. Мутации в гене *BRAF* ассоциированы с плохим прогнозом при проведении адъювантной терапии на II–III стадии, при этом замещение V600E указывает на худший прогноз.

Перспективы поиска новых биомаркеров КРР связаны с мутациями, которые с высокой частотой ассоциированы с данной опухолью [36] (например, с мутациями в генах *EGFR*, *FGFR1*, *FAT2*, *CDKN2A*, *CCND1*, *NOTCH2*, *NOTCH1*, *LRP5* и др.). Препаративный биомаркер для антиангиогенного препарата бевацизумаба еще не идентифицирован. Содержание фактора роста эндотелия сосудов А (VEGFA) в плазме крови не может предсказать ответ на VEGF-таргетную терапию.

Сверхэкспрессия *EZR*, кодирующего эзрин, коррелирует с агрессивностью КРР и худшим прогнозом, а высокая концентрация эзрина в опухоли рассматривается в качестве биомаркера раннего локального рецидива рака прямой кишки.

Возможность использования профилей экспрессии генов в качестве прогностических и предиктивных биомаркеров требует дальнейшего подтверждения с помощью анализа данных пациентов, получающих адъювантную терапию. Дерегуляцию многих микроРНК предложено рассматривать как прогностический и предиктивный биомаркер. Есть основание считать, что маркеры, выявленные в ходе жидкостной биопсии, могут предсказать реакцию на лечение.

Для выявления оптимальных биомаркерных панелей, их валидации и дальнейшего использования в клинической практике необходимы крупномасштабные исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. TNM classification of malignant tumours, 8th edn. Ed. by J.D. Brierley, M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind. John Wiley & Sons, 2016. 272 p.
2. Федянин М.Ю., Гладков О.А., Гордеев С.С. и др. Рак ободочной кишки, ректосигмоидного соединения и прямой кишки. Злокачественные опухоли 2024;14(3s2):263–322. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-14
Fedyanin M.Yu., Gladkov O.A., Gordeev S.S. et al. Cancer of the colon, rectosigmoid junction and rectum. Practical recommendations for the drug treatment of rectal cancer. Zlokachestvennye opuholi = The Journal of Malignant Tumours 2024;14(3s2): 263–322. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.1-14
3. Кит О.И., Водолажский Д.И. Молекулярная биология колоректального рака в клинической практике. Молекулярная биология 2015;49(4):531–40.
Kit O.I., Vodolashsky D.I. Molecular biology of colorectal cancer in clinical practice. Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology 2015;49(4):531–40. (In Russ.). DOI: 10.7868/S0026898415040084
4. Имянитов Е.Н. Фундаментальная онкология в 2016 году: обзор наиболее интересных открытий. Практическая онкология 2017;18(1):85–92. DOI: 10.31917/1801085
Imyanitov E.N. Basic science in oncology: year 2016 overview. Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology 2017;18(1):85–92. (In Russ.). DOI: 10.31917/1801085
5. Burt R. Inheritance of colorectal cancer. Drug Discov Today Dis Mech 2007;4(4):293–300. DOI: 10.1016/j.ddmec.2008.05.004
6. Lengauer C., Kinzler K., Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. Nature 1998;396(6712):643–9. DOI: 10.1038/25292
7. Mármol I., Sánchez-de-Diego C., Pradilla Dieste A. et al. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. Int J Mol Sci 2017;18(1):197. DOI: 10.3390/ijms18010197
8. Tjhuis A.E., Johnson S.C., McClelland S.E. The emerging links between chromosomal instability (CIN), metastasis, inflammation and tumour immunity. Mol Cytogenet 2019;12:17. DOI: 10.1186/s13039-019-0429-1
9. Sarli L., Bottarelli L., Bader G. et al. Association between recurrence of sporadic colorectal cancer, high level of microsatellite instability, and loss of heterozygosity at chromosome 18q. Dis Colon Rectum 2004;47(9):1467–82. DOI: 10.1007/s10350-004-0628-6
10. Popat S., Houlston R.S. A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. Eur J Cancer 2005;41(14):2060–70. DOI: 10.1016/j.ejca.2005.04.039
11. Watanabe T., Kobunai T., Yamamoto Y. et al. Chromosomal instability (CIN) phenotype, CIN high or CIN low, predicts survival for colorectal cancer. J Clin Oncol 2012;30(18):2256–64. DOI: 10.1200/jco.2011.38.6490
12. Watanabe T., Wu T.T., Catalano P.J. et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. N Engl J Med 2001;344(16):1196–206. DOI: 10.1056/NEJM200104193441603
13. Schell M.J., Mingli Y., Jamie K. et al. A multigene mutation classification of 468 colorectal cancers reveals a prognostic role for *APC*. Nat Commun 2015;7:11743. DOI: 10.1038/ncomms11743
14. Богомолова И.А., Антонеева И.И., Долгова Д.Р. Клинические особенности течения колоректального рака у пациентов с мутациями генов *EGFR*-сигнального пути. Ульяновский медико-биологический журнал 2019;1:60–6.
DOI: 10.34014/2227-1848-2019-1-60-67
Bogomolova I.A., Antoneeva I.I., Dolgova D.R. Clinical characteristics of colorectal cancer in patients with *EGFR*-signaling pathway gene mutations. Ulyanovskiy mediko-biologicheskii zhurnal = Ulyanovsk Medico-Biological Journal 2019;1:60–6. (In Russ.). DOI: 10.34014/2227-1848-2019-1-60-67
15. Liu J., Zeng W., Huang C. et al. Predictive and prognostic implications of mutation profiling and microsatellite instability status in patients with metastatic colorectal carcinoma. Gastroenterol Res Pract 2018;2018:4585802. DOI: 10.1155/2018/4585802
16. Irahara N., Baba Y., Noshio K. et al. *NRAS* mutations are rare in colorectal cancer. Diagn Mol Pathol 2010;19:157–63. DOI: 10.1097/PDM.0b013e3181c93fd1
17. Schirripa M., Cremolini C., Loupakis F. et al. Role of *NRAS* mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. Int J Cancer 2015;136(1):83–90. DOI: 10.1002/ijc.28955
18. De Roock W., Claes B., Bernasconi D. et al. Effects of *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, and *PIK3CA* mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapyrefractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol 2010;11(8):753–62. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70130-3

19. Cervantes A., Adam R., Roselló S. et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO clinical practice guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2023;34(1):10–32. DOI: 10.1016/j.annonc.2022.10.003
20. Russo A., Bazan V., Iacopetta B. et al. The *TP53* colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2005;23(30):7518–28. DOI: 10.1200/JCO.2005.00.471
21. Chang K., Jiang L., Sun Y. et al. Effect of E-cadherin on prognosis of colorectal cancer: a meta-analysis update. *Mol Diagn Ther* 2022;26(4):397–409. DOI: 10.1007/s40291-022-00593-3
22. Liao X., Morikawa T., Lochhead P. et al. Prognostic role of *PIK3CA* mutation in colorectal cancer: cohort study and literature review. *Clin Cancer Res* 2012;18(8):2257–68. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2410
23. Ogino S., Noshō K., Kirkner G.J. et al. *PIK3CA* mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(9):1477–84. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.6544
24. Alhopuro P., Alazzouzi H., Sammalkorpi H. et al. SMAD4 levels and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(17):6311–6. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0244
25. Wang C., Sandhu J., Tsao A. et al. Presence of concurrent *TP53* mutations is necessary to predict poor outcomes within the *SMAD4* mutated subgroup of metastatic colorectal cancer. *Cancers (Basel)* 2022;14(15):3644. DOI: 10.3390/cancers14153644
26. Pan W., Wang W., Huang J. et al. The prognostic role of *c-MYC* amplification in schistosomiasis-associated colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2020;50(4):446–55. DOI: 10.1093/jjco/hyz210
27. Merok M.A., Ahlquist T., Røyrvik E.C. et al. Microsatellite instability has a positive prognostic impact on stage II colorectal cancer after complete resection: results from a large, consecutive Norwegian series. *Ann Oncol* 2013;24(5):1274–82. DOI: 10.1093/annonc/mds614
28. Van Rijnsoever M., Elsaleh H., Joseph D. et al. CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9(8):2898–903.
29. Кит О.И., Водолазский Д.И., Двадненко К.В. и др. Аберрантное метилирование промоторных участков генов *APC*, *CDH13* и *MGMT* у больных колоректальным раком. *Сибирский онкологический журнал* 2016;15(2):48–55. DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-2-48-55
- Kit O.I., Vodolazhskiy D.I., Dvadenko K.V. et al. Aberrant methylation of the promoter of *APC*, *CDH13* and *MGMT* genes in colorectal cancer patients. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2016;15(2):48–55. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-2-48-55
30. Ogino S., Noshō K., Kirkner G.J. et al. A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(23):1734–8. DOI: 10.1093/jnci/djn359
31. Guinney J., Dienstmann R., Wang X. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015;21(11):1350–6. DOI: 10.1038/nm.3967
32. Lenz H.-J., Ou F.-S., Venook A. et al. Impact of consensus molecular subtyping (CMS) on overall survival (OS) and progression free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *J Clin Oncol* 2017;35:3511. DOI: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.3511
33. O'Connell M.J., Lavery I., Yothers G. et al. Relationship between tumor gene expression and recurrence in four independent studies of patients with stage II/III colon cancer treated with surgery alone or surgery plus adjuvant fluorouracil plus leucovorin. *J Clin Oncol* 2010;28(25):3937–44. DOI: 10.1200/JCO.2010.28.9538
34. El Messaoudi S., Mouliere F., Du Manoir S. et al. Circulating DNA as a strong multimarker prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care. *Clin Cancer Res* 2016;22(12):3067–77. DOI: 10.1158/1078-0432
35. Bidard F.C., Kiavue N., Ychou M. et al. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA detection in potentially resectable metastatic colorectal cancer: a prospective ancillary study to the unicancer prodige-14 trial. *Cells* 2019;8(6):516. DOI: 10.3390/cells8060516
36. Tie J., Wang Y., Cohen J. et al. Circulating tumor DNA dynamics and recurrence risk in patients undergoing curative intent resection of colorectal cancer liver metastases: a prospective cohort study. *PLoS Med* 2021;18(5):e1003620. DOI: 10.1371/journal.pmed.1003620
37. Liu H.N., Liu T.T., Wu H. et al. Serum microRNA signatures and metabolomics have high diagnostic value in colorectal cancer using two novel methods. *Cancer Sci* 2018;109(4):1185–94. DOI: 10.1111/cas.13514
38. Shengnan J., Dafei X., Hua J. et al. Long non-coding RNA HOTAIR as a competitive endogenous RNA to sponge miR-206 to promote colorectal cancer progression by activating CCL2. *J Cancer* 2020;11(15):4431–41. DOI: 10.7150/jca.42308
39. Van Cutsem E., Köhne C.H., Láng I. et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor *KRAS* and *BRAF* mutation status. *J Clin Oncol* 2011;29(15):2011–9. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.5091
40. De Roock W., Jonker D.J., Di Nicolantonio F. et al. Association of *KRAS* p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 2010;304(16):1812–20. DOI: 10.1001/jama.2010.1535
41. Price T.J., Hardingham J.E., Lee C.K. et al. Impact of *KRAS* and *BRAF* gene mutation status on outcomes from the phase III AGITG MAX trial of capecitabine alone or in combination with bevacizumab and mitomycin in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011;29(19):2675–82. DOI: 10.1200/JCO.2010.34.5520
42. Kandioler D., Mittlböck M., Kappel S. et al. *TP53* mutational status and prediction of benefit from adjuvant 5-fluorouracil in stage III colon cancer patients. *EBioMedicine* 2015;2(8):825–30. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.06.003 2352-3964
43. Liao X., Lochhead P., Nishihara R. et al. Aspirin use, tumor *PIK3CA* mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med* 2012;367:1596–606. DOI: 10.1056/NEJMoa120775
44. Sood A., McClain D., Maitra R. et al. *PTEN* gene expression and mutations in the *PIK3CA* gene as predictors of clinical benefit to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in patients with *KRAS* wild-type metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2012;11(2):143–50. DOI: 10.1016/j.clcc.2011.12.001
45. Raghav K., Loree J.M., Morris J.S. et al. Validation of *HER2* amplification as a predictive biomarker for anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in metastatic colorectal cancer. *JCO Precis Oncol* 2019;3:1–13. DOI: 10.1200/PO.18.00226
46. Stintzing S., Wirapati P., Lenz H.-J. et al. Consensus molecular subgroups (CMS) of colorectal cancer (CRC) and first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in the FIRE3 (AIO KRK-0306) trial. *Ann Oncol* 2019;30(11):1796–803. DOI: 10.1093/annonc/mdz387
47. Azad N.S., El-Khoueiry A., Yin J. et al. Combination epigenetic therapy in metastatic colorectal cancer (mCRC) with subcutaneous 5-azacitidine and entinostat: a phase 2 consortium/stand up 2 cancer study. *Oncotarget* 2017;8(21):35326–38. DOI: 10.18632/oncotarget.15108
48. Kaneko M., Kotake M., Bando H. et al. Prognostic and predictive significance of long interspersed nucleotide element-1 methylation in advanced-stage colorectal cancer. *BMC Cancer* 2016;16(1):945. DOI: 10.1186/s12885-016-2984-8
49. Tie J., Cohen K., Lahouel K. et al. Adjuvant chemotherapy guided by circulating tumor DNA analysis in stage II colon cancer: the randomized DYNAMIC trial. *J Clin Oncol* 2022;40(17_suppl.):LBA100. DOI: 10.1200/JCO.2022.40.17_suppl.LBA100

50. Caramés C., Cristóbal I., Moreno V. et al. MicroRNA-21 predicts response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2015;30(7):899–906. DOI: 10.1007/s00384-015-2231-9
51. Han J., Sun W., Liu R. et al. Plasma exosomal miRNA expression profile as oxaliplatin-based chemoresistant biomarkers in colorectal adenocarcinoma. *Front Oncol* 2020;10:1495. DOI: 10.3389/fonc.2020.01495
52. Mlcochova J., Faltejskova-Vychytilova P., Ferracin M. et al. MicroRNA expression profiling identifies miR-31-5p/3p as associated with time to progression in wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Oncotarget* 2015;6(36):38695–704. DOI: 10.18632/oncotarget.5735
53. Malki A., ElRuz R.A., Gupta I. et al. Molecular mechanisms of colon cancer progression and metastasis: recent insights and advancements. *Int J Mol Sci* 2020;22(1):130. DOI: 10.3390/ijms22010130
54. Disoma C., Zhou Y., Li S. et al. Wnt/ β -catenin signaling in colorectal cancer: is therapeutic targeting even possible? *Biochimie* 2022;195:39–53. DOI: 10.1016/j.biochi.2022.01.009
55. Kopetz S., Murphy D.A., Pu J. et al. Molecular profiling of *BRAF*-V600E-mutant metastatic colorectal cancer in the phase 3 BEACON CRC trial. *Nat Med* 2024;30(11):3261–71. DOI: 10.1038/s41591-024-03235-9
56. Morkel M., Riemer P., Bläker H. et al. Similar but different: distinct roles for *KRAS* and *BRAF* oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. *Oncotarget* 2015;6(25):20785–800. DOI: 10.18632/oncotarget.4750
57. Combined study. cBioPortal. Available at: https://www.cbioportal.org/study/summary?id=rectal_radiation_msk_2024%2Ccrc_hta11_htan_2021%2Ccrc_msk_2017%2Ccrc_nigerian_2020%2Ccrc_dd_2022
58. Koncina E., Haan S., Rauh S. et al. Prognostic and predictive molecular biomarkers for colorectal cancer: updates and challenges. *Cancers (Basel)* 2020;12(2):319. DOI: 10.3390/cancers12020319
59. Lichtenstern C.R., Ngu R.K., Shalapour S. et al. Immunotherapy, inflammation and colorectal cancer. *Cells* 2020;9(3):618. DOI: 10.3390/cells9030618
60. Gallois C., Laurent-Puig P., Taieb J. Methylator phenotype in colorectal cancer: a prognostic factor or not? *Crit Rev Oncol Hematol* 2016;99:74–80. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.11.001
61. Кондратова В.Н., Ботезату И.В., Строганова А.М. и др. Гипометилирование *LINE-1* и гиперметилирование *HIST1H4F* как онкомаркеры в жидкостной биопсии колоректального рака. *Успехи молекулярной онкологии* 2024;11(2):85–96. DOI: 10.17650/2313-805X-2024-11-2-85-96
- Kondratova V.N., Botezatu I.V., Stroganova A.M. et al. Hypomethylation of *LINE-1* and hypermethylation of *HIST1H4F* as cancer markers in liquid biopsy of colorectal cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(2):85–96. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2024-11-2-85-96
62. Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Ретрозлементы как мишени таргетной терапии. *Научные результаты биомедицинских исследований* 2024;10(1):5–22. Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Retro elements as targets of targeted therapy. *Nauchnye rezultaty biomeditsinskih issledovaniy = Research Results in Biomedicine* 2024;10(1):5–22. (In Russ.). DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-1-0-1
63. Zeng C., Matsuda K., Jia W.H. et al. Identification of susceptibility loci and genes for colorectal cancer risk. GWAS. Available at: <https://www.ebi.ac.uk/gwas/publications/26965516>
64. De Sousa E.M.F., Wang X., Jansen M. et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med* 2013;19(5):614–8. DOI: 10.1038/nm.3174
65. Rejali L., Seifollahi Asl R., Sanjabi F. et al. Principles of molecular utility for CMS classification in colorectal cancer management. *Cancers (Basel)* 2023;15(10):2746. DOI: 10.3390/cancers15102746
66. Kidess-Sigal E., Liu H.E., Triboulet M.M. et al. Enumeration and targeted analysis of *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* mutations in CTCs captured by a label-free platform: comparison to ctDNA and tissue in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget* 2016;7(51):85349–64. DOI: 10.18632/oncotarget.13350
67. Tarazona N., Gimeno-Valiente F., Gambardella V. et al. Targeted next-generation sequencing of circulating-tumor DNA for tracking minimal residual disease in localized colon cancer. *Ann Oncol* 2019;30(11):1804–12. DOI: 10.1093/annonc/mdz390
68. Strubberg A.M., Madison B.B. MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications. *Dis Model Mech* 2017;10(3):197–214. DOI: 10.1242/dmm.027441

Вклад авторов

А.Д. Шахматова: обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи;
 Е.Д. Мирлина: анализ данных;
 Г.М. Бутрович: подбор литературы по теме статьи;
 О.А. Вострюхина: проведение системного анализа, написание текста статьи;
 В.Н. Вербенко: обобщение данных, написание текста статьи, редактирование.

Author's contributions

A.D. Shachmatova: literature review on the topic of the article, article writing;
 E.D. Mirlina: data analysis;
 G.M. Butrovich: selection articles;
 O.A. Vostrukhina: conducting system analysis, article writing;
 V.N. Verbenko: summarizing data, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID authors

А.Д. Шахматова / A.D. Shachmatova: <https://orcid.org/0000-0003-4879-4359>
 О.А. Вострюхина / O.A. Vostrukhina: <https://orcid.org/0000-0003-3560-9396>
 В.Н. Вербенко / V.N. Verbenko: <https://orcid.org/0000-0002-6264-2688>

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

Финансирование. Работа проведена в соответствии с тематическим планом ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», тема «Перспективные разработки: новые технологии, прикладные исследования» (регистрационный номер 122041900064-5).

Funding. The work was carried out in accordance with the Thematic Plan of the Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Center “Kurchatov Institute”, topic “Promising developments: new technologies, applied research” (registration number 122041900064-5).

Статья поступила: 13.12.2024. **Принята к публикации:** 17.04.2025. **Опубликована онлайн:** 23.06.2025.

Article submitted: 13.12.2024. **Accepted for publication:** 17.04.2025. **Published online:** 23.06.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-22-34>

Вирус Эпштейна–Барр и механизмы молекулярного канцерогенеза

А.Д. Молчанов^{1,2}, А.С. Васильева¹, К.В. Смирнова¹, М.В. Немцова²¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2**Контакты:** Артем Дмитриевич Молчанов m.artem.aug@gmail.com

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) широко распространен среди населения планеты и обуславливает возникновение многих злокачественных новообразований человека. Механизм ВЭБ-ассоциированного канцерогенеза заключается в способности вирусных белков и микроРНК вызывать генетические и эпигенетические изменения, которые могут прямо или косвенно стимулировать клеточный рост, ингибируя апоптоз или защищая опухолевые клетки от влияния, оказываемого на них микроокружением и иммунным ответом хозяина, приводить к развитию таких злокачественных новообразований, как лимфома Беркитта, лимфома Ходжкина, рак носоглотки, желудка и др.

В обзоре рассмотрены молекулярные механизмы канцерогенеза, ассоциированного с ВЭБ, способствующие выживанию этого вируса в клетках хозяина и регулирующие онкобелки. Проанализированы результаты более 500 исследований, проведенных преимущественно в последние 10 лет, из баз данных PubMed, Google Scholar, ResearchGate, Web of Science, РИНЦ (Российский индекс научного цитирования) и CyberLeninka.

Анализ научной литературы показал, что ВЭБ обладает большим арсеналом механизмов для уклонения от иммунного надзора, что обеспечивает его пожизненную персистенцию в организме человека. Ключевую роль в этом играет экспрессия латентных белков (в частности, EBNA1, LMP1 и LMP2A), которые модулируют сигнальные пути клеток хозяина, подавляют апоптоз и изменяют иммунный ответ. Также установлено, что тип латентности, поддерживаемый в инфицированных клетках, влияет на вероятность злокачественной трансформации. Например, латентность II типа характерна для большинства эпителиальных опухолей, тогда как латентность III типа ассоциирована с лимфомами. Переход из латентной в литическую фазу сопровождается экспрессией белков, способствующих онкогенезу. Особое внимание в литературе уделяется роли онкопротейнов LMP1 и LMP2A, которые активируют PI3K/AKT и JAK/STAT пути, нарушая регуляцию клеточной пролиферации и апоптоза. ВЭБ-индуцированные опухоли часто характеризуются эпигенетическими изменениями, поддерживающими вирусную персистенцию и рост опухолевых клеток.

Таким образом, ВЭБ способен оказывать мультифакторное влияние на клетку-хозяина, что делает его важным объектом изучения в онковирусологии. Это подтверждает необходимость дальнейших исследований для уточнения молекулярных механизмов канцерогенеза и разработки таргетных терапевтических подходов к лечению ВЭБ-ассоциированных опухолей.

Ключевые слова: ассоциированная с вирусом Эпштейна–Барр злокачественная опухоль, LMP1, вирус Эпштейна–Барр, патогенез вируса Эпштейна–Барр

Для цитирования: Молчанов А.Д., Васильева А.С., Смирнова К.В., Немцова М.В. Вирус Эпштейна–Барр и механизмы молекулярного канцерогенеза. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(2):22–34.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-22-34>

Epstein–Barr virus and mechanisms of molecular carcinogenesis

A.D. Molchanov^{1,2}, A.S. Vasilyeva¹, K.V. Smirnova¹, M.V. Nemtsova²¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;²Sechenov University, Ministry of Health of Russia; Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia**Contacts:** Artem Dmitrievich Molchanov m.artem.aug@gmail.com

Epstein–Barr virus (EBV) is widespread among the human population and underlies development of numerous malignant neoplasms. The mechanism of EBV-associated carcinogenesis is based on the ability of viral proteins and microRNAs to cause genetic and epigenetic changes which can directly or indirectly stimulate cell growth, inhibit apoptosis, and protect

tumor cells from the effects of their microenvironment and the host's immune response. EBV can lead to development of such malignant neoplasms as Burkitt lymphoma, Hodgkin lymphoma, nasopharyngeal, gastric cancer, etc. The review discusses molecular mechanisms of EBV-associated carcinogenesis promoting the virus's survival in the host's cells, and regulating oncoproteins.

The results of more than 500 studies from the PubMed, Google Scholar, ResearchGate, Web of Science, RSCI (Russian Science Citation Index) and CyberLeninka databases performed primarily in the last 10 years were analyzed.

Literature analysis has shown that EBV has a wide variety of mechanisms to avoid immune surveillance which ensures its lifelong persistence in the human body. Expression of latent proteins (in particular, EBNA1, LMP1, and LMP2A) which modulate the host's signaling pathways, suppress apoptosis, and alter the immune response, plays the key role in its survival. Additionally, it was established that the type of latency maintained in the infected cells affects the probability of malignant transformation. For example, type II latency is characteristic of the majority of epithelial tumors, while type III is associated with lymphomas. Transition from latent to lytic phase is accompanied by expression of proteins promoting carcinogenesis. In the literature, special attention is paid to the roles of LMP1 and LMP2A oncoproteins which activate PI3K/AKT and JAK/STAT pathways disturbing regulation of cell proliferation and apoptosis. EBV-induced tumors are often characterized by epigenetic changes supporting persistence of the virus and tumor cell growth.

Therefore, EBV is capable of exerting multifactorial effects on the host cell which makes it an important subject of cancer virology. This confirms the necessity of further studies for refinement of molecular mechanisms of carcinogenesis and development of targeted therapeutic approaches to treatment of EBV-associated tumors.

Keywords: Epstein–Barr virus-associated malignant tumor, LMP1, Epstein–Barr virus, Epstein–Barr virus pathogenesis

For citation: Molchanov A.D., Vasilyeva A.S., Smirnova K.V., Nemtsova M.V. Epstein–Barr virus and mechanisms of molecular carcinogenesis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(2):22–34. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-22-34>

ВВЕДЕНИЕ

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), относящийся к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Gammaherpesvirinae*, роду *Lymphocryptovirus*, виду Human herpesvirus 4 (HHV-4), является одним из наиболее распространенных в человеческой популяции вирусов, ассоциированных с различными доброкачественными, предраковыми, а также злокачественными новообразованиями (ЗНО). Доля взрослого населения, инфицированного ВЭБ, достигает 95 %. Инфицированность ВЭБ увеличивается с возрастом: в 1–5 лет она составляет 69,9 %, в 20–25 лет – до 96 % [1]. Первичное инфицирование чаще всего происходит в детском возрасте и обычно протекает бессимптомно, однако в подростковом возрасте в 35–50 % случаев оно может привести к возникновению инфекционного мононуклеоза.

Злокачественные новообразования, связанные с ВЭБ, делятся на опухоли лимфоидного и эпителиального происхождения [2]. Помимо лимфомы Беркитта, к ВЭБ-ассоциированным опухолям лимфоидного происхождения относят лимфому Ходжкина, диффузную крупноклеточную В-клеточную, экстра-нодальную Т/НК-клеточную лимфомы, а также более редко встречающуюся плазмобластическую первично выпотную лимфому [3]. ВЭБ-ассоциированными ЗНО эпителиального происхождения являются рак желудка (РЖ) и рак носоглотки (РНГ) [4]. Кроме того, согласно результатам недавно проведенных систематического обзора и метаанализа, между инфекцией ВЭБ и риском развития рака молочной железы также существует ассоциация [5]. С ВЭБ связывают и развитие ряда других опухолей эпителиального происхождения, к которым относятся лимфоэпителиальная карцинома

слюнных желез, лимфоэпителиомоподобная карцинома легкого, почечно-клеточная карцинома, рак щитовидной железы, шейки матки, мочевого пузыря и лейомиомы/лейомиосаркомы у больных с ослабленным иммунитетом (рис. 1) [6]. Важно отметить, что прямое инфицирование ВЭБ нормальных эпителиальных клеток не приводит к их злокачественной трансформации, что указывает на сложный механизм канцерогенеза при этих типах рака [7].

По оценкам Всемирной организации здравоохранения, в 2022 г. в мире зарегистрированы 120 434 случая РНГ и 73 428 случаев смерти от этой патологии [8]. В географических регионах с высокой заболеваемостью РНГ, таких как южные провинции Китая, страны Юго-Восточной Азии и Северной Африки, с ВЭБ связано более 95 % случаев РНГ. Однако в регионах с низким уровнем заболеваемости ВЭБ-ассоциированный РНГ регистрируют значительно реже (75 % случаев). Это обусловлено тем, что в данных регионах неороговевающий недифференцированный РНГ, ассоциированный с ВЭБ, встречается реже [9]. В последние годы заболеваемость РНГ в Австралии и США растет из-за высокой иммиграции населения в эти страны из Азии, что подчеркивает важность исследования новообразований, связанных с ВЭБ [10].

Еще одной социально значимой злокачественной нозологией, ассоциированной с ВЭБ, является РЖ. В 2022 г. в мире выявлены 968 784 новых случая РЖ и 660 175 смертей, связанных с ним [11]. Несмотря на общее снижение заболеваемости и смертности от РЖ в экономически развитых странах, данная патология по-прежнему занимает 5-е место по этим показателям среди онкологических заболеваний [12]. Частота

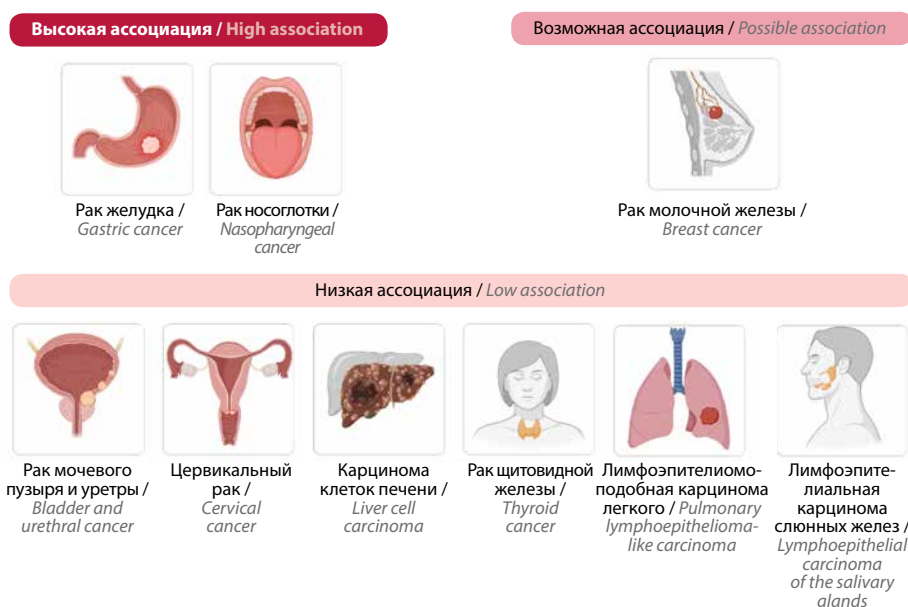


Рис. 1. Злокачественные новообразования разной степени ассоциации с вирусом Эпштейна–Барр

Fig. 1. Malignant neoplasms of varying degrees of association with Epstein–Barr virus

ВЭБ-ассоциированного РЖ в Северной и Южной Америке составляет 11,49 (8,46–15,43) %, в других странах — 8,7 (7,73–9,92) % [13]. Результаты анализа данных 4599 больных РЖ из Азии, Европы и Латинской Америки показали, что ВЭБ-положительный РЖ характеризуется лучшим прогнозом по сравнению с ВЭБ-отрицательным РЖ: средняя выживаемость составляет 8,5 и 5,3 года соответственно [14]. Это указывает на наличие причинно-следственной связи между ВЭБ и РЖ и свидетельствует о различных механизмах канцерогенеза и клинических исходах при этих типах РЖ.

Исследования последних лет показали, что опухолевые клетки, инфицированные ВЭБ, могут постоянно выделять экзосомы, содержащие вирусные белки или нуклеиновые кислоты. Экзосомы, являясь важным компонентом микроокружения опухоли, представляют собой векторы, с помощью которых опухолевые клетки могут стать источником онкогенов, воздействующих на клетки-мишени [15]. Стало известно, что экзосомы, выделяемые из ВЭБ-ассоциированных опухолей, оказывают на неинфицированные клетки не только опухолестимулирующее действие передаваемыми через хромосомы вирусными белками и нуклеиновыми кислотами, но и иммуносупрессивный эффект [16]. Более того, они способны проникать в циркулирующие жидкости и распространяться по всему организму. Технология разделения экзосом по функциональным свойствам постепенно развивается, и они стали использоваться в молекулярно-таргетной терапии в качестве новых носителей для доставки лекарств в опухоли [17]. Ожидается также, что экзосомы станут новым биомаркером или терапевтической мишенью при новообразованиях, ассоциированных с ВЭБ.

Несмотря на широкое распространение ВЭБ и его связь с развитием различных опухолей, универсальных и специфических методов противовирусной терапии пока не существует, а вакцины еще находятся в стадии разработки. Поэтому для эффективной борьбы с этими опухолями необходимо всесторонне изучать механизмы канцерогенеза, ассоциированного с ВЭБ.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР

Вирион ВЭБ состоит из липопротеиновых капсул и икосаэдрического нуклеокапсида, включающего 162 капсомера. Его диаметр составляет около 150–170 нм. Вирусный геном включает двухцепочечную ДНК длиной около 170 т.п.н., которая кодирует 85 генов [18]. Геном ВЭБ также содержит серию терминальных прямых повторов размером 0,5 т.п.н. на его обоих концах и внутренние повторяющиеся последовательности. Они служат для разделения генома на короткие и длинные уникальные домены последовательностей, которые обладают большей кодирующей способностью [19]. Уникальная длинная область генома ВЭБ содержит многочисленные открытые рамки считывания (ORF), кодирующие различные вирусные белки (рис. 2). Эта область обеспечивает способность ВЭБ реплицироваться и экспрессировать свои гены как в латентной, так и в литической фазах, а также кодирует белки, необходимые для репликации вирусной ДНК и производства структурных белков вируса, включая ферменты, участвующие в синтезе и обработке ДНК, такие как ДНК-полимераза и геликаза. Уникальная короткая область генома ВЭБ окружена внутренними повторяющимися последовательностями,

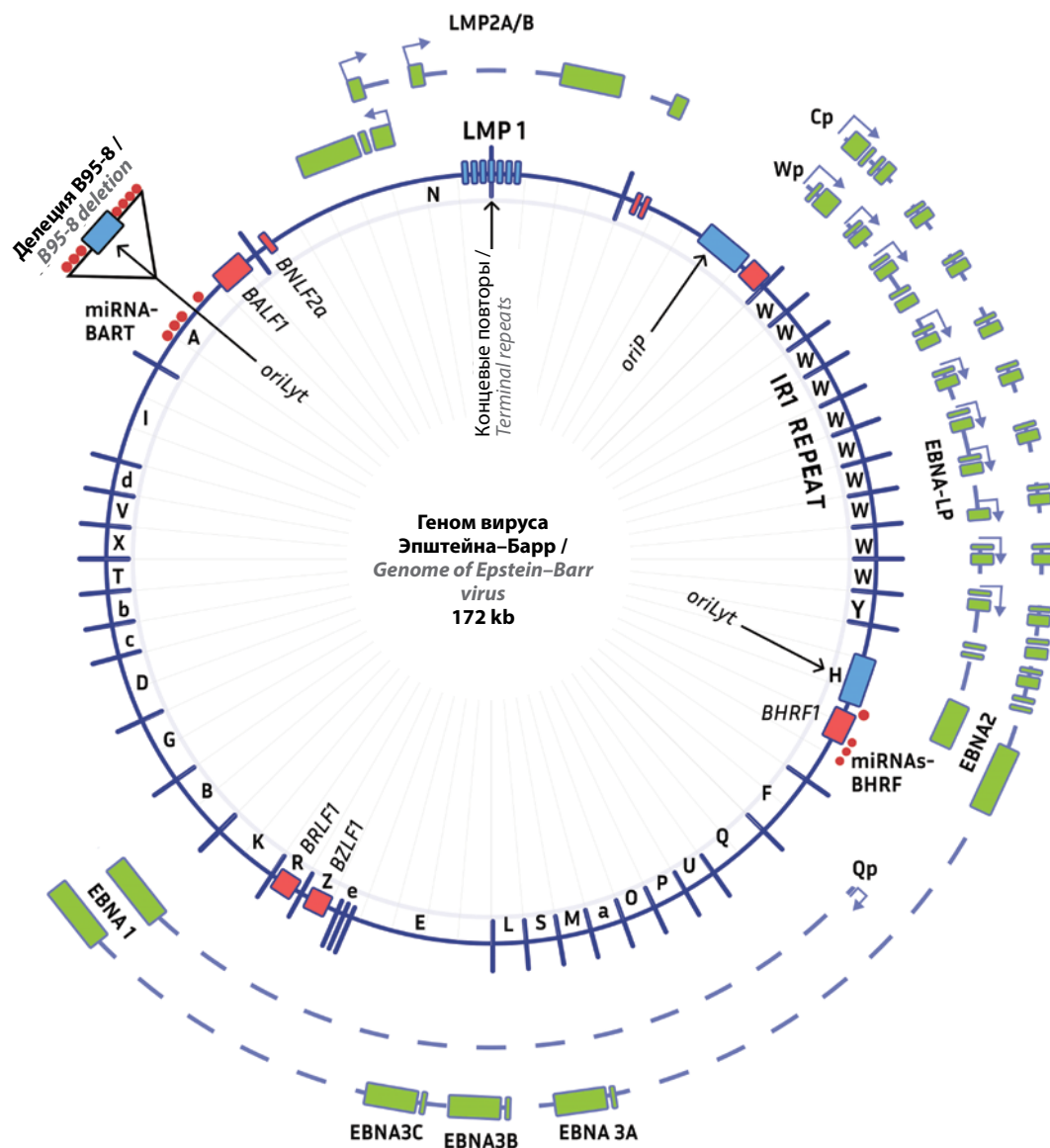


Рис. 2. Геномная организация вируса Эпштейна-Барр [20]

Fig. 2. Genomic organization of the Epstein-Barr virus [20]

которые играют роль в регуляции экспрессии генов и стабильности генома. Эта область включает гены, участвующие в регуляции вирусной транскрипции и уклонения от иммунного ответа.

Жизненный цикл ВЭБ условно разделяют на 3 стадии: этап заражения, латентный период и литический цикл, который может быть представлен стадиями реактивации и репликации.

Этап заражения начинается с попадания ВЭБ в организм, чаще всего через слюну или загрязненные слюной предметы. Вирус проникает в эпителиальные клетки слизистой оболочки полости рта, включая миндалины и слюнные железы, и инициирует литическую фазу инфекции, в которой происходит его репликация [20]. Этому процессу способствует связывание

гликопротеина вирусной оболочки gp350/220 с рецептором CR2/CD21 эпителиальных клеток [21].

На стадии реактивации вирус из латентного состояния вступает в литический цикл, который инициируется экспрессией так называемых ранних генов *BZLF1* и *BRLF1*, кодирующих белки, необходимые для репликации вируса [22]. Ген *BZLF1* кодирует белок ZEBRA (Zta), который взаимодействует с ферментами, модифицирующими гистоны для изменения структуры хроматина. Также ZEBRA влияет на экспрессию вирусных генов и способствует делению клеток, что необходимо для репликации вируса [23, 24]. Ген *BRLF1* кодирует белок Rta (replication transactivator), активирующий гены, участвующие в репликации ДНК и сборке вирусных частиц, а также подавляет иммун-

ный ответ [25]. Еще одним ранним геном, экспрессируемым во время литического цикла, является *BNLF2a*, продукт которого позволяет вирусу проникать в ядро, где происходит большая часть его репликации. Этот ген взаимодействует с ферментами, модифицирующими гистоны, потенциально изменяя структуру или доступность хроматина [26]. Экспрессируемый в начале литического цикла ген *BCRF1* является гомологом человеческого интерлейкина 10 и отвечает за уклонение вируса от иммунного ответа [26].

Переход от латентной фазы к литической может произойти под воздействием различных факторов, таких как подавление иммунитета, воспаление или гормональные нарушения. Во время литической фазы происходит репликация вирусной ДНК, последняя упаковывается в вирусные белки внутри клетки-хозяина. Сформированные вирусные частицы затем лизируют клетку-хозяина с высвобождением новых вирусных частиц, способных инфицировать и другие клетки-мишени [27].

Таким образом, жизненный цикл ВЭБ представляет собой сложный, многостадийный процесс, включающий взаимодействие с иммунной системой хозяина. Это позволяет вирусу сохраняться в организме на протяжении всей жизни хозяина с периодами латентности и потенциальной реактивации.

ЛАТЕНТНЫЕ МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ

В латентной фазе геном ВЭБ сохраняется в виде эписомы в ядре клетки-хозяина, где он экспрессирует ряд латентных белков, включая ядерные (EBNA) и латентные мембранные (LMP) белки. Латентные белки играют ключевую роль в сохранении (персистенции) вируса в организме хозяина в активном состоянии, обеспечивая его онкогенный потенциал [27].

EBNA. В состав EBNA входят 6 ядерных белков: EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C и EBNA-LP. EBNA1 — это ДНК-связывающий фосфопротеин, необходимый для репликации и поддержания генома ВЭБ в эписомальном состоянии в латентно инфицированных клетках [28].

EBNA1 — белок, присутствующий во ЗНО, связанных с ВЭБ. Он играет решающую роль в поддержании вируса в латентной фазе, регулирует синтез генома ВЭБ и транскрипцию вирусных генов. EBNA1 — единственный белок ВЭБ, необходимый для репликации и разделения вирусной эписомы во время латентной инфекции (рис. 3). Он связывается с источником репликации (oriP), направляя клеточный ДНК-полимеразный аппарат для репликации вирусной эписомы, сохраняя вирусный геном в делящихся клетках вирусносителя [29].

EBNA2 — транскрипционный коактиватор, координирующий экспрессию вирусных генов во время латентности III типа, а также трансактивирующий многие клеточные гены. При этом он играет большую роль в immortalization клеток [30]. EBNA2 в первую

очередь служит для повышения регуляции экспрессии вирусных и клеточных генов. Среди них CD23 (поверхностный маркер активированных В-клеток), *c-Myc* (клеточный протоонкоген) и вирусный промотор EBNA-C [31].

EBNA-LP, также известный как EBNA5, является одним из первых вирусных белков, продуцируемых во время заражения В-клеток ВЭБ [32]. Он взаимодействует с EBNA2, чтобы перевести покоящиеся В-лимфоциты в фазу клеточного цикла G1 [33] путем образования молекулярного комплекса с белками-супрессорами ретинобластомы и p53 [34].

EBNA3A, EBNA3B и EBNA3C являются регуляторами транскрипции генов клеток-хозяев [35]. EBNA3A и EBNA3C необходимы для immortalization клеток. EBNA3C функционирует как онкопротеин, который направляет прогрессию клеточного цикла через точку рестрикции фазы G1 [36]. Также он увеличивает экспрессию LMP1 [26, 37].

LMP. Двумя ключевыми латентными мембранными белками являются LMP1 и LMP2. Образованный путем спонтанной кластеризации в мембране трансмембранный белок LMP1 конститутивно имитирует активный рецептор фактора некроза опухоли (TNF), обеспечивая выживание и пролиферацию инфицированной клетки. LMP2A действует как функциональный гомолог В-клеточного рецептора (BCR), защищая В-клетки с пониженной экспрессией BCR от апоптоза и обеспечивая персистенцию вируса [26].

LMP1 на протяжении всего жизненного цикла вируса играет ключевую роль в патогенезе ВЭБ-ассоциированного канцерогенеза, нарушая, перепрограммируя и регулируя широкий спектр клеточных механизмов и функций организма-хозяина [38].

На основании полиморфизма гена *LMP-1* выделены 7 штаммов ВЭБ: Alaskan (AL), China1, China2, China3, B95.8, Mediterranean (Med +/-) и North Carolina (NC) [39].

Сигнальная область LMP1 содержит 3 сайта (3 карбокситерминальные активирующие области): STAR1 (194–232 а.о.), STAR2 (351–386 а.о.) и STAR3 (275–330 а.о.), которые напрямую взаимодействуют с некоторыми клеточными факторами и активируют сигнальные пути транскрипционного ядерного фактора κ B (NF- κ B), N-терминальной киназы c-Jun (JNK), p38 MAPK, JAK/STAT и PI3K/Akt, которые участвуют в регуляции клеточного цикла [40].

Карбокситерминальная область LMP1 содержит домены, связанные с рецептором TNF (TRAF), которые активируют сигнальные преобразователи и активаторы транскрипции (STAT), янус-киназы (JAK) и пути NF- κ B для выживания и роста клеток [41].

Показано, что 5 онкопротеинов ВЭБ и ряд вирусных микроРНК необходимы для превращения первичных В-клеток в непрерывно пролиферирующие лимфобластоидные клеточные линии [42]. Из этих белков только LMP1 трансформирует фибробласты грызунов

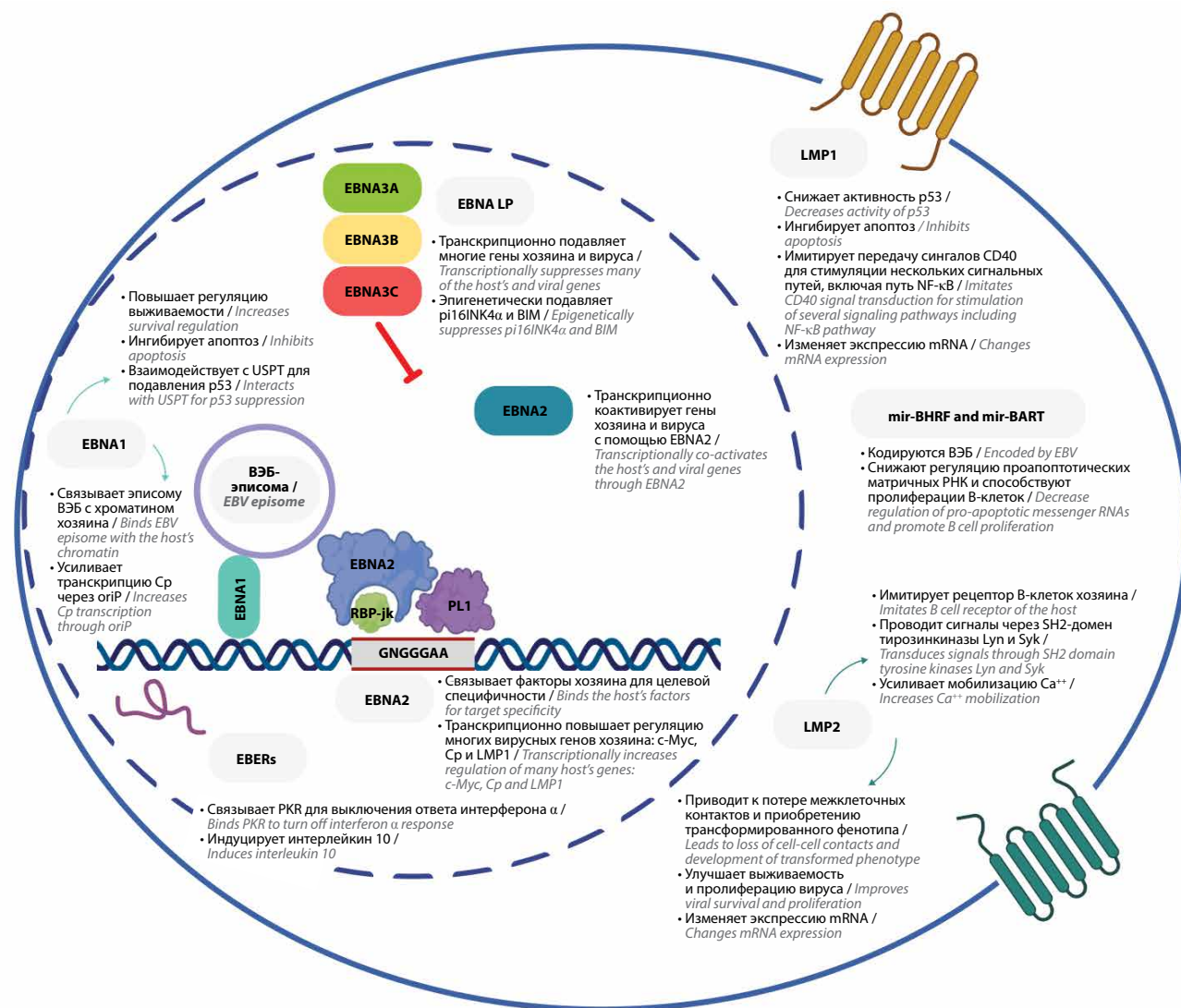


Рис. 3. Функции латентных белков в патогенезе вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ). PKR – протеинкиназа R; NF-κB – транскрипционный ядерный фактор κB [20]

Fig. 3. Functions of latent proteins in the pathogenesis of Epstein–Barr virus (EBV). PKR – protein kinase R; NF- κ B – nuclear factor κ B

и вызывает у мышей В-клеточное лимфопролиферативное заболевание [43]. LMP1 активно экспрессируется при лимфомах, связанных с иммуносупрессией, включая посттрансплантационные лимфопролиферативные заболевания и лимфому Ходжкина [40].

Обнаружено, что LMP1 усиливает образование микроядер в эпителиальных клетках человека RHEK-1 и LMP135 в присутствии или в отсутствие блеомицина — агента, повреждающего ДНК. Микроядра — ядра небольшого размера, возникающие из ацентрических хроматид или фрагментов хромосом. Образование микроядер связано с хромосомными перестройками и широко используется для измерения повреждений хромосом. Экспрессия LMP1 усиливает как спонтанное, так и индуцированное блеомицином образование микроядер, вызванное повреждением ДНК [44].

Ген *LMP2* кодирует 2 белка: LMP2A и LMP2B. Они являются интегральными мембранными белками,

которые различаются по NH₂-терминальным доменам. LMP2A несет дополнительный, состоящий из 118 аминокислотных остатков домен, закодированный в экзоне 1, тогда как экзон 1 LMP2B является некодирующим. NH₂-терминальный домен LMP2A представляет собой цитоплазматический домен и содержит иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина [45].

LMP2 является одним из немногих вирусных белков, экспрессируемых в эпителиальных клетках желудка, инфицированных ВЭБ. Он усиливает экспрессию ДНК-(цитозин-5)-метилтрансферазы-1 (DNMT1) – ключевой метилтрансферазы, подавляя ферменты транслокации 10–11 (Ten-Eleven Translocation/TET) TET1 и TET2, которые являются важными деметилирующими ферментами [46, 47]. ДНК-метилтрансферазы ответственны за добавление метильной группы к 5'-углеродному положению цитозина с образованием 5-метилцитозина (5-mC), что приводит к подавлению транскрипции [48]. Затем

ферменты TET преобразуют 5-метилцитозин в метки 5'-гидроксиметилирования, которые могут запускать дальнейшее гидроксирование или обеспечивать активное деметилирование с помощью механизма репарации ДНК, что приводит к активации транскрипции. На клеточных линиях РЖ, инфицированных ВЭБ, *in vitro* показано, что подавление TET2 с помощью shRNA (small hairpin RNA) увеличивает общее количество чувствительных к метилированию генов, тем самым способствуя метилированию *de novo* [46].

Кроме того, LMP2 способствует выживанию клеток за счет повышения экспрессии сурвивина и активации сигнального пути NF-κB, а также активации канонической передачи сигналов Wnt через β-катенин [49].

EBER1 и EBER2. EBER1 и EBER2 представляют собой неполиаденированные, неэкспированные, некодирующие РНК, состоящие из 167 и 172 нуклеотидов соответственно. Они в изобилии экспрессируются почти во всех инфицированных ВЭБ клетках. EBER1 и EBER2 в дополнение к 2 LMP экспрессируются во всех типах латентности [50]. EBERs вовлечены в индукцию аутокринных факторов роста и поддержание злокачественного фенотипа клеток лимфомы Беркитта, что подтверждает потенциальную роль этих РНК в онкогенезе.

ВИРУСНЫЕ микроРНК

МикроРНК представляют собой одноцепочечные РНК размером 19–25 нуклеотидов, полученные из транскриптов, имеющих структуры «стебель — петля» [51]. Они выполняют разнообразные функции, включая регуляцию клеточной дифференцировки, пролиферации и апоптоза. МикроРНК могут также функционировать как супрессоры опухолей или онкогены [52]. МикроРНК, кодируемые ВЭБ, являются ключевыми элементами в установлении латентной фазы и уклонении от иммунного ответа. В ответ на иммунную реакцию организма микроРНК ВЭБ могут ингибировать экспрессию, презентацию вирусных антигенов и иммунную активность, помогать клеткам-хозяевам избегать иммунной реакции и обеспечивать условия для дальнейшего иммортализованного онкогенеза клеток-хозяев [53]. Обнаружено, что ВЭБ-miR-BART6-5p ингибирует экспрессию EBNA2, а ВЭБ-miR-BHRF1 коактивированного антигена EBNA2 — экспрессию EBNA-LP. Это предполагает, что EBNA и EBNA-LP могут регулироваться микроРНК ВЭБ для избегания иммунного ответа и поддержания латентного периода ВЭБ [53].

Показано, что при РЖ микроРНК ВЭБ играют большую роль в возникновении и прогрессировании заболевания. При РЖ уровни miR-BART6-5p и miR-BHRF1 повышаются, что коррелирует с худшими показателями выживаемости. Эти микроРНК подавляют экспрессию вирусных антигенов и ингибируют иммунный ответ, способствуя развитию и прогрессированию РЖ [54].

ТИПЫ ЛАТЕНТНОСТИ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР

В латентном периоде ВЭБ находится в В-клетках памяти иммунной системы. Существует несколько типов латентности, которые различаются характером экспрессии вирусных генов и классифицируются на основе экспрессии белков EBNA и LMP. Эти формы экспрессии генов эпигенетически стабильны, т. е. сохраняются в течение нескольких клеточных делений и, как правило, соответствуют отдельным первичным транскриптам, которые иницируются разными вирусными промоторами. При латентности I типа EBNA1 транскрибируется, начиная с Qp в BamHI/Q-области генома ВЭБ, в то время как при латентности III типа полицистронная матричная РНК белков EBNA транскрибируется, начиная с Cp, расположенного в BamHI-C-области генома ВЭБ [55]. При латентности III типа вирус экспрессирует 6 ядерных антигенов ВЭБ — EBNA: EBNA-LP, -1, -2, -3a, -3b и -3c, а также 3 латентных мембранных белка — LMP1, LMP2A и 2B. Латентность II типа характеризуется экспрессией EBNA1, LMP1 и LMP2A, I типа — экспрессией только EBNA1. Существует также латентность 0-го типа, при которой экспрессия вирусных белков может отсутствовать или экспрессируется только LMP2A [29] (рис. 4). Эти типы связаны с различными формами ЗНО (рис. 5). Латентность I типа связана с лимфомой Беркитта, а при лимфомах Ходжкина и Т-клеточных лимфомах обычно наблюдается латентность II типа, при котором экспрессируются EBNA1 и 3 латентных мембранных белка (LMP1, 2A и 2B) [56]. Хотя большинство ВЭБ-положительных лимфом Беркитта имеют латентность I типа, некоторые линии клеток опухоли во время культивирования *in vitro* демонстрируют латентность III типа, например клетки Раджи [38]. Инфекция ВЭБ не вызывает клональную экспансию в первичных эпителиальных клетках, все эпителиальные новообразования, ассоциированные с ВЭБ (кроме РЖ, для которого характерен смешанный тип латентности), демонстрируют экспрессию вирусных белков, характерных для латентности II типа [16, 57] (см. рис. 4).

Вирус Эпштейна–Барр может устанавливать тип латентности в инфицированных клетках посредством нескольких паттернов, каждый из которых характеризуется экспрессией уникального набора вирусных белков. При РЖ наиболее распространена латентность I типа, при которой экспрессируется только ограниченный набор вирусных генов. Сюда входят *EBNA1*, *EBER*, *BART* (двунаправленные алгоритмические повторяющиеся транскрипты) и иногда *LMP2A*. Экспрессия этих генов может привести к различным клеточным изменениям, таким как иммортализация инфицированных клеток, уклонение от апоптоза и модуляция клеточных сигнальных путей, что способствует развитию онкогенеза [13].

Виды латентности / Types of latency				
Латентность 0 / Latency 0	Латентность I / Latency I	Латентность IIa / Latency IIa	Латентность IIb / Latency IIb	Латентность III / Latency III
EBERs	EBERs	EBERs	EBERs	EBERs
	BARTs	BARTs	BARTs	BARTs
	EBNA	EBNA1	EBNA-LP	EBNA-LP
		LMP1	EBNA3	EBNA3
		LMP2	EBNA2	EBNA2
			EBNA1	EBNA1
				LMP1
				LMP2
Ассоциированные злокачественные новообразования / Associated malignant neoplasms				
	ВЭБ ⁺ -РЖ, лимфома Беркитта / EBV ⁺ -GC, Burkitt lymphoma	ВЭБ ⁺ -РЖ, ВЭБ ⁺ -РН, диффузная В-крупноклеточная лимфома, классическая и узловая лимфомы Ходжкина / EBV ⁺ -GC, EBV ⁺ -NC, diffuse large B cell lymphoma, classical and nodular Hodgkin lymphoma		Диффузная В-крупноклеточная лимфома / Diffuse large B cell lymphoma

Рис. 4. Латентные программы с характерной экспрессией вирусных генов и ассоциированными с ними злокачественными новообразованиями. ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр; РЖ – рак желудка; РН – рак носоглотки

Fig. 4. Latent programs with characteristic expression of viral genes and associated malignant neoplasms. EBV – Epstein–Barr virus; GC – gastric cancer; NC – nasopharyngeal cancer

РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Сигнальные пути митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), фосфоинозитид-3-киназы (PI3K)/АКТ, NF-κB и STAT играют ключевую роль в обеспечении способностей вируса переходить в латентное состояние, уклоняться от иммунного ответа и таким образом стимулировать канцерогенез. Сигнальный путь МАРК принимает участие в таких клеточных процессах, как пролиферация, дифференцировка и апоптоз [58]. Регуляция данного пути осуществляется с помощью LMP1 (см. рис. 5), который стимулирует сигнальный путь ERK-МАРК в эпителиальных клетках посредством каскада Raf-МЕК-ERK-МАРК, независимо от Ras, что приводит к трансформации и выживанию инфицированных клеток. Ингибирование пути p38 МАРК, вызывающего апоптоз и предотвращающего реактивацию ВЭБ в клетках лимфомы Беркитта, необходимо для поддержания жизнеспособности клеток во время реактивации вируса [59].

Путь NF-κB регулирует иммунный ответ, воспаление, рост и выживание клеток с помощью активации LMP1, который является мощным активатором как канонических, так и неканонических путей NF-κB. Конститутивная активация NF-κB ВЭБ приводит к онкогенезу, благодаря стимуляции экспрессии антиапоптотических генов и факторов, которые способствуют уклонению от иммунного ответа и пролиферации клеток [60]. Это особенно важно для ассоциированных с ВЭБ ЗНО, в которых активация NF-κB приводит к повышенной экспрессии генов, подавляющих апоптоз и способствующих ангиогенезу и метастазированию [61]. Путь NF-κB взаимодействует с другими сиг-

нальными путями, такими как PI3K/АКТ и JAK/STAT, что вызывает трансформацию клеток хозяина и способствует поддержанию латентного состояния.

Путь PI3K/АКТ – еще один ключевой сигнальный каскад, используемый ВЭБ для стимулирования онкогенеза и воздействия на клеточные процессы. LMP1 и LMP2A являются активаторами сигнального пути PI3K/АКТ, ведущего к увеличению выживаемости и пролиферации инфицированных клеток, что достигается за счет повышения уровня антиапоптотических белков и регуляторов клеточного цикла [62]. Также LMP1 и LMP2A стимулируют ангиогенез посредством сигнального каскада PI3K/АКТ/фактор, индуцируемый гипоксией 1α (HIF-1α)/CCL5, который имеет решающее значение для роста и метастазирования опухоли [63].

Путь передачи сигналов и активации транскрипции STAT играет большую роль в трансляции информации от внеклеточных сигналов к ядру клетки, что приводит к изменениям в экспрессии генов. LMP1 может активировать сигнальный путь JAK/STAT, способствуя экспрессии белков выживания, таких как лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1), Bcl-xL и COX-2, которые участвуют в уклонении от иммунного ответа и антиапоптотических процессах. Эпигенетические изменения сигнального пути STAT приводят к аномальной активации и развитию онкогенеза [64].

Все вышеупомянутые сигнальные пути взаимосвязаны и работают сообща, содействуя онкогенезу, путем сохранения вируса и уклонения от иммунного ответа. При этом LMP1 и LMP2A играют ключевую

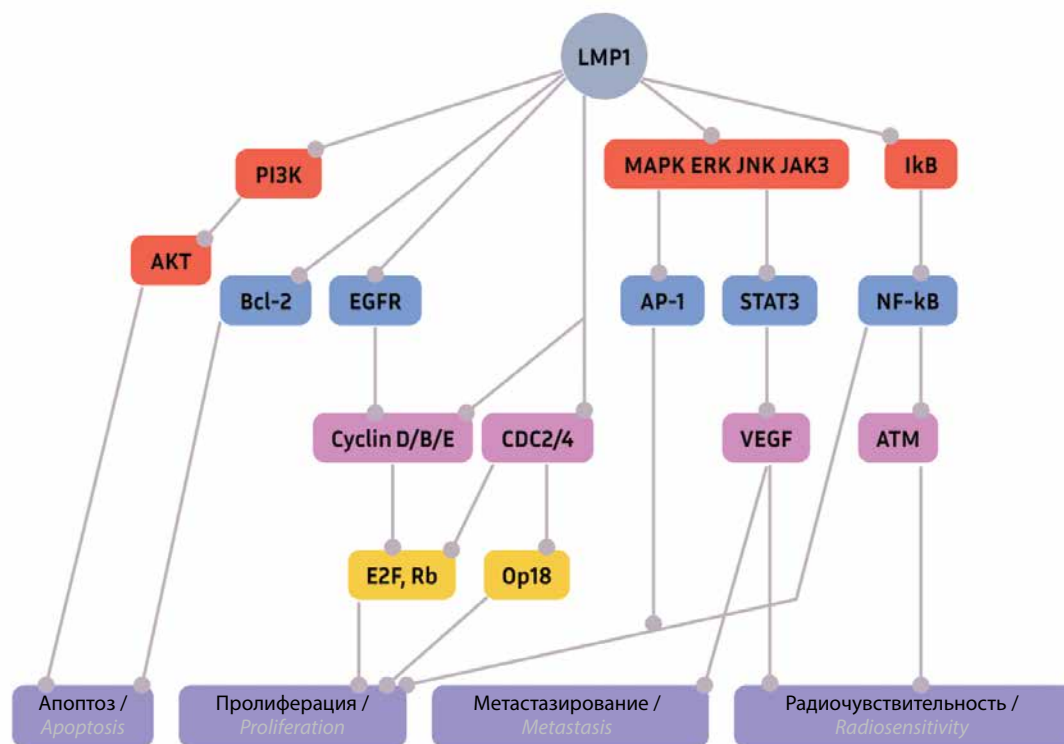


Рис. 5. Молекулярные взаимодействия и сигнальные пути LMP1 в канцерогенезе
Fig. 5. Molecular interactions and signaling pathways of LMP1 in carcinogenesis

роль в активации данных путей, обеспечивающих усиление выживаемости, пролиферации и трансформации клеток.

Для эффективного роста опухолей необходимо достаточное кровоснабжение, за что отвечает фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) — сигнальный белок, который играет ключевую роль как в васкулогенезе, так и в ангиогенезе. В первую очередь этот фактор известен своей способностью повышать проницаемость сосудов и стимулировать рост эндотелиальных клеток [65]. Функционирование VEGF осуществляется посредством взаимодействия с рецепторами эндотелиальных клеток, что способствует их пролиферации и миграции. ВЭБ значительно повышает экспрессию VEGF в клетках хозяина, стимулируя ангиогенез опухоли несколькими способами. В частности, LMP1 активирует различные сигнальные пути, в том числе NF-κB и AP-1, которые усиливают транскрипцию VEGF [66]. LMP1 и LMP2A активируют сигнальный каскад PI3K/AKT/мишень рапамицина млекопитающих (mTOR), что приводит к стабилизации и активации HIF-1α, напрямую регулирующего экспрессию VEGF. ВЭБ может влиять на экспрессию HIFs, которые являются важнейшими регуляторами VEGF в условиях низкого содержания кислорода. Взаимодействие между белками ВЭБ и HIFs способствует ангиогенезу, опосредованному VEGF [66].

Переключение латентного и литического состояний имеет важное значение для патогенеза ВЭБ. Этот

процесс регулируется несколькими промоторами вирусного генома, в частности промоторами W, C и Q. Промоторы W (Wp) и C (Cp) играют большую роль в установлении и поддержании латентности. Промотор W является одним из первых промоторов, активируемых во время инфицирования ВЭБ. Он регулирует экспрессию белков EBNA2, необходимых для трансформации клеток в пролиферирующие лимфоциты, что ведет к закреплению вируса в иммунной системе хозяина. По мере развития инфекции осуществляется переход от Wp к Cp [67]. Промотор C является основным фактором, регулирующим экспрессию белка EBNA при латентности III типа, которая связана с пролиферацией инфицированных клеток и характерна для людей с ослабленным иммунитетом. Промотор Q (Qp) активируется при латентности I типа, стимулирует экспрессию EBNA1, способствует ускользанию от иммунного ответа, позволяя вирусу сохраняться в В-клетках памяти и формируя долговременную латентную инфекцию [68]. Активность промоторов контролируется эпигенетическими механизмами, включая метилирование ДНК и модификацию гистонов. При латентности I типа промоторы Cp и Wp гиперметилированы и неактивны, в то время как Qp остается неметилированным и активным. Пространственная организация генома ВЭБ играет большую роль в выборе промотора. Эхансер OriP образует петли с Qp или Cp, опосредованные фактором связывания CCCTC (CTCF), влияя на тип латентности [69].

Хотя промоторы в первую очередь связаны с латентной фазой, их регуляция также ассоциирована с переходом от латентного состояния к литическому. Переход, включающий изменение использования промоторов, необходим для репликации вируса и производства новых вирионов, что может привести к распространению вируса и потенциально вызвать проявления болезни.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

Метилирование ДНК является одним из основных эпигенетических механизмов в канцерогенезе ВЭБ. Доказано, что самый высокий уровень гиперметилирования клеточной ДНК наблюдается при карциноме желудка, ассоциированной с ВЭБ, а также при ВЭБ-положительных лимфоме Беркитта и РНГ, но в меньшей степени [47]. Сразу после заражения клеток происходит кратковременная низкоуровневая экспрессия вирусных генов из неметилированного генома ВЭБ. Однако вирусный геном быстро подвергается метилированию ДНК в CpG-мотивах и переходит в одну из нескольких форм латентности с ограниченной экспрессией вирусных генов [70]. В течение латентной фазы около 90 % генов ВЭБ не экспрессируются ни в одном из типов лимфом и карцином, ассоциированных с ВЭБ. Это относится и к генам, отвечающим за экспрессию белков, которые вызывают наибольший иммунный ответ Т-клеток (семейство EBNA 2 и 3) [71]. Кроме того, гены литического цикла (особенно *BZLF1*, *BRLF1*, *BMRF1* и *BMLF1*), обладающие высокой иммунной активностью, также неактивны [72]. Геном ВЭБ содержит множество вызывающих иммунный ответ генов, которые часто подавляются гиперметилированием ДНК. Примером наиболее важных гиперметилированных промоторов генов являются промоторы, участвующие в регуляции клеточного цикла (p14ARF, p15, p16INK4A и p73), репарации ДНК (hMLH1, MGMT и GSTP1), клеточной адгезии и метастазировании (CDH1, TIMP1 и TIMP3), апоптозе (DAPK и bcl-2) и передаче сигналов (APC, PTEN и RASSF1A) [72]. Установлено *de novo*, что метилирование клеточной ДНК происходит в течение нескольких дней после заражения ВЭБ при участии генов *LMP1* и *LMP2A*. *LMP1* активирует экспрессию метилтрансфераз, способствуя как инициации, так и поддержанию изменений в процессе метилирования ДНК [73]. *LMP2A* вызывает усиление экспрессии метилтрансферазы и снижение экспрессии гена *TET*, что приводит к увеличению метилирования ДНК при онкопатологиях, ассоциированных с ВЭБ [71].

Еще одним эпигенетическим процессом является модификация гистонов, представляющая собой посттрансляционное изменение их хвостов, которое в основном происходит по остаткам лизина и аргинина. Высокий уровень триметилирования H3K4 (H3K4me3) или ацетилирования H3K27 (H3K27ac) в промоторах необходим для нормального развития и дифференци-

ровки тканей, в то время как мутации этих модуляторов и aberrации модификаций гистонов связаны с развитием ЗНО [74]. Модификации гистонов включают метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, убиквитинирование и сумоилирование. Модификации гистонов регулируют доступность ДНК-метилтрансферазы, белков комплекса PcG и факторов транскрипции, а также служат связующим звеном между метилированием ДНК и активностью промотора CpG [75]. Ацетилирование гистонов приводит к дестабилизации хроматина, что делает открытой структуру промотора, благодаря чему он становится доступным для основных факторов транскрипции. Уровни ацетилирования гистонов в латентной фазе низкие и повышаются при реактивации. Подавление экспрессии промотора *BZLF1* в латентно инфицированных клетках зависит исключительно от уровня ацетилирования гистонов, поскольку ингибиторы гистондеацетилазы (бутират натрия или трихостатин А) могут ингибировать это подавление [76].

Еще одним ключевым для понимания патогенеза ВЭБ эпигенетическим процессом является ремоделирование хроматина. Этот процесс необходим для осуществления различных клеточных функций, включая экспрессию генов, репликацию ДНК и репарацию. ВЭБ использует механизмы ремоделирования хроматина для установления и поддержания типа латентности в клетках-хозяевах. Во время латентности вирусный геном поддерживается в репрессированном состоянии, при этом большинство литических генов ингибируются посредством метилирования ДНК и модификации гистонов [77]. Ремоделирование хроматина играет большую роль в регуляции экспрессии как латентных, так и литических генов ВЭБ. Репрессор транскрипции CTCF и когезин (факторы организации хроматина) участвуют в формировании хроматиновых петель, которые регулируют экспрессию и латентность вирусных генов. Участки связывания CTCF в геноме ВЭБ предотвращают распространение репрессивных хроматиновых меток и поддерживают экспрессию основных вирусных генов [78]. Белок EBNA2 облегчает активацию вирусных промоторов, влияя на переключение между латентностью и литической репликацией [77]. Ремоделирование хроматина играет также ключевую роль в переходе из латентной в литическую фазу. Вирусный белок *BZLF1* взаимодействует с такими комплексами ремоделирования хроматина, как INO80. *BZLF1* связывается с неактивным (молчащим) хроматином, привлекая INO80, который способствует удалению нуклеосом. Этот процесс устанавливает транскрипционно активное состояние хроматина, которое необходимо для экспрессии ранних литических генов и последующей репликации вируса [79]. ВЭБ не только ремоделирует свой хроматин, но и влияет на структуру хроматина хозяина, что приводит к ингибированию генов-супрессоров опухолей [80].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунная система играет большую роль в контроле репликации вируса, но ВЭБ имеет ряд механизмов, позволяющих ему избегать иммунного ответа, и сохраняется в организме носителя в течение всей жизни. Патогенный механизм, лежащий в основе ВЭБ, сложен и может затрагивать различные системы, проявляясь в виде нетипичных клинических симптомов и признаков и приводя к возникновению различных доброкачественных или злокачественных опухолей. В клетках хозяина, помимо контроля транскрипции, посттранскрипционные модификации, передача сигналов и эпигенетическая регуляция в совокупности могут определять, останется ли ВЭБ в латентной фазе или перейдет в литическую. Кроме того, регуляция латентно-литического переключения в жизненном

цикле этого вируса частично зависит от генных продуктов, кодируемых им. Важно отметить, что экспрессия литических белков, которые приводят к онкогенезу, определяет патогенетическую роль инфекции при ЗНО человека.

Таким образом, необходимы дальнейшие исследования как *in vivo*, так и *in vitro* для детального изучения молекулярных механизмов патогенеза ВЭБ, его влияния на развитие ЗНО, определения точных механизмов ВЭБ-индуцированного канцерогенеза и изучения злокачественных опухолей, ассоциированных с ВЭБ. Также важно выяснить роль онкопротеинов в нарушении регуляции ингибиторов апоптоза, иммунного ответа и клеточной пролиферации, что будет способствовать разработке таргетной стратегии лечения ВЭБ-ассоциированных ЗНО.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kuri A., Jacobs B.M., Jacobs B.M. et al. Epidemiology of Epstein–Barr virus infection and infectious mononucleosis in the United Kingdom. *BMC Public Health* 2020;20:1–9. DOI: 10.1186/S12889-020-09049-X/TABLES/3
2. Ok C.Y., Li L., Young K.H. EBV-driven B-cell lymphoproliferative disorders: from biology, classification and differential diagnosis to clinical management. *Exp Mol Med* 2015;47(1):e132. DOI: 10.1038/emmm.2014.82
3. Shannon-Lowe C., Rickinson A.B., Bell A.I. Epstein–Barr virus-associated lymphomas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2017;372(1732):20160271. DOI: 10.1098/RSTB.2016.0271
4. Lung R.W.M., Tong J.H.M., To K.F. Emerging roles of small Epstein–Barr virus derived non-coding RNAs in epithelial malignancy. *Int J Mol Sci* 2013;14(9):17378–409. DOI: 10.3390/IJMS140917378
5. Farahmand M., Monavari S.H., Shoja Z. et al. Epstein–Barr virus and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Future Oncol* 2019;15(24):2873–85. DOI: 10.2217/FON-2019-0232
6. Shimakage M., Kawahara K., Harada S. et al. Expression of Epstein–Barr virus in renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 2007;18(1):41–6. DOI: 10.3892/OR.18.1.41
7. Young L.S., Yap L.F., Murray P.G. Epstein–Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nat Rev Cancer* 2016;16(12):789–802. DOI: 10.1038/nrc.2016.92
8. Stomach. Cancer today. Globocan 2022. Available at: <https://gco.iarc.who.int/media/ /factsheets/cancers/7-stomach-fact-sheet.pdf>
9. Peterson B.R., Nelson B.L. Nonkeratinizing undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck Pathol* 2013;7(1):73–5. DOI: 10.1007/S12105-012-0401-4
10. Jemal A., Bray F., Center M.M. et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61(2):69–90. DOI: 10.3322/CAAC.20107
11. Nasopharynx. Cancer today. Globocan 2022. Available at: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/4-nasopharynx-fact-sheet.pdf>
12. Catalano V., Labianca R., Beretta G.D. et al. Gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;71(2):127–64. DOI: 10.1016/J.CRITREVONC.2009.01.004
13. Tavakoli A., Monavari S.H., Solaymani Mohammadi F. et al. Association between Epstein–Barr virus infection and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 2020;20(1):493. DOI: 10.1186/S12885-020-07013-X
14. Camargo M.C., Kim W.H., Chiaravalli A.M. et al. Improved survival of gastric cancer with tumour Epstein–Barr virus positivity: an international pooled analysis. *Gut* 2014;63(2):236–43. DOI: 10.1136/GUTJNL-2013-304531
15. Higuchi H., Yamakawa N., Imadome K.I. et al. Role of exosomes as a proinflammatory mediator in the development of EBV-associated lymphoma. *Blood* 2018;131(23):2552–67. DOI: 10.1182/BLOOD-2017-07-794529
16. Lo A.K.F., Dawson C.W., Lung H.L. et al. The role of EBV-encoded LMP1 in the NPC tumor microenvironment: from function to therapy. *Front Oncol* 2021;11:640207. DOI: 10.3389/FONC.2021.640207/BIBTEX
17. Chen W., Xie Y., Wang T. et al. New insights into Epstein–Barr virus-associated tumors: exosomes (review). *Oncol Rep* 2022;47(1):13. DOI: 10.3892/or.2021.8224
18. Machón C., Fàbrega-Ferrer M., Zhou D. et al. Atomic structure of the Epstein–Barr virus portal. *Nat Commun* 2019;10(1):1–7. DOI: 10.1038/s41467-019-11706-8
19. Price A.M., Luftig M.A. Dynamic Epstein–Barr virus gene expression on the path to B-cell transformation. *Adv Virus Res* 2014;88:279–313. DOI: 10.1016/B978-0-12-800098-4.00006-4
20. Smatti M.K., Al-Sadeq D.W., Ali N.H. et al. Epstein–Barr virus epidemiology, serology, and genetic variability of LMP-1 oncogene among healthy population: an update. *Front Oncol* 2018;8:211. DOI: 10.3389/FONC.2018.00211
21. Zhang A., Liu Q., Zhao H. et al. Phenotypic characterization of nanshi oral liquid alters metabolic signatures during disease prevention. *Sci Rep* 2016;6:1–10. DOI: 10.1038/srep19333
22. Liang C.L., Chen J.L., Hsu Y.P.P. et al. Epstein–Barr virus BZLF1 gene is activated by transforming growth factor-beta through cooperativity of Smads and c-Jun/c-Fos proteins. *J Biol Chem* 2002;277(26):23345–57. DOI: 10.1074/JBC.M107420200
23. Zhao M., Nanbo A., Becnel D. et al. Ubiquitin modification of the Epstein–Barr virus immediate early transactivator Zta. *J Virol* 2020;94(22):e01298–20. DOI: 10.1128/JVI.01298-20
24. Soldan S.S., Lieberman P.M. Epstein–Barr virus and multiple sclerosis. *Nat Rev Microbiol* 2022;21(1):51–64. DOI: 10.1038/s41579-022-00770-5
25. Long X., Yang Z., Li Y. et al. BRLF1-dependent viral and cellular transcriptomes and transcriptional regulation during EBV primary infection in B lymphoma cells. *Genomics* 2021;113(4):2591–604. DOI: 10.1016/J.YGENO.2021.05.039

26. Huang W., Bai L., Tang H. Epstein–Barr virus infection: the micro and macro worlds. *Virol J* 2023;20(1):1–13. DOI: 10.1186/S12985-023-02187-9/TABLES/1
27. Murata T., Sugimoto A., Inagaki T. et al. Molecular basis of Epstein–Barr virus latency establishment and lytic reactivation. *Viruses* 2021;13(12):2344. DOI: 10.3390/V13122344
28. Middleton T., Sugden B. Retention of plasmid DNA in mammalian cells is enhanced by binding of the Epstein–Barr virus replication protein EBNA1. *J Virol* 1994;68(6):4067–71. DOI: 10.1128/JVI.68.6.4067-4071.1994
29. Morales-Sanchez A., Fuentes-Panana E.M. Epstein–Barr virus-associated gastric cancer and potential mechanisms of oncogenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 2017;17(6):534–54. DOI: 10.2174/1568009616666160926124923
30. Ling P.D., Rawlins D.R., Hayward S.D. The Epstein–Barr virus immortalizing protein EBNA-2 is targeted to DNA by a cellular enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(20):9237–41. DOI: 10.1073/PNAS.90.20.9237
31. Kaiser C., Laux G., Eick D. et al. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein–Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* 1999;73(5):4481–4. DOI: 10.1128/JVI.73.5.4481-4484.1999
32. Wensing B., Farrell P.J. Regulation of cell growth and death by Epstein–Barr virus. *Microbes Infect* 2000;2(1):77–84. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)00282-3
33. Sinclair A.J., Palmero I., Peters G. et al. EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein–Barr virus. *EMBO J* 1994;13(14):3321–8. DOI: 10.1002/J.1460-2075.1994.TB06634.X
34. Szekely L., Selivanova G., Magnusson K.P. et al. EBNA-5, an Epstein–Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(12):5455–9. DOI: 10.1073/PNAS.90.12.5455
35. Styles C.T., Paschos K., White R.E. et al. The cooperative functions of the EBNA3 proteins are central to EBV persistence and latency. *Pathogens* 2018;7(1):31. DOI: 10.3390/PATHOGENS7010031
36. Parker G.A., Touitou R., Allday M.J. Epstein–Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis. *Oncogene* 2000;19(5):700–9. DOI: 10.1038/sj.onc.1203327
37. Allday M.J., Farrell P.J. Epstein–Barr virus nuclear antigen EBNA3C/6 expression maintains the level of latent membrane protein 1 in G1-arrested cells. *J Virol* 1994;68(6):3491–8. DOI: 10.1128/JVI.68.6.3491-3498.1994
38. Wang L., Ning S. New look of EBV LMP1 signaling landscape. *Cancers (Basel)* 2021;13(21):5451. DOI: 10.3390/CANCERS13215451
39. Wang H.Y., Sun L., Li P. et al. Sequence variations of Epstein–Barr virus-encoded small noncoding RNA and latent membrane protein 1 in hematologic tumors in Northern China. *Intervirology* 2021;64(2):69–80. DOI: 10.1159/000510398
40. Wang L.W., Jiang S., Gewurz B.E. Epstein–Barr virus LMP1-mediated Oncogenicity. *J Virol* 2017;91(21):e01718–16. DOI: 10.1128/JVI.01718-16
41. Wang A., Zhang W., Jin M. et al. Differential expression of EBV proteins LMP1 and BHFR1 in EBV-associated gastric and nasopharyngeal cancer tissues. *Mol Med Rep* 2016;13(5):4151–8. DOI: 10.3892/MMR.2016.5087
42. Chen J., Zhang X., Jardtetzky T.S. et al. The Epstein–Barr virus (EBV) glycoprotein B cytoplasmic C-terminal tail domain regulates the energy requirement for EBV-induced membrane fusion. *J Virol* 2014;88(20):11686–95. DOI: 10.1128/JVI.01349-14
43. Zhang B., Kracker S., Yasuda T. et al. Immune surveillance and therapy of lymphomas driven by Epstein–Barr virus protein LMP1 in a mouse model. *Cell* 2012;148(4):739–51. DOI: 10.1016/J.CELL.2011.12.031
44. Liu M.T., Chen Y.R., Chen S.C. et al. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 induces micronucleus formation, represses DNA repair and enhances sensitivity to DNA-damaging agents in human epithelial cells. *Oncogene* 2004;23(14):2531–9. DOI: 10.1038/sj.onc.1207375
45. Cen O., Longnecker R. Latent membrane protein 2 (LMP2). *Curr Top Microbiol Immunol* 2015;391:151–80. DOI: 10.1007/978-3-319-22834-1_5
46. Namba-Fukuyo H., Funata S., Matsusaka K. et al. TET2 functions as a resistance factor against DNA methylation acquisition during Epstein–Barr virus infection. *Oncotarget* 2016;7(49):81512–26. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.13130
47. Stanland L.J., Luftig M.A. The role of EBV-induced hypermethylation in gastric cancer tumorigenesis. *Viruses* 2020;12(11):1222. DOI: 10.3390/V12111222
48. Kohli R.M., Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 2013;502(7472):472–9. DOI: 10.1038/NATURE12750
49. Portis T., Longnecker R. Epstein–Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene* 2004;23(53):8619–28. DOI: 10.1038/SJ.ONC.1207905
50. Dümpelmann E., Mittendorf H., Benecke B.J. Efficient transcription of the EBER2 gene depends on the structural integrity of the RNA. *RNA* 2003;9(4):432–42. DOI: 10.1261/RNA.2176603
51. Kim D.N., Chae H.-S., Oh S.T. et al. Expression of viral microRNAs in Epstein–Barr virus-associated gastric carcinoma. *J Virol* 2007;81(2):1033–6. DOI: 10.1128/JVI.02271-06
52. Esquela-Kerschner A., Slack F.J. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6(4):259–69. DOI: 10.1038/NRC1840
53. Li W., He C., Wu J. et al. Epstein Barr virus encodes miRNAs to assist host immune escape. *J Cancer* 2020;11(8):2091–100. DOI: 10.7150/JCA.42498
54. Zebardast A., Tehrani S.S., Latifi T. et al. Critical review of Epstein–Barr virus microRNAs relation with EBV-associated gastric cancer. *J Cell Physiol* 2021;236(9):6136–53. DOI: 10.1002/JCP.30297
55. Tempera I., Klichinsky M., Lieberman P.M. EBV latency types adopt alternative chromatin conformations. *PLoS Pathog* 2011;7(7):e1002180. DOI: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1002180
56. Frappier L. Epstein–Barr virus: current questions and challenges. *Tumour Virus Res* 2021;12:200218. DOI: 10.1016/J.TVR.2021.200218
57. Yin H., Qu J., Peng Q. et al. Molecular mechanisms of EBV-driven cell cycle progression and oncogenesis. *Med Microbiol Immunol* 2019;208(5):573–83. DOI: 10.1007/S00430-018-0570-1
58. Luo Y., Liu Y., Wang C. et al. Signaling pathways of EBV-induced oncogenesis. *Cancer Cell Int* 2021;21(1):1–11. DOI: 10.1186/S12935-021-01793-3/FIGURES/6
59. Moon S.H., Park N.S., Noh M.H. et al. Olaparib-induced apoptosis through EBNA1-ATR-p38 MAPK signaling pathway in Epstein–Barr virus-positive gastric cancer cells. *Anticancer Res* 2022;42(1):555–63. DOI: 10.21873/ANTICANRES.15513
60. Hoeger B., Serwas N.K., Boztug K. Human NF-κB1 haploinsufficiency and Epstein–Barr virus-induced disease-molecular mechanisms and consequences. *Front Immunol* 2018;8:325993. DOI: 10.3389/FIMMU.2017.01978/BIBTEX
61. Zhang Y., Liu W., Zhang W. et al. Constitutive activation of the canonical NF-κB signaling pathway in EBV-associated gastric carcinoma. *Virology* 2019;532:1–10. DOI: 10.1016/J.VIROL.2019.03.019
62. Chen J. Roles of the PI3K/Akt pathway in Epstein–Barr virus-induced cancers and therapeutic implications. *World J Virol* 2012;1(6):154–61. DOI: 10.5501/wjv.v1.i6.154
63. Li H., Zhu J., He M. et al. Marek's disease virus activates the PI3K/Akt pathway through interaction of its protein Meq with the P85 subunit of PI3K to promote viral replication. *Front Microbiol* 2018;9:2547. DOI: 10.3389/FMICB.2018.02547/BIBTEX

64. El-Sharkawy A., Al Zaidan L., Malki A. Epstein–Barr virus-associated malignancies: roles of viral oncoproteins in carcinogenesis. *Front Oncol* 2018;8:380969. DOI: 10.3389/FONC.2018.00265/BIBTEX
65. Li D.K., Chen X.R., Wang L.N. et al. Epstein–Barr virus induces lymphangiogenesis and lymph node metastasis via upregulation of VEGF-C in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Cancer Res* 2022;20(1):161–75. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-21-0164
66. Ghose S., Roy S., Ghosh V. et al. The plasma EBV DNA load with IL-6 and VEGF levels as predictive and prognostic biomarker in nasopharyngeal carcinoma. *Virology J* 2024;21(1):1–10. DOI: 10.1186/S12985-024-02473-0/FIGURES/4
67. Yang H.J., Huang T.J., Yang C.F. et al. Comprehensive profiling of Epstein–Barr virus-encoded miRNA species associated with specific latency types in tumor cells. *Virol J* 2013;10:1–13. DOI: 10.1186/1743-422X-10-314/TABLES/2
68. Ho J.W.Y., Li L., Wong K.Y. et al. Comprehensive profiling of EBV gene expression and promoter methylation reveals latency II viral infection and sporadic abortive lytic activation in peripheral T-cell lymphomas. *Viruses* 2023;15(2):423. DOI: 10.3390/V15020423
69. Yoshioka M., Kikuta H., Ishiguro N. et al. Latency pattern of Epstein–Barr virus and methylation status in Epstein–Barr virus-associated hemophagocytic syndrome. *J Med Virol* 2003;70(3):410–9. DOI: 10.1002/JMV.10411
70. Bergbauer M., Kalla M., Schmeink A. et al. CpG-methylation regulates a class of Epstein–Barr virus promoters. *PLoS Pathog* 2010;6(9):e1001114. DOI: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1001114
71. Sinclair A.J. Could changing the DNA methylation landscape promote the destruction of Epstein–Barr virus-associated cancers? *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11:695093. DOI: 10.3389/FCIMB.2021.695093/BIBTEX
72. Taylor G.S., Long H.M., Brooks J.M. et al. The immunology of Epstein–Barr virus-induced disease. *Annu Rev Immunol* 2015;33:787–821. DOI: 10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032414-112326
73. Matsusaka K., Funata S., Fukuyo M. et al. Epstein–Barr virus infection induces genome-wide de novo DNA methylation in non-neoplastic gastric epithelial cells. *J Pathol* 2017;242(4):391–9. DOI: 10.1002/PATH.4909
74. Gao X., Yang H.X., Cheng S. et al. Epigenetic regulation of Epstein–Barr virus: from bench to bedside. *Clin Translat Disc* 2024;4:e357. DOI: 10.1002/CTD2.357
75. Li L., Ma B.B.Y., Chan A.T.C. et al. Epstein–Barr virus-induced epigenetic pathogenesis of viral-associated lymphoepithelioma-like carcinomas and natural killer/T-cell lymphomas. *Pathogens* 2018;7(3):63. DOI: 10.3390/PATHOGENS7030063
76. Murata T., Kondo Y., Sugimoto A. et al. Epigenetic histone modification of Epstein–Barr virus BZLF1 promoter during latency and reactivation in Raji cells. *J Virol* 2012;86(9):4752–61. DOI: 10.1128/JVI.06768-11
77. Torne A.S., Robertson E.S. Epigenetic mechanisms in latent Epstein–Barr virus infection and associated cancers. *Cancers* 2024;16(5):991. DOI: 10.3390/CANCERS16050991
78. Kim K.D., Lieberman P.M. Viral remodeling of the 4D nucleome. *Exp Mol Med* 2024;56(4):799–808. DOI: 10.1038/s12276-024-01207-0
79. Schaeffner M., Mrozek-Gorska P., Woellmer A. et al. BZLF1 interacts with the chromatin remodeler INO80 promoting escape from latent infections with Epstein–Barr virus. *bioRxiv* 2018;317354. DOI: 10.1101/317354
80. Wen Y., Xu H., Han J. et al. How Does Epstein–Barr virus interact with other microbiomes in ebv-driven cancers? *Front Cell Infect Microbiol* 2022;12:852066. DOI: 10.3389/FCIMB.2022.852066/BIBTEX

Вклад авторов

А.Д. Молчанов: обзор литературы по теме статьи, проведение системного анализа, обобщение данных, написание текста статьи;
 А.С. Васильева: обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала;
 К.В. Смирнова, М.В. Немцова: проведение системного анализа, обобщение данных.

Authors' contributions

A.D. Molchanov: review of the literature on the topic of the article, conducting system analysis, summarizing data, article writing;
 A.S. Vasilyeva: review of the literature on the topic of the article, article writing, preparation of illustrative material;
 K.V. Smirnova, M.V. Nemtsova: conducting a system analysis, summarizing data.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.Д. Молчанов / A.D. Molchanov: <https://orcid.org/0000-0001-5229-2285>
 А.С. Васильева / A.S. Vasilyeva: <https://orcid.org/0009-0004-0249-4574>
 К.В. Смирнова / K.V. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0001-6209-977X>
 М.В. Немцова / M.V. Nemtsova: <https://orcid.org/0000-0002-2835-5992>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00435).

Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 23-25-00435).

Статья поступила: 10.02.2025. Принята к публикации: 21.05.2025. Опубликовано онлайн: 23.06.2025.

Article submitted: 10.02.2025. Accepted for publication: 21.05.2025. Published online: 23.06.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-35-46>

Молекулярно-генетическая классификация рака эндометрия в контексте персонализированной медицины

Л.Н. Любченко^{1,2}, С.В. Мухтарулина¹, М.А. Мешкова¹, З.А. Сидикова¹, Н.Н. Волченко³, Е.Г. Новикова³

¹Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 105425 Москва, 3-я Парковая улица, 51, стр. 1;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 249036 Обнинск, ул. Королева, 4;

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

Контакты: Людмила Николаевна Любченко clingen@mail.ru

В статье представлена новая классификационная система рака эндометрия, разработанная Международной федерацией акушеров и гинекологов (International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO), – FIGO 2023. Поиск литературы осуществляли в базах данных PubMed, Medline, РИНЦ (Российский индекс научного цитирования) по ключевым словам «рак эндометрия», «молекулярно-генетическое исследование», «FIGO 2023», «мутации гена *POLE*», «dMMR-статус», «ген *TP53*», «NSMP». По теме найдены 206 статей (опубликованы с 1983 по 2024 г.), более значимые из них (45 статей) включены в данный обзор литературы. Обновленная классификация FIGO 2023 содержит 19 подстадий рака эндометрия: 5 из них объединены в стадию I, 3 – в стадию II, 8 – в стадию III, 3 – в стадию IV. Основными ее отличиями от классификационной системы FIGO 2009 являются уточнение типа опухоли (агрессивный/неагрессивный), степени лимфоваскулярной инвазии, наличия макро- или микрометастазов в лимфатических узлах, а также характеристика молекулярно-генетических маркеров. Согласно новой классификации FIGO 2023 рекомендовано изменение стадии в зависимости от наличия мутации в генах *POLE* и *TP53*. Так, к IA подстадии относят опухоли с благоприятным прогнозом и мутацией в гене *POLE* (IAmpOLEmut стадия), к IIC подстадии – опухоли с неблагоприятным прогнозом и мутацией в гене *TP53* (IICmp53abn стадия). Согласно данным, полученным в ходе исследований, выделенные подстадии с учетом молекулярного профиля опухоли значительно различаются по результатам течения заболевания.

Введение новой классификации FIGO 2023, учитывающей молекулярно-биологические аспекты опухоли, позволит индивидуализировать тактику ведения пациенток, страдающих раком эндометрия, а также прогнозировать течение заболевания. Актуальным вопросом остается дальнейшее изучение отдаленных результатов адъювантной терапии.

Ключевые слова: рак эндометрия, молекулярная классификация, классификация Международной федерации акушеров и гинекологов, International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO 2023, мутация, ген, *POLE*, dMMR, *TP53*, микросателлитная нестабильность

Для цитирования: Любченко Л.Н., Мухтарулина С.В., Мешкова М.А. и др. Молекулярно-генетическая классификация рака эндометрия в контексте персонализированной медицины. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(2):35–46. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-35-46>

Molecular genetic classification of endometrial cancer in the context of personalised medicine

L.N. Lyubchenko^{1,2}, S.V. Mukhtarulina¹, M.A. Meshkova¹, Z.A. Sidikova¹, N.N. Volchenko³, E.G. Novikova³

¹N.A. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology – branch of National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of Russia, 51 3rd Parkovaya St., Moscow 105425, Russia;

²National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of Russia; 4 Koroleva St., Obninsk 249036, Russia;

³P.A. Herten Moscow Oncology Research Institute – branch of National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinsky Proezd, Moscow 125284, Russia

Contacts: Lyudmila Nikolaevna Lyubchenko clingen@mail.ru

The article presents a new classification of endometrial cancer developed by the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO): FIGO 2023. Literature search was performed in the PubMed, Medline, RSCI (Russian Science Citation Index) databases using key words "endometrial cancer", "molecular genetic study", "FIGO 2023", "POLE gene mutations", "dMMR status", "TP53 gene", "NSMP". In total, 206 articles were found (published between 1983 and 2024), the more significant articles (45) were included in this literature review. The renewed FIGO 2023 classification contains 19 endometrial cancer substages: 5 are included in stage I, 3 in stage II, 8 in stage III, 3 in stage IV. The main differences of the new classification from FIGO 2009 are the specification of tumor type (aggressive/non-aggressive), level of lymphovascular involvement, presence of macro- or micrometastases in the lymph nodes, as well as characteristics of molecular and genetic markers. According to the new FIGO 2023 classification, change of stage is recommended depending on the presence of mutations in the *POLE* and *TP53* genes. Thus, stage IA includes tumors with favorable prognosis and mutation in the *POLE* gene (stage IAmpOLEmut), stage IIC includes tumors with unfavorable prognosis and mutation in the *TP53* gene (stage IICmp53abn). According to the data of trials, the identified substages – which take into account molecular profile of the tumor – significantly differ in terms of oncological outcomes of disease progression.

Therefore, introduction of the new FIGO 2023 classification taking into account molecular biology features of the tumor will allow to adopt a more targeted approach to management of patients with endometrial cancer and to make predictions on disease progression. One of the remaining important questions is further study of long-term results of adjuvant therapy.

Keywords: endometrial cancer, molecular classification, International Federation of Gynecology and Obstetrics classification, FIGO 2023, mutation, gene, *POLE*, dMMR, *TP53*, microsatellite instability

For citation: Lyubchenko L.N., Mukhtarulina S.V., Meshkova M.A. et al. Molecular genetic classification of endometrial cancer in the context of personalised medicine. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(2):35–46. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-35-46>

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным GLOBOCAN (2022) в России 5-летняя распространенность рака эндометрия (РЭ) составляет 146,7 случая на 100 тыс. населения. Данная патология занимает 4-е место по частоте встречаемости среди злокачественных патологий, следуя за раком молочной, предстательной желез и колоректальным раком. Согласно данным статистического отчета А.Д. Каприна и соавт., первичная заболеваемость РЭ в нашей стране в 2023 г. составила 37,34 случая на 100 тыс. населения, смертность — 9,06 случая на 100 тыс. населения. В России данная патология занимает 3-е место в структуре заболеваемости злокачественными заболеваниями среди женского населения [1]. Таким образом, наблюдается тенденция к росту заболеваемости РЭ, что обуславливает необходимость детального изучения биологического фенотипа опухоли на основании молекулярно-генетических показателей.

В классификации РЭ FIGO, разработанной в 2009 г. Международной федерацией акушеров и гинекологов (International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO), градация по стадиям основана сугубо на анатомических критериях. При этом в ней отсутствуют данные о степени агрессивности опухоли, патоморфологических критериях неблагоприятного прогноза и молекулярно-генетических факторах. Только анатомическое обоснование стадирования РЭ создает ограничения в клинической практике, в частности в интерпретации прогноза течения заболевания и определения тактики лечения.

В 2023 г. представлена обновленная система стадирования РЭ — FIGO 2023, которая позволяет стратифи-

цировать пациентов по группам риска, индивидуализировать лечебно-диагностические подходы и прогнозировать отдаленные результаты лечения [2].

Цель работы — представить результаты внедрения и преимущества обновленной классификации РЭ с учетом молекулярно-генетических характеристик опухолей.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ НОВОЙ КЛАССИФИКАЦИИ FIGO 2023

В 1989 г. профессор отечественной онкогинекологии Я.В. Бохман в монографии «Руководство по онкогинекологии» при описании классификации рака тела матки сделал акцент не только на стадировании, но и на особенностях распространения опухоли и течения заболевания [3]. Концепция о 2 патогенетических вариантах РЭ (I тип — эстрогензависимый, II тип — эстрогеннезависимый) определила основные параметры дальнейшего изучения биологии опухолей. В течение многих лет в исследовательских работах демонстрировались гетерогенность РЭ I и II типов, различия в биологических характеристиках и отдаленных результатах лечения (рис. 1) [4].

Успехи молекулярной онкологии обосновали расширение клинко-морфологической классификации РЭ с учетом молекулярно-биологических характеристик опухоли и продемонстрировали необходимость ее внедрения в клиническую практику. Данные, позволившие сформировать молекулярные подгруппы, представлены в проекте The Cancer Genome Atlas (TCGA) и были опубликованы в 2013 г. В соответствии с ними выделены 4 типа РЭ в зависимости от экспрессионного профиля, мутационной нагрузки и вариации сома-

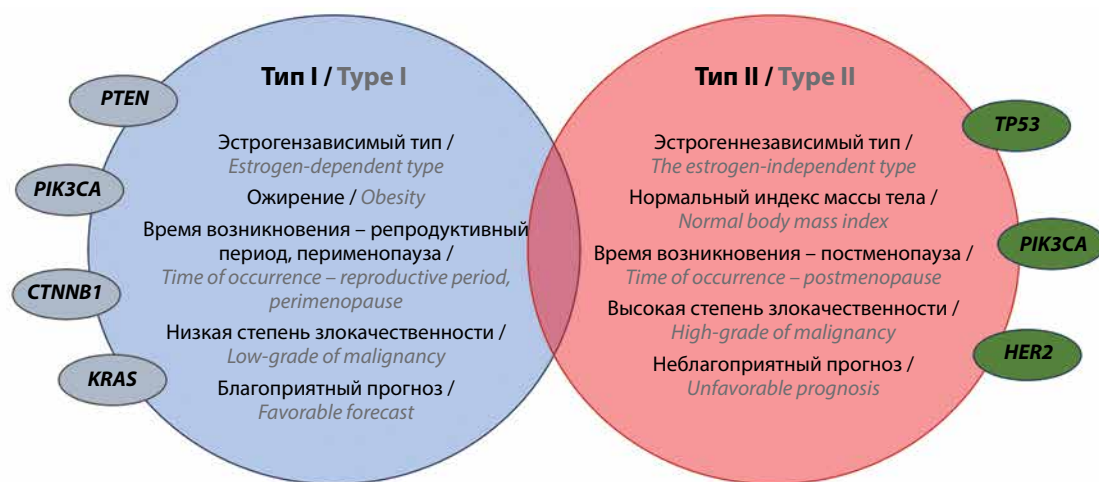


Рис. 1. Биологическая классификация рака эндометрия
Fig. 1. Biological classification of endometrial cancer

тических мутаций: *mtPOLE*-ассоциированный РЭ (около 7 % случаев), микросателлитно-нестабильный РЭ (28 % случаев), РЭ с низким уровнем копийности генов (39 % случаев), РЭ с высоким уровнем копийности генов (26 % случаев) [5].

В последующем, в 2021 г., была опубликована классификация РЭ Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer (ProMisE), позволившая стратифицировать пациенток на группы риска. В 1-ю группу включены больные с мутацией в гене *POLE*, во 2-ю – с дефицитом репарации ошибочно спаренных оснований ДНК (dMMR), в 3-ю – с мутацией в гене *TP53*, в 4-ю – без специфического молекулярного профиля (no specific molecular profile, NSMP) [6].

Таким образом, показано, что немаловажную прогностическую роль при аналогичных стадиях и морфологическом типе опухоли играют отдаленные результаты лечения, которые зависят от наличия геномных aberrаций. Это оправдывает использование молекулярных маркеров при стратификации и стадировании [7–10].

МУТАЦИИ В ГЕНЕ *POLE*

Ген *POLE* кодирует каталитическую субъединицу ДНК-полимеразы эpsilon и вовлечен в процесс репликации и клеточного метаболизма. Кроме того, *mtPOLE*-ассоциированные опухоли демонстрируют повышенную экспрессию генов, отвечающих за иммуносупрессию [11].

Мутации в гене *POLE* встречаются в 7–12 % случаев РЭ. Наиболее часто *mtPOLE* обнаруживают у пациенток молодого возраста, с низким индексом массы тела (ИМТ), а также с ранней стадией опухолевого процесса. Традиционно опухоли с мутацией в гене *POLE* относят к I патогенетическому типу РЭ [5]. Некоторые патологи придерживаются мнения, что серозные опухоли с наличием мутации в гене *POLE* следует относить к эндометриоидным карциномам.

При эндометриоидном раке высокой степени злокачественности (G_3) мутации в гене *POLE* встречаются в 12 % случаев, причем III стадия эндометриоидной карциномы в 22 % случаев ассоциирована с *mtPOLE*-генотипом. При недифференцированном/дифференцированном РЭ мутацию в гене *POLE* выявляют в 12 % случаев, при нейроэндокринном раке – в 7 %, при эндометриоидном раке низкой степени злокачественности (G_{1-2}) – в 6 %, при карциносаркоме – в 5 %, при светлоклеточном раке – в 4 % (рис. 2) [12].

Опухоли с мутацией в гене *POLE* характеризуются более благоприятным прогнозом: 5-летняя выживаемость без прогрессирования составляет от 92 до 100 %, что обусловлено высокой мутационной нагрузкой, ассоциированной с выраженной лимфоцитарной инфильтрацией и, как следствие, с иммунным ответом в 79 % случаев *mtPOLE* РЭ [13, 14].

Результаты недавних исследований подтвердили, что при РЭ, относящемся к ультрамутированному геномному подтипу *POLE*, отмечается хороший прогноз, несмотря на высокую степень злокачественности и наличие мутации в гене *TP53* [14].

ДЕФИЦИТ РЕПАРАЦИИ ОШИБОЧНО СПАРЕННЫХ ОСНОВАНИЙ ДНК

Второй молекулярный подтип демонстрирует микросателлитную нестабильность (MSI) с низкой вариабельностью числа копий, но высокой частотой мутаций. Причиной MSI являются соматические или (реже) герминальные мутации в генах системы репарации неспаренных оснований ДНК (dMMR) [15].

Для оценки наличия dMMR и MSI, как правило, оценивают статус генов *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* и *PMS2*. Частота выявления dMMR при РЭ составляет до 28 % [16].

Опухоли с dMMR также демонстрируют высокую мутационную нагрузку, однако она ниже, чем при



Рис. 2. Частота встречаемости мутаций в гене *POLE* в зависимости от гистологического типа рака эндометрия
Fig. 2. The frequency of occurrence of mutations in the *POLE* gene depending on the histological type of endometrial cancer

mtPOLE РЭ [17]. Гистологически опухоли с dMMR сходны с опухолями, ассоциированными с мутацией в гене *POLE*: в большинстве случаев они относятся к эндометриоидному типу (85,8 % случаев) с преобладанием опухолей высокой степени злокачественности (47,4 % случаев) [18].

Частота встречаемости dMMR в зависимости от гистологического типа РЭ представлена на рис. 3 [5].

Согласно клиническим рекомендациям Европейского общества гинекологической онкологии (European

Society of Gynaecological Oncology, ESGO)/Европейского общества радиотерапии и онкологии (European Society for Radiotherapy and Oncology, ESTRO)/Европейского общества патологов (European Society of Pathology, ESP) (2021) пациенток с dMMR-ассоциированным РЭ G_{1-2} IA и IB подстадий стратифицируют на группы низкого и промежуточного прогностических рисков прогрессирования. Больных РЭ высокой степени злокачественности (G_3) ранних стадий относят к группе промежуточно-высокого риска прогрессирования. При гистологических типах, отличных от эндометриоидного (серозный рак, карциносаркома, недифференцированный рак), положительный dMMR-статус является неблагоприятным прогностическим фактором. Таких пациенток относят к группе высокого риска прогрессирования [19].

Следует отметить, что высокая мутационная нагрузка опухоли, большое количество инфильтрирующих опухоль лимфоцитов и перитуморальных $CD8^+$ -Т-лимфоцитов обеспечивают противоопухолевый иммунный ответ с перспективой проведения иммунотерапии у данной когорты пациенток [20].

МУТАЦИИ В ГЕНЕ *TP53*

Мутации в гене *TP53*, миссенс-/нонсенс-мутации, а также мутации со сдвигом рамки считывания и изменения экспрессионного уровня одноименного белка являются наиболее частыми патогенетическими событиями при РЭ и способствуют активации онкогенеза. Ген *TP53* кодирует белок p53, который регулирует клеточный цикл и апоптоз [21].

Частота выявления мутации в гене *TP53* при РЭ составляет до 29,3 %. При серозном раке они встречаются в 87,2 % случаев, при эндометриоидном — в 15 % [6]. Согласно результатам исследования А. Travaglino и соавт., подавляющее число карциносарком (73,9 % случаев) и светлоклеточных опухолей (42,5 % случаев) ассоциированы с *mtTP53* [22]. Данные опухоли соответствуют II типу РЭ.

По данным TCGA выявлена корреляция гистологических типов РЭ (рис. 4) [5].

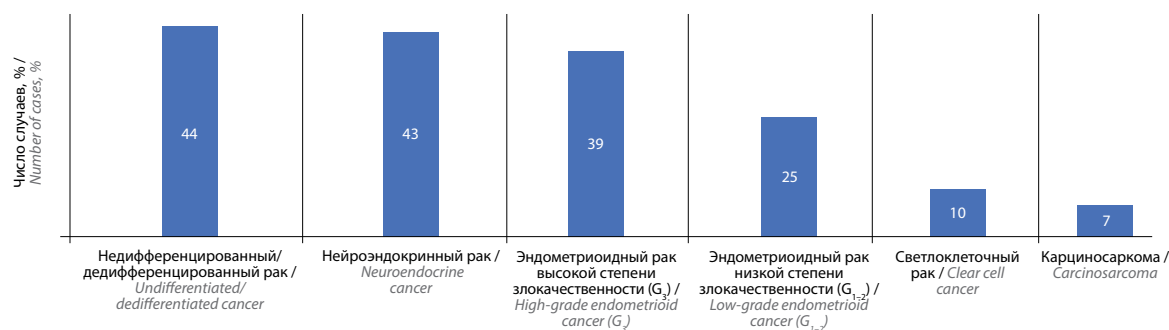


Рис. 3. Частота встречаемости dMMR в зависимости от гистологического типа рака эндометрия
Fig. 3. dMMR frequency of occurrence depending on the histological type of endometrial cancer

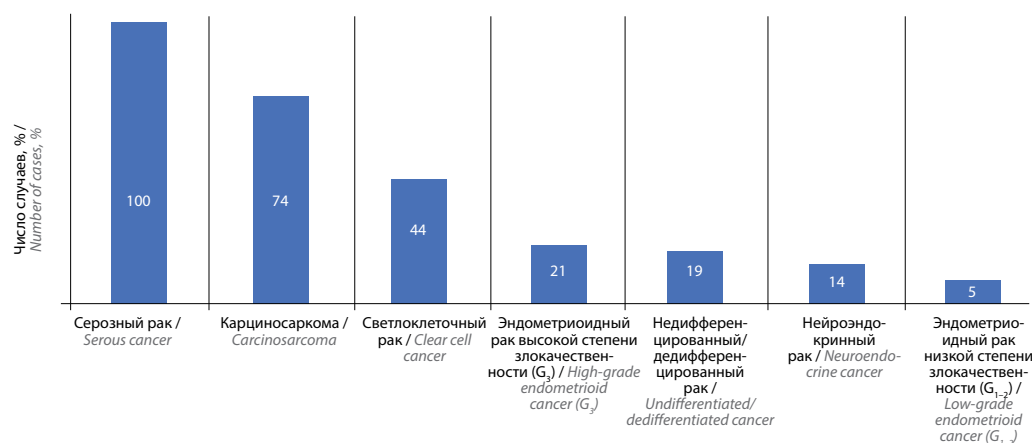


Рис. 4. Частота встречаемости *mtTP53* в зависимости от гистологического типа рака эндометрия
Fig. 4. The frequency of occurrence of *mtTP53* occurrence depends on the histological type of endometrial cancer

Большой интерес представляет исследование А. Момени-Ворожени и соавт. В него включены 1239 больных РЭ, которым проведено молекулярно-генетическое исследование для определения молекулярного подтипа опухоли. Соматические мутации и изменение числа копийности генов выявлены в 238 случаях. Мутации в гене *TP53* зарегистрированы у 55 % пациенток с серозным РЭ, у 23 % больных с эндометриоидной карциномой G₃, у 15 % с эндометриоидной карциномой G₁₋₂ и у 5 % со светлоклеточным раком [21].

В ходе исследования S.R. Kim и соавт., в которое вошли 52 пациентки со светлоклеточной аденокарциномой, в 35 % случаев выявлена мутация в гене *TP53* [23]. Результаты однофакторного анализа, проведенного М. Уано и соавт., показали, что при РЭ G₁₋₂ aberrантная экспрессия *TP53* связана с худшими показателями выживаемости, а при РЭ G₃ наличие данной мутации не влияло на прогноз. Кроме того, возраст пациенток (<60 лет vs ≥60 лет) коррелировал с aberrантной экспрессией *TP53* при РЭ G₁ (3 % vs 16 %; $p = 0,001$), а при РЭ G₂₋₃ различий, связанных с возрастом больных, выявлено не было [24].

Некоторые авторы высказали предположение, что прогноз при различных гистологических типах с мутацией в гене *TP53* различен. Так, серозная *mtTP53*-карцинома более агрессивна, чем эндометриоидная карцинома, но менее агрессивна, чем карциносаркома [25]. Тем не менее опухоли с мутацией в гене *TP53* входят в одну прогностическую группу — высокого риска прогрессирования. Согласно рекомендациям ESGO/ESTRO/ESP aberrантная экспрессия *TP53* является независимым фактором неблагоприятного исхода. В данном случае тактикой лечения является дистанционная лучевая терапия и/или химиотерапия [5].

РАК ЭНДОМЕТРИЯ БЕЗ СПЕЦИФИЧЕСКОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО ПРОФИЛЯ

Рак эндометрия без высокой мутационной нагрузки и изменений копийности генов составляет около

40 % случаев [19]. Подавляющее большинство опухолей NSMP представляют собой эндометриоидные карциномы низкой степени злокачественности и практически исключают серозные опухоли [22]. Частота встречаемости РЭ без специфического молекулярного профиля в зависимости от гистологического типа рака эндометрия по данным TCGA представлена на рис. 5 [5].

Рекомендации ESGO/ESTRO/ESP позволяют стратифицировать группу опухолей NSMP на основе тех же критериев, что и группу опухолей с dMMR. Однако в ряде работ показана прогностическая гетерогенность данной группы в отношении клиничко-патологических факторов. Таким образом, стратификация больных с неспецифическим молекулярным подтипом затруднена [5].

Такие гистологические типы РЭ, как серозный рак, карциносаркома и недифференцированная карцинома из группы NSMP, характеризуются неблагоприятным прогнозом, тогда как при эндометриоидном РЭ отмечается более благоприятное течение заболевания [26].

Ряд авторов предложили субстратификацию опухолей NSMP на основе гистологических, иммуногистохимических и молекулярных маркеров, некоторые из которых могут представлять собой терапевтические мишени [27]. Молекулярными маркерами неблагоприятного течения заболевания и высокого риска развития рецидива для РЭ NSMP являются мутации в генах *CTNNB1* и *LICAM* [28].

Таким образом, при лечении РЭ NSMP необходим индивидуальный подход к лечению в связи с большой клиничко-генетической гетерогенностью этой подгруппы.

ХАРАКТЕРИСТИКА СТАДИЙ РАКА ЭНДОМЕТРИЯ ПО КЛАССИФИКАЦИИ FIGO 2023

Стадия I. В классификации FIGO 2023 I стадия разделена на 3 подстадии: IA, IB и IC, при этом анатомически опухоль ограничена маткой и яичником (табл. 1).

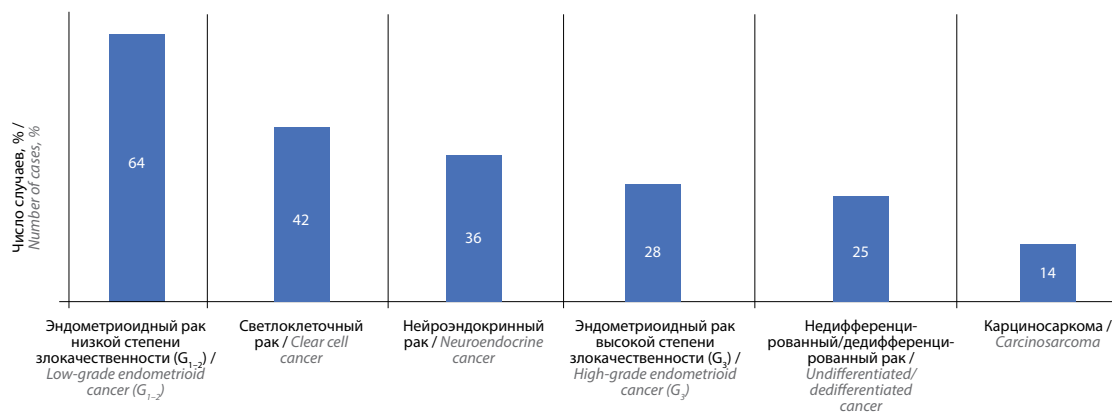


Рис. 5. Частота встречаемости рака эндометрия без специфического молекулярного профиля в зависимости от гистологического типа рака эндометрия
Fig. 5. The frequency of occurrence of no specific molecular profile endometrial cancer on the histological type of endometrial cancer

К *IA подстадии* относятся опухоли неагрессивного гистологического подтипа (эндометриоидная аденокарцинома низкой степени злокачественности) с инвазией <50 % толщины эндометрия с фокальной лимфоваскулярной инвазией (ЛВИ) или без нее, а также опухоли, для которых характерен благоприятный прогноз, с мутацией в гене *POLE* (IAmPOLEmut стадия). Эта стадия разделена на 3 подстадии. *IA1* подстадия характеризуется наличием эндометриоидной карциномы низкой степени злокачественности в пределах полипа или эндометрия. При *IA2* подстадии отмечается инвазивный рост эндометриоидной карциномы низкой степени злокачественности (инвазия <50 % толщины эндометрия), с фокальной ЛВИ или без нее. Подстадия *IA3* впервые введена в классификацию РЭ и характеризуется наличием эндометриоидной карциномы низкой степени злокачественности, ограничен-

ной маткой и яичником, с поверхностной инвазией в миометрий (инвазия <50 % толщины миометрия), отсутствием выраженной ЛВИ, метастатического процесса и односторонним поражением яичника без инвазии и разрыва капсулы. Молекулярный анализ подтвердил общее клональное происхождение опухолей этой группы, ассоциированных с благоприятным прогнозом.

Подстадия IB характеризуется наличием эндометриоидной карциномы низкой степени злокачественности с инвазией ≥50 % толщины миометрия, с фокальной ЛВИ или без нее.

Подстадия IC представлена агрессивными гистологическими типами опухоли – эндометриоидной карциномой G₃, серозной аденокарциномой, светлоклеточной аденокарциномой, мезонефральной карциномой, гастроинтестинальным типом муцинозной

Таблица 1. Характеристика I стадии рака эндометрия по классификации Международной федерации акушеров и гинекологов FIGO 2023

Table 1. Characteristics of stage I endometrial cancer per the International Federation of Gynecology and Obstetrics classification FIGO 2023

Подстадия Substage	Описание Description
IA:	Эндометриоидная карцинома низкой степени злокачественности с инвазией <50 % толщины миометрия с фокальной лимфоваскулярной инвазией или без нее и благоприятным прогнозом. Low-grade endometroid carcinoma with invasion <50 % of myometrium thickness with no or focal lymphovascular space involvement and favorable prognosis.
IA1	Эндометриоидная карцинома низкой степени злокачественности, ограниченная полипом или эндометрием. Low-grade endometroid carcinoma limited to an endometrial polyp or confined to the endometrium.
IA2	Эндометриоидная карцинома низкой степени злокачественности с инвазией <50 % толщины миометрия с фокальной лимфоваскулярной инвазией или без нее. Low-grade endometroid carcinoma with invasion <50 % of myometrium thickness with no or focal lymphovascular space involvement.
IA3	Эндометриоидная карцинома низкой степени злокачественности, ограниченная маткой и яичником Low-grade endometroid carcinomas limited to the uterus and ovary
IB	Эндометриоидная карцинома низкой степени злокачественности с инвазией >50 % толщины миометрия с лимфоваскулярной инвазией или без нее Endometroid carcinoma with invasion >50 % of myometrium thickness with no or focal lymphovascular space involvement
IC	Эндометриоидная карцинома агрессивного гистологического типа, ограниченная полипом или эндометрием Aggressive histological type endometroid carcinoma limited to a polyp or confined to the endometrium

Таблица 2. Характеристика II стадии рака эндометрия по классификации Международной федерации акушеров и гинекологов FIGO 2023**Table 2.** Characteristics of stage II endometrial cancer per the International Federation of Gynecology and Obstetrics classification FIGO 2023

Подстадия Substage	Описание Description
IIA	Эндометриоидная карцинома низкой степени злокачественности с инвазией в строму шейки матки Low-grade endometroid carcinoma with invasion of the cervical stroma
IIB	Эндометриоидная карцинома низкой степени злокачественности с выраженной лимфоваскулярной инвазией Low-grade endometroid carcinoma with substantial lymphovascular space involvement
IIC	Эндометриоидная карцинома агрессивного гистологического типа с любой инвазией в миометрий Aggressive histological type endometroid carcinoma with any myometrial involvement

аденокарциномы, недифференцированной карциномой и карциносаркомой, локализующимися в пределах полипа или эндометрия.

Стадия II. В обновленной классификации FIGO 2023 II стадия РЭ разделена на 3 подстадии (табл. 2). *IIA подстадия* характеризуется наличием эндометриоидной карциномы низкой степени злокачественности с инвазией в строму шейки матки. К *IIB подстадии* относится эндометриоидная карцинома низкой степени злокачественности с выраженной ЛВИ, к *IIC подстадии* — агрессивный гистологический тип РЯ с любой инвазией в миометрий. В классификации FIGO 2023 опухоли с подтвержденной мутацией в гене *TP53* отнесены ко *IIC подстадии*. Согласно ей при наличии мутации в гене *TP53* верифицируется *IIISmp53abn* стадия.

Стадия III. К этой стадии относятся опухоли любого гистологического типа с локальным и/или регионарным распространением. В классификации FIGO 2023 III стадия разделена на 3 подстадии (табл. 3). К *IIIA подстадии* отнесены новообразования с опухолевой инвазией серозной оболочки матки и/или придатков путем прямого распространения или метастазирования. Критериями *IIIA1 подстадии* являются двустороннее метастатическое поражение яичников с распространением на капсулу и маточные трубы, опухолевая инвазия >50 % толщины миометрия и наличие выраженной ЛВИ. *IIIA2 подстадия* характеризуется вовлечением в патологический процесс субсерозного слоя и распространением опухоли на серозную оболочку матки.

Стадия IIIB делится на 2 подстадии. При *IIIB1 подстадии* наблюдается метастазирование или прямое распространение опухоли во влагалище и/или параметрий, при *IIIB2 подстадии* — метастазирование в тазовую брюшину.

Подстадия IIIC характеризуется метастатическим поражением тазовых (*IIIC1 подстадия*) и парааортальных лимфатических узлов (ЛУ) (*IIIC2 подстадия*) с наличием микро- и макromетастазов.

С клинической точки зрения при микрометастазах и наличии изолированных опухолевых клеток не на-

блюдается значимых различий в частоте развития рецидивов и показателях выживаемости [29]. Несмотря на диагностическую ценность лимфаденэктомии, ее рутинное выполнение остается предметом дискуссии из-за отсутствия существенных терапевтических преимуществ и высокой частоты возникновения осложнений, продемонстрированных в рандомизированных исследованиях [30].

Результаты исследований, посвященных данной проблеме, акцентировали вопрос на внедрении в клиническую практику определения сигнальных ЛУ. Многие учреждения стали использовать методику ультразвукового исследования, следуя рекомендациям Международного общества гинекологических патологов (International Society of Gynecological Pathologists, ISGyP) [31].

В хирургической практике на сегодняшний день наблюдается тенденция к отказу от системной лимфаденэктомии в пользу определения сторожевых ЛУ.

Стадия IV. В классификации FIGO 2023 эта стадия РЭ стратифицирована на 3 подстадии (табл. 4). *IVA подстадия* характеризуется распространением опухоли на слизистую мочевого пузыря и/или слизистую прямой кишки, *IVB подстадия* — метастатическим поражением брюшины за пределами малого таза, *IVC подстадия* — отдаленным метастазированием в экстра- или интраабдоминальные ЛУ, расположенные выше почечных сосудов, легкие, печень, головной мозг или кости.

ОБСУЖДЕНИЕ

Международная система стадирования FIGO является важнейшим инструментом для стратификации и определения тактики лечения больных РЭ и прогнозирования течения заболевания. Первоначально представленная в 1988 г. как клиническая система, в 2009 г. эта классификация подверглась существенному пересмотру: в нее были включены клинико-патоморфологические факторы, указывающие на местное, регионарное и отдаленное метастазирование [32].

Несмотря на широкое применение, система FIGO 2009 имеет несколько существенных ограничений, к которым относятся отсутствие уточнения гистоло-

Таблица 3. Характеристика III стадии рака эндометрия по классификации Международной федерации акушеров и гинекологов FIGO 2023

Table 3. Characteristics of stage III endometrial cancer per the International Federation of Gynecology and Obstetrics classification FIGO 2023

Подстадия Substage	Описание Description
IIIA:	Инвазия опухоли в серозную оболочку матки и/или придатки путем прямого распространения или метастазирования. Tumor invasion of uterine serosa and/or adnexa by direct extension or metastasis.
IIIA1	Распространение опухоли на яичник или маточную трубу (кроме случаев, соответствующих критериям подстадии IA3).
IIIA2	Вовлечение в патологический процесс субсерозного слоя или распространение опухоли на серозную оболочку матки Involvement of uterine subserosa or spread through the uterine serosa
IIIB:	Метастазирование или прямое распространение опухоли на влагалище, параметрий или тазовую брюшину. Metastasis or direct spread to the vagina, parametria, or pelvic peritoneum.
IIIB1	Метастазирование или прямое распространение опухоли во влагалище и/или параметрий.
IIIB2	Метастазирование в тазовую брюшину Metastasis to the pelvic peritoneum
IIIC:	Метастатическое поражение тазовых и/или парааортальных лимфатических узлов. Metastasis to the pelvic or/and para-aortic lymph nodes.
IIIC1	Метастазы в тазовые лимфатические узлы Metastasis to the pelvic lymph nodes.
IIIC1i	Микрометастазы. Micrometastasis.
IIIC1ii	Макрометастазы. Macrometastasis.
IIIC2	Метастазы в парааортальных лимфатических узлах (вплоть до почечных сосудов) и/или метастазы в тазовых лимфатических узлах. Metastasis to para-aortic lymph nodes (up to the renal vessels) and/or metastasis to the pelvic lymph nodes.
IIIC2i	Микрометастазы. Micrometastasis.
IIIC2ii	Макрометастазы Macrometastasis

Таблица 4. Характеристика IV стадии рака эндометрия по классификации Международной федерации акушеров и гинекологов FIGO 2023

Table 4. Characteristics of stage IV endometrial cancer per the International Federation of Gynecology and Obstetrics classification FIGO 2023

Подстадия Substage	Описание Description
IVA	Распространение опухоли на слизистую оболочку мочевого пузыря и/или кишки Tumor spread to the bladder mucosa and/or intestinal mucosa
IVB	Метастазы по брюшине за пределами малого таза Abdominal peritoneal metastasis beyond the pelvis
IVC	Отдаленные метастазы, включая метастатическое поражение экстра- или интраабдоминальных лимфатических узлов выше почечных сосудов, легких, печени, головного мозга и костей Distant metastasis, including metastasis to any extra- or intra-abdominal lymph nodes above the renal vessels, lungs, liver, brain, or bone

гического типа РЭ, наличия и степени ЛВИ, учета при стадировании метастатического поражения.

Ключевое исследование, посвященное новой молекулярной классификации РЭ FIGO 2023, проводилось в 3 аккредитованных ESGO центрах Австрии и Италии. В него вошли 519 больных РЭ, которые были стратифицированы в соответствии с системами стадирования FIGO 2009 и FIGO 2023. Авторы проанализировали частоту рестадирования, а также сравнили показатели 5-летней общей и безрецидивной выживаемости. Согласно результатам исследования стадия была изменена у 27% пациенток (143/519), при этом в 23,7 % случаев (123/519) диагностирован РЭ более ранних стадий, тогда как в 3,9 % случаев (20/519) стадия заболевания расценена как более поздняя. Существенные изменения в стадировании РЭ связаны с молекулярно-генетическими характеристиками опухоли (введены IAmPOLEmut и ПСmp53abn стадии). При оценке отдаленных результатов лечения при IAmPOLEmut стадии ни у кого из пациенток в течение 5 лет наблюдения не выявлен рецидив заболевания. Напротив, у больных с ПСmp53abn стадией отмечены крайне низкие показатели выживаемости — 5-летняя выживаемость без прогрессирования составила 55,6 % [33].

Таким образом, новая молекулярная классификация РЭ FIGO 2023, в которую введены IAmPOLEmut и ПСmp53abn стадии, продемонстрировала прогностическую точность и эффективность стадирования РЭ.

На ранних стадиях заболевания выделение подстадий позволяет использовать дополнительную стратификацию с целью определения групп риска прогрессирования и индивидуализации лечебной тактики. У 3/4 пациенток с РЭ рестадирование привело к изменению прогноза заболевания, что обуславливает необходимость внедрения данной классификации в клиническую практику с учетом молекулярно-генетических характеристик.

Интерес представляют результаты исследования К. Matsuo и соавт., которые продемонстрировали различия в показателях летальности при местно-распространенном и распространенном РЭ в зависимости от стратификации по стадиям согласно классификациям FIGO 2009 и FIGO 2023 [34]. При стадировании опухолевого процесса в соответствии с классификационной системой FIGO 2009 5-летняя летальность при IIIA стадии составила 24,9 %, при IIIB стадии — 41,5 % ($p < 0,001$). При разделении III стадии на подстадии согласно классификации FIGO 2023 зафиксированы существенные изменения. Так, 5-летняя летальность при IA3 подстадии, составила 11 %, при IIIA1 подстадии — 31,8 % ($p < 0,001$). При IIIA1 и IIIA2 подстадиях не выявлено статистически значимых раз-

личий: летальность оказалась равна 31,8 и 31,6 % соответственно. При IIIB1 и IIIB2 подстадиях этот показатель был статистически значимо выше, чем при IIIA1 и IIIA2 подстадиях и составил 41,4–42 и 31,6–31,8 % соответственно ($p < 0,001$). Статистически значимых различий в 5-летней летальности при IIIB1 и IIIB2 подстадиях выявлено не было: она оказалась равна 41,4 и 42 % соответственно. У больных РЭ ПСC стадии медиана наблюдения составила 10 мес. При стадировании согласно классификации FIGO 2009 показатели смертности в течение 1,5 лет при РЭ ПСC1 подстадии оказались равны 8,8 %, при РЭ ПСC2 подстадии — 13,9 % ($p = 0,074$). Согласно классификации FIGO 2023 при макрометастазах в парааортальных ЛУ (ПСC2ii подстадия) смертность в течение 1,5 года составила 14,9 %, при макрометастазах в тазовых ЛУ (ПСC1ii подстадия) — 10,5 %, при микрометастазах в парааортальных (ПСC2i подстадия) и тазовых (ПСC1i подстадия) ЛУ — 5,9 и 5,1 % соответственно. Различия в этих показателях были статистически значимы ($p = 0,041$). Согласно классификации FIGO 2009 5-летняя летальность при IVA подстадии составила 56,3 %, при IVB подстадии — 67,4 % ($p < 0,001$). По классификации FIGO 2023 при IVA, IVB и IVC подстадиях она оказалась равной 56,3; 62,7 и 71,4 % соответственно ($p < 0,001$).

Таким образом, К. Matsuo и соавт. выявили значимые различия в показателях летальности при местно-распространенном и распространенном РЭ с учетом новых молекулярно-генетических показателей.

В 2021 г. в клинических рекомендациях ESGO/ESTRO/ESP появилась новая градация прогностических групп риска, учитывающая молекулярный профиль опухоли (табл. 5). S. Imboden и соавт. продемонстрировали значимые различия в показателях общей и безрецидивной выживаемости между прогностическими группами риска ESGO/ESTRO/ESP (2021) [35].

Более того, рестадирование с указанием молекулярно-генетического профиля имеет непосредственное терапевтическое значение. Так, согласно рекомендациям ESGO/ESTRO/ESP у пациенток с *mtPOLE*-РЭ, ограниченным маткой, адъювантная терапия может быть исключена, тогда как в случае с *mtTP53*-РЭ необходимо рассмотреть вопрос о проведении адъювантной химиолучевой терапии [36].

На сегодняшний день опубликованы результаты многоцентрового рандомизированного исследования PORTEC-4a, посвященного оценке эффективности адъювантной лучевой терапии у пациенток с опухолями эндометрия высокого и промежуточного рисков на основании молекулярного профиля. Определены показания для проведения лучевой терапии после хирургического лечения больных РЭ I стадии [10, 38].

Таблица 5. Прогностические группы риска согласно рекомендациям Европейского общества гинекологической онкологии/Европейского общества радиотерапии и онкологии/Европейского общества патологов (2021)

Table 5. Prognostic risk groups according to the European Society of Gynaecological Oncology/European Society for Radiotherapy and Oncology/European Society of Pathology recommendations (2021)

Группа риска Risk group	До молекулярной классификации Molecular classification unknown	После молекулярной классификации Molecular classification known
Низкий риск Low risk	Эндометриоидный тип опухоли, IA стадия, низкая степень злокачественности, отсутствие или наличие фокальной ЛВИ Endometrioid tumor type, stage IA, low-grade, LVSI negative or focal	Эндометриоидный тип опухоли, I–II стадия, мутация в гене <i>POLE</i> , отсутствие резидуальной опухоли. Эндометриоидный тип опухоли, IA стадия, dMMR/NSMP, низкая степень злокачественности, отсутствие или наличие фокальной ЛВИ Endometrioid tumor type, stage I–II, <i>POLE</i> mutation, no residual disease. Endometrioid tumor type, stage IA, dMMR/NSMP, low-grade, LVSI negative or focal
Промежуточный риск Intermediate risk	Эндометриоидный тип опухоли, IB стадия, низкая степень злокачественности, отсутствие или наличие фокальной ЛВИ. Эндометриоидный тип опухоли, IA стадия, высокая степень злокачественности, отсутствие или наличие фокальной ЛВИ. Неэндометриоидный тип опухоли (серозный, светлоклеточный рак, недифференцированная карцинома, карциносаркома), IA стадия, без инвазии в миометрий Endometrioid tumor type, stage IB, low-grade, LVSI negative or focal. Endometrioid tumor type, stage IA, high-grade, LVSI negative or focal. Non-endometrioid tumor type (serous, clear cell cancer, undifferentiated carcinoma, carcinosarcoma, mixed), stage IA, without myometrial invasion	Эндометриоидный тип опухоли, IB стадия, dMMR/NSMP, низкая степень злокачественности, отсутствие или наличие фокальной ЛВИ. Эндометриоидный тип опухоли, IA стадия, dMMR/NSMP, высокая степень злокачественности, отсутствие или наличие фокальной ЛВИ. Неэндометриоидный тип опухоли (серозный, светлоклеточный рак, недифференцированная карцинома, карциносаркома) и/или мутация в гене <i>p53</i> , IA стадия, без инвазии в миометрий Endometrioid tumor type, stage IB, dMMR/NSMP, low-grade, LVSI negative or focal. Endometrioid tumor type, stage IA, dMMR/NSMP, high-grade, LVSI negative or focal. Non-endometrioid tumor type, endometrioid (serous, clear cell cancer, undifferentiated carcinoma, carcinosarcoma, mixed) and/or a <i>p53</i> mutation, stage IA, without myometrial invasion
Промежуточно-высокий риск High-intermediate risk	Эндометриоидный тип опухоли, I стадия, выраженная ЛВИ, независимо от степени злокачественности и глубины инвазии. Эндометриоидный тип опухоли, IB стадия, высокая степень злокачественности, независимо от наличия ЛВИ. II стадия Endometrioid tumor type, stage I, substantial LVSI regardless of grade and depth of invasion. Endometrioid tumor type, stage IB, high-grade regardless of LVSI status. Stage II	Эндометриоидный тип опухоли, I стадия, dMMR/NSMP, выраженная ЛВИ, независимо от степени злокачественности и глубины инвазии. Эндометриоидный тип опухоли, IB стадия, dMMR/NSMP, высокая степень злокачественности, независимо от наличия ЛВИ. Эндометриоидный тип опухоли, II стадия, dMMR/NSMP Endometrioid tumor type, stage I, dMMR/NSMP, substantial LVSI regardless of grade and depth of invasion. Endometrioid tumor type, stage IB, dMMR/NSMP, high-grade regardless of LVSI status. Endometrioid tumor type, stage II, dMMR/NSMP
Высокий риск High risk	III–IVA стадии, отсутствие резидуальной опухоли. Неэндометриоидный тип опухоли (серозный, светлоклеточный рак, недифференцированная карцинома, карциносаркома), I–IVA стадия с инвазией в миометрий, отсутствие резидуальной опухоли. Stage III–IVA, no residual disease Non-endometrioid tumor type (serous, clear cell cancer, undifferentiated carcinoma, carcinosarcoma) with myometrial invasion, stage I–IVA, no residual disease	Эндометриоидный тип опухоли, III–IVA стадия, dMMR/NSMP, отсутствие резидуальной опухоли. Эндометриоидный тип опухоли, I–IVA стадия, мутация в гене <i>p53abn</i> , инвазия в миометрий, отсутствие резидуальной опухоли. Неэндометриоидный тип опухоли (серозный рак, недифференцированная карцинома, карциносаркома), I–IVA стадия, dMMR/NSMP, инвазия в миометрий, отсутствие резидуальной опухоли Endometrioid tumor type, stage III–IVA, dMMR/NSMP, no residual disease. Endometrioid tumor type, stage I–IVA, <i>p53abn</i> mutation, myometrial invasion, no residual disease. Non-endometrioid tumor type (serous, clear cell cancer, undifferentiated carcinoma, carcinosarcoma) with myometrial invasion, stage, I–IVA, NSMP/dMMR, undifferentiated carcinoma, carcinosarcoma, no residual disease
Распространенная болезнь Advanced metastatic	III–IVA стадии, наличие резидуальной опухоли. IVB стадия Stage III–IVA with residual disease. Stage IVB	III–IVA стадия, наличие резидуальной опухоли, любой молекулярный подтип опухоли. IVB стадия, любой молекулярный подтип опухоли Stage III–IVA with residual disease, any molecular tumor type. Stage IVB of any molecular tumor type

Примечание. ЛВИ — лимфоваскулярная инвазия; dMMR — дефицит репарации ошибочно спаренных оснований ДНК; NSMP — без специфического молекулярного профиля.

Note. LVSI — lymphovascular invasion; dMMR — deficient mismatch repair; NSMP — no specific molecular profile.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, молекулярная классификация РЭ FIGO 2023 продемонстрировала эффективность стратификации пациенток с учетом aberrантного геноти-

па, а также позволила сделать акцент на персонализации лечения и прогнозировании отдаленных результатов терапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. 262 с.
Malignant neoplasms in Russia in 2023 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2024. (In Russ.).
2. Berek J.S., Matias-Guiu X., Creutzberg C. et al. Endometrial cancer staging subcommittee, FIGO Women’s Cancer Committee. FIGO staging of endometrial cancer: 2023. *Int J Gynaecol Obstet* 2023;162(2):383–94. DOI: 10.1002/ijgo.14923
3. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии. Л., 1989. 462 с.
Bokhman Ya.V. Clinical practice guidelines on gynaecological cancers. Leningrad, 1989. 462 p. (In Russ.).
4. Talhouk A., McAlpine J.N. New classification of endometrial cancers: the development and potential applications of genomic-based classification in research and clinical care. *Gynecol Oncol Res Pract* 2016;13(3):14. DOI: 10.1186/s40661-016-0035-4
5. Santoro A., Angelico G., Travaglino A. et al. New pathological and clinical insights in endometrial cancer in view of the updated ESGO/ESTRO/ESP guidelines. *Cancers (Basel)* 2021;13(11):2623. DOI: 10.3390/cancers13112623
6. Eriksson L.S., Nastic D., Lindqvist P.G. et al. Combination of proactive molecular risk classifier for endometrial cancer (ProMisE) with sonographic and demographic characteristics in preoperative prediction of recurrence or progression of endometrial cancer. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2021;58(3):457–68. DOI: 10.1002/uog.23573
7. León-Castillo A., de Boer S.M., Powell M.E. et al. TransPORTEC consortium. Molecular classification of the PORTEC-3 trial for high-risk endometrial cancer: impact on prognosis and benefit from adjuvant therapy. *J Clin Oncol* 2020;38(29):3388–97. DOI: 10.1200/JCO.20.00549
8. León-Castillo A., Gilvazquez E., Nout R. et al. Clinicopathological and molecular characterisation of ‘multiple-classifier’ endometrial carcinomas. *J Pathol* 2020;250(3):312–22. DOI: 10.1002/path.5373
9. Vermij L., Smit V., Nout R., Bosse T. Incorporation of molecular characteristics into endometrial cancer management. *Histopathology* 2020;76(1):52–63. DOI: 10.1111/his.14015
10. Van den Heerik A., Horeweg N., Nout R.A. et al. PORTEC-4a: international randomized trial of molecular profile-based adjuvant treatment for women with high-intermediate risk endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2020;30(12):2002–7. DOI: 10.1136/ijgc-2020-001929
11. Ma X., Dong L., Liu X. et al. POLE/POLD1 mutation and tumor immunotherapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2022;41(1):216. DOI: 10.1186/s13046-022-02422-1
12. Travaglino A., Raffone A., Mollo A. et al. TCGA molecular subgroups and FIGO grade in endometrial endometrioid carcinoma. *Arch Gynecol Obstet* 2020;301(5):1117–25. DOI: 10.1007/s00404-020-05531-4
13. León-Castillo A., Britton H., McConechy M.K. et al. Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma. *J Pathol* 2019;250(3):323–35. DOI: 10.1002/path.5372
14. Van Gool I.C., Eggink F.A., Freeman-Mills L. et al. POLE proofreading mutations elicit an antitumor immune response in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21(14):3347–55. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0057
15. Раскин Г.А., Мухина М.С., Каурцева А.С. и др. Определение микросателлитной нестабильности и состояния генов репарации неспаренных нуклеотидов ДНК при опухолях различных локализаций. *Архив патологии* 2023;85(1):36–42. DOI: 10.17116/patol20238501136
Raskin G.A., Mukhina M.S., Kaurtseva A.S. et al. Microsatellite instability and DNA mismatch repair deficiency detection in tumors of various sites. *Arkhiv patologii = Russian Journal of Archive of Pathology* 2023;85(1):36–42. (In Russ.). DOI: 10.17116/patol20238501136
16. Bosquet J.G., Zhang Q., Cliby W.A. et al. Association of a novel endometrial cancer biomarker panel with prognostic risk, platinum insensitivity, and targetable therapeutic options. *PLoS One* 2021;16(1):e0245664. DOI: 10.1371/journal.pone.0245664
Демидова И.А., Филипенко М.Л., Цуканов А.С., Имянитов Е.Н. Микросателлитная нестабильность: нюансы лабораторной диагностики (позиция Межрегиональной организации молекулярных генетиков в онкологии и онкогематологии). *Вопросы онкологии* 2023;69(2):174–9. DOI: 10.37469/0507-3758-2023-69-2-174-179
Demidova I.A., Filipenko M.L., Tsukanov A.S., Imyanitov E.N. Microsatellite instability: nuances of laboratory diagnostics (position of the Interregional Organization of Molecular Geneticists in Oncology and Oncohematology). *Voprosy onkologii = Issues of Oncology* 2023;69(2):174–9. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2023-69-2-174-179
17. Jumaah A.S., Al-Haddad H.S., McAllister K.A. The clinicopathology and survival characteristics of patients with POLE proofreading mutations in endometrial carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2022;17(2):e0263585. DOI: 10.1371/journal.pone.0263585
18. Concin N., Matias-Guiu X., Vergote I. et al. ESGO/ESTRO/ESP Guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. *Virchows Arch* 2021;478(2):153–90. DOI: 10.1007/s00428-020-03007-z
19. Swift B.E., Gien L.T. Incorporating molecular diagnostics into treatment paradigms for endometrial cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2022;23(8):1121–34. DOI: 10.1007/s11864-022-00993-x
20. Momeni-Boroujeni A., Dahoud W., Vanderbilt C.M. et al. Clinicopathologic and genomic analysis of TP53-mutated endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res* 2021;27(9):2613–23. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-4436
21. Travaglino A., Raffone A., Mascolo M. et al. Clear cell endometrial carcinoma and the TCGA classification. *Histopathology* 2020;76(2):336–8. DOI: 10.1111/his.13976
22. Kim S.R., Cloutier B.T., Leung S. Molecular subtypes of clear cell carcinoma of the endometrium: opportunities for prognostic and predictive stratification. *Gynecol Oncol* 2020;158(1):3–11. DOI: 10.1016/j.ygyno.2020.04.043
23. Yano M., Ito K., Yabuno A. Impact of TP53 immunohistochemistry on the histological grading system for endometrial endometrioid carcinoma. *Mod Pathol* 2019;32:1023–31. DOI: 10.1038/s41379-019-0220-1

24. Bosse T., Nout R.A., McAlpine J.N. et al. Molecular classification of grade 3 endometrioid endometrial cancers identifies distinct prognostic subgroups. *Am J Surg Pathol* 2018;42(5):561–8. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001020
25. Stelloo E., Nout R.A., Osse E.M. et al. Improved risk assessment by integrating molecular and clinicopathological factors in early-stage endometrial cancer-combined analysis of the PORTEC cohorts. *Clin Cancer Res* 2016;22(16):4215–24. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2878
26. Momeni-Boroujeni A., Nguyen B., Vanderbilt C.M. et al. Genomic landscape of endometrial carcinomas of no specific molecular profile. *Mod Pathol* 2022;35(9):1269–78. DOI: 10.1038/s41379-022-01066-y
27. Nagel J., Paschoalini R.B., Barreto P.S.D. et al. Predictive biomarkers in endometrial carcinomas: a review of their relevance in daily anatomic pathology. *Surg Exp Pathol* 2024;7:21. DOI: 10.1186/s42047-024-00164-2
28. Gomez-Hidalgo N.R., Ramirez P.T., Ngo B. et al. Oncologic impact of micrometastases or isolated tumor cells in sentinel lymph nodes of patients with endometrial cancer: a meta-analysis. *Clin Transl Oncol* 2020;22(8):1272–9. DOI: 10.1007/s12094-019-02249-x
29. Panici P.B., Basile S., Maneschi F. et al. Systematic pelvic lymphadenectomy vs. no lymphadenectomy in early-stage endometrial carcinoma: randomized clinical trial. *Gynecol Oncol* 2008;100(23):1707–16. DOI: 10.1093/jnci/djn397
30. Malpica A., Euscher E.D., Hecht J.L. et al. Endometrial carcinoma, grossing and processing issues: recommendations of the International Society of Gynecologic Pathologists. *Int J Gynecol Pathol* 2019;38(1):9–24. DOI: 10.1097/PGP.0000000000000552
31. Abu-Rustum N.R., Zhou Q., Iasonos A. et al. The revised 2009 FIGO staging system for endometrial cancer: should the 1988 FIGO stages IA and IB be altered? *Int J Gynecol Cancer* 2011;21(3):511–6. DOI: 10.1097/IGC.0b013e31820cc305
32. Schwameis R., Fanfani F., Ebner C. et al. Verification of the prognostic precision of the new 2023 FIGO staging system in endometrial cancer patients – an international pooled analysis of three ESGO accredited centres. *Eur J Cancer* 2023;193:113317. DOI: 10.1016/j.ejca.2023.113317
33. Matsuo K., Klar M., Song B.B. et al. Validation of the 2023 FIGO staging schema for advanced endometrial cancer. *Eur J Cancer* 2023;193:113316. DOI: 10.1016/j.ejca.2023.113316
34. Imboden S., Nastic D., Ghaderi M. et al. Implementation of the 2021 molecular ESGO/ESTRO/ESP risk groups in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2021;162(2):394–400. DOI: 10.1016/j.ygyno.2021.05.026
35. Oaknin A., Bosse T.J., Creutzberg C.L. et al. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2022;33:860–77. DOI: 10.1016/j.annonc.2022.05.009
36. Tuninetti V., Farolfi A., Rognone C. et al. Treatment strategies for advanced endometrial cancer according to molecular classification. *Int J Mol Sci* 2024;25(21):11448. DOI: 10.3390/ijms252111448
37. Acharya S. Is the PORTEC 4a trial exploring too little and too late? *Int J Gynecol Cancer* 2025;35(1):100039. DOI: 10.1016/j.ijgc.2024.100039

Вклад авторов

Л.Н. Любченко: анализ данных, написание текста статьи, редактирование;
 С.В. Мухтарулина, Е.Г. Новикова: обзор литературы по теме статьи, редактирование;
 М.А. Мешкова: анализ данных, написание текста статьи;
 З.А. Сидаква: проведение системного анализа;
 Н.Н. Волченко: анализ данных, редактирование.

Authors' contributions

L.N. Lyubchenko: data analysis, article writing, editing;
 S.V. Mukhtarulina, E.G. Novikova: literature review on the topic of the article, editing;
 M.A. Meshkova: data analysis, article writing;
 Z.A. Sidakova: conducting the system analysis;
 N.N. Volchenko: data analysis, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

L.N. Lyubchenko / Л.Н. Любченко: <https://orcid.org/0000-0002-1711-8334>, <https://orcid.org/0000-0002-9157-3589>
 С.В. Мухтарулина / S.V. Mukhtarulina: <https://orcid.org/0000-0001-7481-9631>
 М.А. Мешкова / M.A. Meshkova: <https://orcid.org/0000-0002-3961-921X>
 З.А. Сидаква / Z.A. Sidakova: <https://orcid.org/0009-0007-2024-9064>
 Н.Н. Волченко / N.N. Volchenko: <https://orcid.org/0000-0003-0421-4172>
 Е.Г. Новикова / E.G. Novikova: <https://orcid.org/0000-0003-3537-6377>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа проведена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 03.12.2024. **Принята к публикации:** 14.05.2025. **Опубликована онлайн:** 23.06.2025.

Article submitted: 03.12.2024. **Accepted for publication:** 14.05.2025. **Published online:** 23.06.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-47-57>

Механизмы цитотоксичности пассивной анти-GD2-иммунотерапии при опухолях детского возраста

М.Е. Мельников¹, С.А. Кулева^{1,2}, Г.В. Кондратьев¹, М.М. Васильева¹, О.Е. Савельева¹

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России; Россия, 194100 Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68

Контакты: Максим Евгеньевич Мельников melmakse@gmail.com

Клетки нейробластомы, сарком мягких тканей, остеосаркомы, саркомы Юинга и некоторых других опухолей у детей и взрослых способны экспрессировать дисialogанглизид GD2. Включение в протоколы терапии нейробластомы анти-GD2-моноклональных антител позволило улучшить результаты лечения. Проводятся исследования эффективности использования этих моноклональных антител и при других опухолях.

В данном обзоре описаны основные клеточные и молекулярные процессы, происходящие при пассивной анти-GD2-иммунотерапии при опухолях детского возраста, а также факторы, способные повлиять на них. Мы пришли к выводу, что ведущую роль в развитии цитотоксичности играет антителозависимая клеточная цитотоксичность, реализуемая естественными киллерами по классическому механизму с индукцией каспазазависимого апоптоза, а также макрофагами и нейтрофилами посредством фагоцитоза, трофоцитоза и прямой цитотоксичности. Эффективному фагоцитозу способствует экспрессия кальретикулина опухолевыми клетками и рецептора LRP1 фагоцитами, а уклонению от фагоцитоза – экспрессия опухолевыми клетками CD47 и его взаимодействие с SIRPα на фагоцитах. Параллельно происходит активация Т-клеточного адаптивного иммунного ответа. Использование гранулоцитарного и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующих факторов может усиливать цитотоксичность. Добавление экзогенного интерлейкина 2 не повышает эффективность лечения, а применение интерлейкинов 15 и 21 усиливает цитотоксичность *in vitro*, что требует проведения клинических исследований. Комплементзависимая цитотоксичность, вероятно, не оказывает влияния на терапевтическую эффективность пассивной анти-GD2-иммунотерапии. Опухолевое микроокружение и молекулярные особенности иммунокомпетентных клеток могут влиять на анти-GD2-опосредованную цитотоксичность, особенно при совместном использовании анти-GD2 моноклональных антител и ингибиторов рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1). Таким образом, дальнейшее изучение данного вопроса особенно актуально. Анти-GD2-моноклональные антитела могут снижать пролиферативную активность и индуцировать апоптоз опухолевых клеток путем ингибирования сигнальных путей (главным образом PI3K/Akt/mTOR), транскрипционных факторов, комплексов фокальной адгезии и интегринов. Вероятны и механизмы индукции митохондриальнозависимой клеточной гибели, имеющей признаки апоптоза и некроза.

Ключевые слова: GD2, моноклональное антитело, опухоль детского возраста, иммунотерапия, цитотоксичность, апоптоз

Для цитирования: Мельников М.Е., Кулева С.А., Кондратьев Г.В. и др. Механизмы цитотоксичности пассивной анти-GD2-иммунотерапии при опухолях детского возраста. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(2):47–57.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-47-57>

Cytotoxicity mechanisms of passive anti-GD2 immunotherapy in pediatric tumors

M.E. Melnikov¹, S.A. Kulyova^{1,2}, G.V. Kondratiev¹, M.M. Vasilyeva¹, O.E. Savelieva¹

¹Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Health of Russia; 2, Litovskaya St., Saint Petersburg 194100, Russia;

²N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaya St., Pesochny Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia

Contacts: Maksim Evgenievich Melnikov melmakse@gmail.com

Cells of neuroblastoma, soft tissue sarcomas, osteosarcoma, Ewing's sarcoma and some other tumors in children and adults are able to express disialoganglioside GD2. The introduction of anti-GD2 monoclonal antibodies into neuroblastoma treatment protocols has improved outcomes. Studies of the effectiveness of using anti-GD2 monoclonal antibodies in other tumors are also underway.

In this review, we describe the main cellular and molecular processes occurring during passive anti-GD2 immunotherapy in pediatric tumors, as well as the factors that can affect them. We concluded that the leading role belongs to antibody-dependent cellular cytotoxicity realized by natural killers via the classical mechanism with the induction of caspase-dependent apoptosis, as well as macrophages, neutrophils through phagocytosis, trogocytosis and direct cytotoxicity. Efficient phagocytosis is promoted by expression of calreticulin by tumor cells and LRP1 receptor by phagocytes, while expression of CD47 by tumor cells and its interaction with SIRP α on phagocytes contribute to evasion of phagocytosis.

In parallel, activation of T-cell adaptive immune response occurs. The use of granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors can enhance cytotoxicity. Addition of exogenous interleukin 2 does not improve the effectiveness of treatment, and the use of interleukins 15 and 21 enhances cytotoxicity *in vitro*, which requires clinical trials. Complement-dependent cytotoxicity probably does not affect the therapeutic efficacy of passive anti-GD2 immunotherapy. Tumor microenvironment and molecular features of immunocompetent cells can affect anti-GD2-mediated cytotoxicity, especially when used in combination with programmed cell death 1 (PD-1) inhibitors, thus, further study of this issue is especially relevant. Anti-GD2 monoclonal antibodies directly reduce the proliferative activity and induce apoptosis of tumor cells by inhibiting signaling pathways (mainly PI3K/Akt/mTOR), transcription factors, focal adhesion complexes, and integrins. Mechanisms for inducing mitochondria-dependent cell death, which has signs of apoptosis and necrosis, are also probable.

Keywords: GD2, monoclonal antibody, pediatric tumor, immunotherapy, cytotoxicity, apoptosis

For citation: Melnikov M.E., Kulyova S.A., Kondratiev G.V. et al. Cytotoxicity mechanisms of passive anti-GD2 immunotherapy in pediatric tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(2):47–57. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-47-57>

ВВЕДЕНИЕ

Применение мультимодальных подходов к терапии, включающих полихимиотерапию (в том числе высокодозную), хирургическое вмешательство и лучевую терапию, на основании определения прогностических факторов и стратификации пациентов на группы риска позволило значительно улучшить результаты лечения детей со злокачественными новообразованиями. Все большее внимание уделяется выявлению специфических для злокачественных клеток молекул и прицельному воздействию на них. Одним из примеров таких мишеней является дисialogанглиозид GD2, который представляет собой гликофинголипид, состоящий из гидрофобного церамида и гидрофильного олигосахарида, содержащего 2 отрицательно заряженные сиаловые кислоты. Он экспрессируется в различных структурах центральной нервной системы плода и составляет 5–7 % всех ганглиозидов. В процессе взросления доля GD2 снижается до 2 %. Также этот ганглиозид определяется в периферических нервах, меланоцитах, клетках предстательной железы и Т-лимфоцитах.

Предполагается, что в нормальных условиях ганглиозиды принимают участие в клеточной адгезии, сигнализации и репарации нервной ткани, однако в злокачественных клетках GD2 посредством взаимодействия с интегринами, активации киназы фокальной адгезии (FAK) и сигнального пути PI3K (фосфоинозитид-3-киназа)/АКТ (протеинкиназа В)/mTOR (мишень рапамицина млекопитающих) усиливает подвижность и выживаемость клеток, пролиферацию,

в том числе не связанную с внеклеточным матриксом, дифференцировку и ангиогенез [1–4]. В 1980-х годах появились сообщения об обнаружении ганглиозидов GD2 на клетках нейробластомы (НБ), остеогенной саркомы, мягкотканых сарком и саркомы Юинга [5–7]. В дальнейшем в число педиатрических GD2-экспрессирующих опухолей вошли ретинобластомы, глиомы, меланомы, а также встречаемые у взрослых трижды негативный рак молочной железы и мелкоклеточный рак легкого. Тем не менее уровни экспрессии GD2 в клетках данных опухолей варьируют; наибольший показатель, достигающий почти 100 %, наблюдается при НБ [3, 8–11]. К настоящему времени получены мышиные моноклональные антитела (МоАТ) анти-GD2 3F8, 14G2a, гуманизированное МоАТ hu14.18K322A и другие, также в клиническую практику внедрены химерные антитела — динутуксимаб (ch14.18), динутуксимаб бета (ch14.18/CHO) и гуманизированное МоАТ накситамаб (hu3F8). Активно продолжается работа по модификации антител для достижения оптимального терапевтического эффекта и нивелирования нежелательной токсичности [12].

Применение специфических МоАТ внесло существенный вклад в повышение эффективности лечения детей с НБ группы высокого риска. Так, по данным исследования ANBL00032, применение динутуксимаба в консолидации позволило увеличить показатели долгосрочной общей и бессобытийной выживаемости на 20 % [13, 14]. Неоднократно продемонстрирован синергизм действия МоАТ и цитотоксических химиопрепаратов при НБ *in vitro* и *in vivo* [15–18]. В настоящее время

проводятся исследования по оценке эффективности воздействия на GD2 при остеосаркоме, саркоме Юинга, мягкотканых саркомах [11, 19], однако клиническая эффективность иммунотерапии при данных заболеваниях пока точно не определена. Исследование механизмов цитотоксичности пассивной GD2-направленной иммунотерапии представляет большой интерес в связи с необходимостью поиска новых точек приложения и повышения эффективности лечения.

Цель работы — описание основных клеточных и молекулярных процессов, происходящих при воздействии анти-GD2-МоАТ на GD2-экспрессирующие клетки при опухолях детского возраста, а также факторов, способных повлиять на реализацию цитотоксичности. Для этого мы проанализировали публикации, содержащие исчерпывающую информацию о механизмах цитотоксичности пассивной анти-GD2-иммунотерапии и факторах, воздействующих на нее, из баз данных Google Scholar, PubMed, Wiley, РИНЦ (Российский индекс научного цитирования) и др.

МЕХАНИЗМЫ ИММУНООПОСРЕДОВАННОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ

Принято считать, что наиболее важными противоопухолевыми механизмами действия анти-GD2-МоАТ являются антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) и комплементзависимая цитотоксичность.

Механизм АЗКЦ включает активацию NK-клеток (NK — естественные киллеры), нейтрофилов и макро-

фагов. Цитотоксическая активность NK-клеток опосредуется преимущественно мембранным рецептором $Fc\gamma RIIIA$ (CD16a), и при распознавании Fc-фрагмента анти-GD2-МоАТ на опсонизированных клетках происходит фосфорилирование иммунорецепторного мотива активации тирозина (ITAM) (рис. 1). Посредством активации сигнальных путей PI3K, транскрипционного ядерного фактора κB (NF- κB), киназы, регулируемой внеклеточным сигналом (ERK), и тирозинкиназ происходит дегрануляция NK-клеток, при этом молекулы перфоринов, соединяясь друг с другом в цитоплазматической мембране опухолевой клетки, образуют поры, через которые в клетку попадают гранзимы, активирующие каспазозависимый апоптотический каскад. Параллельно происходят активация рецепторов клеточной гибели семейства факторов некроза опухоли (TNF) и высвобождение интерферона γ ($INF\gamma$), который стимулирует презентацию близлежащими клетками (главным образом, дендритными клетками) опухолевого антигена молекулами главного комплекса гистосовместимости I (МНС I) и II (МНС II) классов и адаптивный (в частности $CD8^+$ -Т-лимфоцитарный) иммунный ответ [1, 2, 8, 20, 21]. Все больше данных свидетельствуют о том, что АЗКЦ инициируется NK-клетками $CD56^{dim}CD16^+$, вероятно, в связи со способностью данной субпопуляции активно продуцировать $INF\gamma$ в ранние сроки, что может быть индуцировано комбинацией интерлейкинов (IL) 1, 12 и 15 [20, 22], а истощение $CD56^+$ -клеток приводит к снижению цитотоксичности опухолеассоциированных лим-

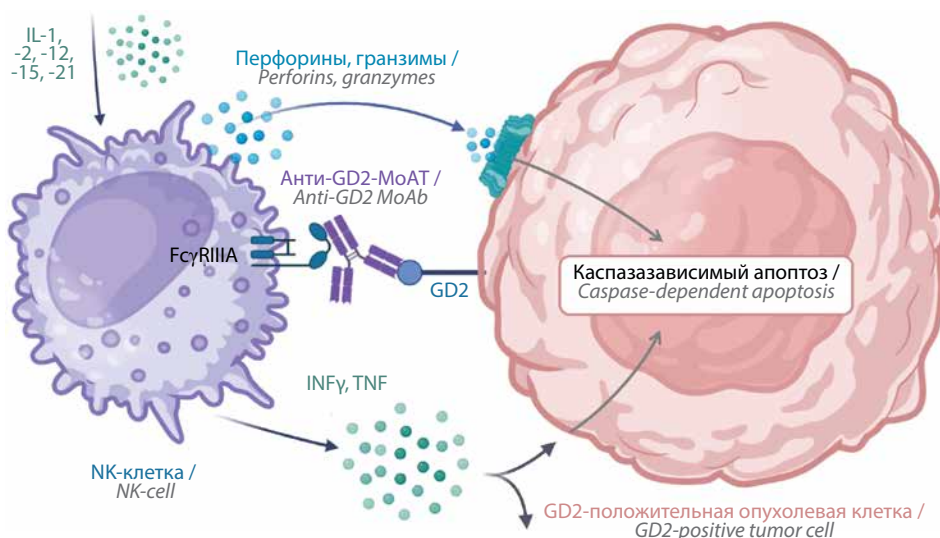


Рис. 1. Опосредованная естественными киллерами (NK) антителозависимая клеточная цитотоксичность. Взаимодействие моноклональных антител (МоАТ) с GD2 на поверхности опухолевой клетки и $Fc\gamma RIIIA$ с дальнейшим выбросом NK-клеткой перфоринов, гранзимов, а также интерферона γ ($INF\gamma$) и факторов некроза опухоли (TNF) с реализацией каспазозависимого апоптоза (процесс усиливается интерлейкинами (IL) 1, 2, 12, 15 и 21). Представлены ключевые аспекты антителозависимой клеточной цитотоксичности, пропорции условны. Рисунок создан с помощью BioRender.com

Fig. 1. Natural killer (NK) mediated antibody dependent cellular cytotoxicity. The interaction of monoclonal antibodies (MoAb) with GD2 on the surface of a tumor cell and $Fc\gamma RIIIA$ with subsequent release of perforins, granzymes, as well as interferon γ ($INF\gamma$) and tumor necrosis factors (TNF) by the NK cell with the implementation of caspase-dependent apoptosis (the process is enhanced by interleukins 1, 2, 12, 15 and 21). Key aspects of antibody-dependent cellular cytotoxicity are presented, the proportions are arbitrary. The figure was created using BioRender.com

фоцитов в отношении клеточных линий НБ *in vitro* [23]. Помимо этого, лизис клеток коррелирует с экспрессией NK-клетками CD69 — раннего маркера активации, а также CD107a — маркера дегрануляции [24, 25]. Также определено, что наличие полиморфизмов высокоаффинного Fcγ-рецептора и иммуноглобулинподобного рецептора клеток-киллеров (KIR) и его лиганда (KIRL) ассоциировано с более высокими уровнем АЗКЦ и показателями бессобытийной выживаемости [26, 27].

Анти-GD2 антитело-опосредованный фагоцитоз осуществляется путем активации макрофагов и нейтрофилов через рецепторы FcγRI (CD64) и FcγRIIa (CD32a), однако одного взаимодействия недостаточно — клетки должны экспрессировать кальретикулин, известный как сигнал «съешь меня», в норме выполняющий функции шаперона и кальциевого буфера в эндоплазматическом ретикулуме (рис. 2). Перемещаясь на поверхность клеточной мембраны, кальретикулин связывается с мембранными гликанами и закрепляется на поверхности клеток, взаимодействуя с рецептором белка 1, подобного рецептору липопротеинов низкой плотности (LRP1), присутствующим на фагоцитах [8, 28, 29]. Установлено, что анти-GD2-МоАТ, но не другие МоАТ, могут усиливать экспрессию кальретикулина клетками

НБ и стимулировать их фагоцитоз макрофагами [8]. Ускользанию от фагоцитоза макрофагами и нейтрофилами может способствовать экспрессия CD47 (интегрин-ассоциированный белок (IAP), сигнал «не ешь меня») и его взаимодействие с сигнальным регуляторным белком α (SIRPα), а ингибирование CD47/SIRPα усиливает опосредованную нейтрофилами АЗКЦ [30–33]. J. Theruvath и соавт. выявили мощный синергический эффект при комбинации анти-GD2- и анти-CD47-МоАТ в сингенных и ксенографтных мышинных моделях НБ, остеосаркомы и мелкоклеточного рака легкого в виде снижения опухолевой нагрузки и увеличения выживаемости. Лигирование GD2 на опухолевых клетках усиливает экспрессию поверхностного кальретикулина и прерывает взаимодействие GD2 с другим его специфическим лигандом — ингибиторным иммунорецептором SIGLEC7 (CD328) [30]. Помимо этого, нейтрофилы вызывают прямую цитотоксичность путем высвобождения активных форм кислорода, вызывающих окислительный стресс, а также первичных, вторичных и третичных гранул, содержащих цитотоксические молекулы (эластазу, миелопероксидазу, катепсины, дефензины, лактоферрин, аргиназу, матриксную металлопротеиназу 9 и др.) и запускающих апоптоз в клетках-мишенях [32, 33].

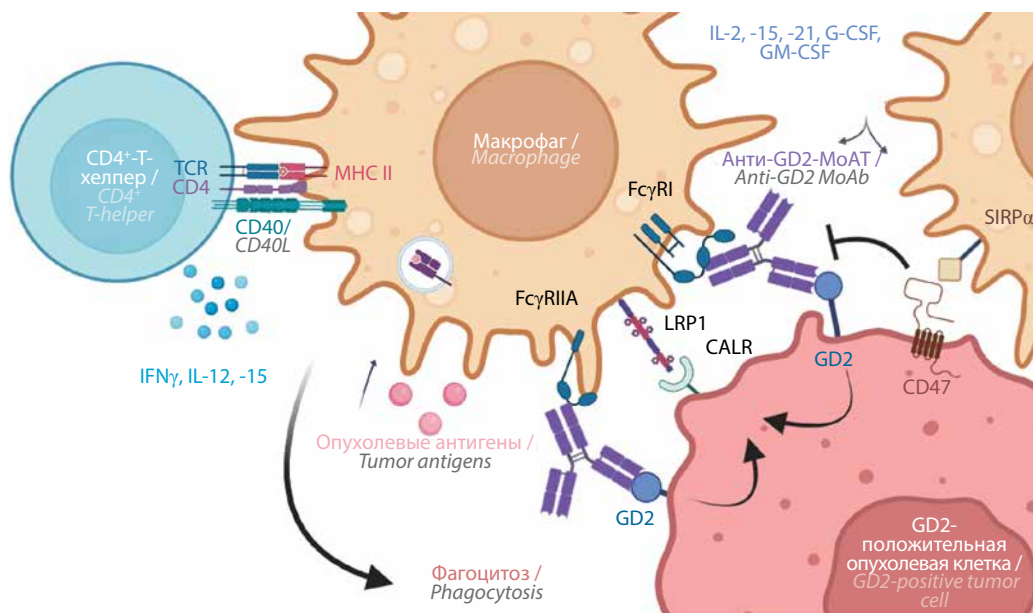


Рис. 2. Анти-GD2-антителозависимый фагоцитоз. Взаимодействие моноклональных антител (МоАТ) с GD2 на поверхности опухолевой клетки и с FcγRI, FcγRIIa, а также LRP1 с кальретикулином (CALR) с дальнейшей реализацией фагоцитоза, презентацией макрофагами опухолевых антигенов Т-хелперу и продукция им провоспалительных факторов (процесс усиливается интерлейкинами (IL) 2, 15, 21, гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим (GM-CSF) факторами). Взаимодействие CD47 с SIRPα ингибирует реализацию фагоцитоза. Представлены ключевые аспекты процесса, пропорции условны. Рисунок создан с помощью BioRender.com. IFNγ — интерферон γ; MHC II — главный комплекс гистосовместимости II класса; TCR — Т-клеточный рецептор; TNF — факторы некроза опухоли

Fig. 2. Anti-GD2 antibody dependent phagocytosis. The interaction of monoclonal antibodies (MoAb) with GD2 on the surface of a tumor cell and with FcγRI, FcγRIIa is shown, as well as the interaction of LRP1 with calreticulin (CALR) with further implementation of phagocytosis, presentation of tumor antigens by macrophages to T-helper and production of proinflammatory factors by them (the process is enhanced by interleukins (IL) 2, 15, 21, granulocyte-macrophage colony-stimulating (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony-stimulating (GM-CSF) factors). The interaction of CD47 with SIRPα inhibits the implementation of phagocytosis. The key aspects of the process are presented, the proportions are arbitrary. The figure was created using BioRender.com.; IFNγ — interferon γ; MHC II — major histocompatibility complex class II; TCR — T-cell receptor, TNF — tumor necrosis factors

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ В АНТИ-GD2-ОПОСРЕДОВАННОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ

Стандартные протоколы применения анти-GD2-МоАТ изначально включали использование экзогенных цитокинов — гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и IL-2, поскольку это способствовало модуляции нейтрофилов и NK-опосредованной АЗКЦ [29, 34]. Клетки НБ эффективно фагоцитируются активированными моноцитами/макрофагами, GM-CSF увеличивает количество и активность иммуностимулирующих опухолеассоциированных макрофагов M1, количество молекул адгезии на полиморфноядерных нейтрофилах и экспрессию МНС II, а также индуцирует активацию эндогенного IL-2, что модулирует презентацию опухолевого антигена на дендритных клетках и опосредованные Т-клетками противоопухолевые эффекты [29, 35, 36] (рис. 3). С учетом того, что GM-CSF недоступен для рутинного применения во многих странах мира в отличие от гра-

нулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), Р. Martinez Sanz и соавт. сравнили способность нейтрофилов, стимулированных *in vitro* и *in vivo* с помощью G-CSF и GM-CSF, уничтожать опсонизированные динутуксимабом GD2-положительные клеточные линии НБ и опухолевый материал метастаза НБ из костного мозга пациента. Установлено, что G-CSF вызывает нейтрофил-опосредованную цитотоксичность, аналогичную GM-CSF [37], требует экспрессии нейтрофилами рецептора FcγRIIa и CD11b/CD18 интегрина и сопровождается трогоцитозом фрагментов мембраны опухолевых клеток с последующим цитолизом, так как механическая деструкция нейтрофилами частей опсонизированной МоАТ мембраны приводит к лизису опухолевых клеток — трогоптозу, несущему черты некроза [33, 37]. Авторы отмечают, что необходимы дальнейшие исследования эффективности и безопасности использования в клинической практике G-CSF в качестве аналога GM-CSF [37].

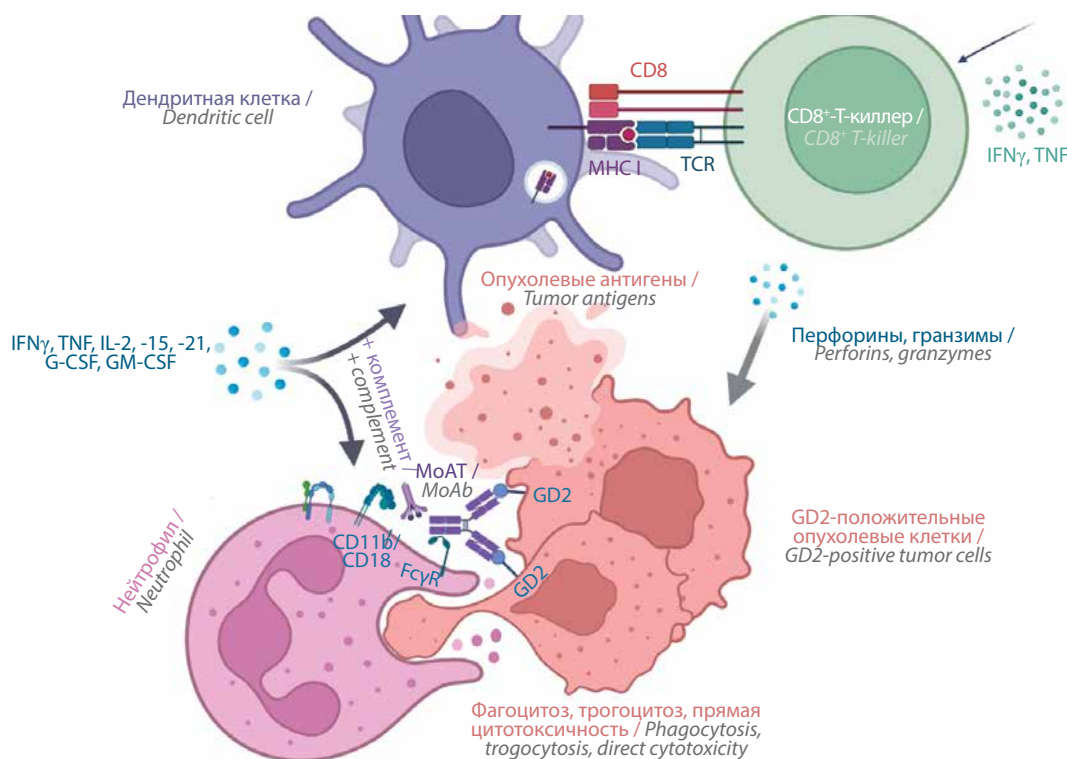


Рис. 3. Нейтрофил-опосредованная антителозависимая клеточная цитотоксичность. Взаимодействие моноклональных антител (МоАТ) с GD2 на поверхности опухолевых клеток с FcR нейтрофила с дальнейшей реализацией фагоцитоза, трогоцитоза, продукции активных форм кислорода и цитотоксических гранул, презентацией дендритной клеткой опухолевых антигенов Т-киллеру и продукции им цитотоксических факторов (процессы усиливаются интерфероном γ ($IFN\gamma$), факторами некроза опухоли (TNF), интерлейкинами (IL) 2, 12, 15, 21, гранулоцитарным колониестимулирующим (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим (GM-CSF) факторами). Белки системы комплемента принимают участие в реализации цитотоксичности. Представлены ключевые аспекты клеточной и комплементзависимой цитотоксичности, пропорции условны. Рисунок создан с помощью помощи BioRender.com. MHC I — главный комплекс гистосовместимости I класса; TCR — T-клеточный рецептор

Fig. 3. Neutrophil-mediated antibody dependent cellular cytotoxicity. The interaction of monoclonal antibodies (MoAb) with GD2 on the surface of tumor cells with neutrophil FcR with subsequent implementation of phagocytosis, trogocytosis, production of active oxygen forms and cytotoxic granules, presentation of tumor antigens by a dendritic cell to a T-killer and production of cytotoxic factors by it (the processes are enhanced by interferon γ ($IFN\gamma$), tumor necrosis factors (TNF), interleukins (IL) 2, 12, 15, 21, granulocyte colony-stimulating (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony-stimulating (GM-CSF) factors). Complement system proteins participate in the implementation of cytotoxicity. Key aspects of cellular and complement-dependent cytotoxicity are presented, proportions are arbitrary. The figure was created using BioRender.com. MHC I — major histocompatibility complex class I; TCR — T-cell receptor

Интересно, что использование экзогенного IL-2 с динутуксимабом бета связано лишь с увеличением токсичности и не влияет на эффективность терапии НБ. Таким образом, использование IL-2 при анти-GD2-иммунотерапии более не рекомендуется [38, 39]. Вследствие плейотропного действия на NK- и Т-клетки в качестве замены IL-2 рассматривают IL-15 и IL-21, использование которых сопровождается увеличением рекрутинга CD8⁺-Т-клеток, макрофагов M1 и снижением количества Т-регуляторных лимфоцитов, что может быть обусловлено активацией оси CXCL9/10 [1]. Y. Chu и соавт. исследовали *in vitro* цитотоксическое влияние динутуксимаба, N-803 (суперагониста IL-15) и *ex vivo* NK-клеток периферической крови против GD2-положительных клеток остеосаркомы, НБ и мультиформной глиобластомы. Выявлено, что применение комбинации динутуксимаба и N-803 значительно усиливает цитотоксичность NK-клеток *in vitro*, вызывает повышенное высвобождение перфорина, IFN γ и характеризуется увеличением выживаемости мышей с ксенографтными клетками НБ, остеосаркомы и глиобластомы [40].

РОЛЬ КОМПЛЕМЕНТА В АНТИ-GD2-ОПОСРЕДОВАННОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ

Активация комплементзависимой анти-GD2-цитотоксичности по классическому пути инициируется связыванием комплекса антиген — антитело с C1q с дальнейшей активацией каскада двумя способами. Первый способ характеризуется прямой комплемент-опосредованной цитотоксичностью путем сборки мембраноатакующего комплекса (C5b-C9). Второй способ заключается в том, что комплементарные рецепторы на эффекторных клетках (фагоцитах и NK-клетках) распознают опсоины, такие как C3b, и запускают комплементзависимую клеточную цитотоксичность и комплементзависимый клеточный фагоцитоз. При этом опухолевые клетки могут экспрессировать CD59, связывая белки комплемента C8 и C9, предотвращая сборку мембраноатакующего комплекса, а также CD55 (фактор ускорения распада комплемента, DAF) и CD46 (мембранный кофакторный белок, MCP), которые являются ингибиторами активации комплемента путем ограничения количества депонированного C3 [41–43]. При исследовании механизмов анти-GD2-цитотоксичности на клеточной линии EL4 выявлено, что экспрессия CD59 (белка-ингибитора мембраноатакующего комплекса, MAC-IP) эффективно защищает опухолевые клетки от комплементзависимой цитотоксичности, но не влияет на результат иммунотерапии [41]. Это может указывать на решающую роль АЗКЦ в реализации цитотоксичности.

Одним из наиболее частых нежелательных явлений при использовании анти-GD2-иммунотерапии является выраженный болевой синдром, требующий синхронного использования адьювантных, неопиоидных и опиоидных анальгетиков, у некоторых больных

также развивается аксональная периферическая полинейропатия. Данные эффекты обусловлены связыванием МоАТ с GD2 на периферических нервах и инициацией комплементзависимой цитотоксичности [44, 45]. W.L. Furman и соавт. установили, что использование в индукционной и консолидационной терапии НБ анти-GD2-МоАТ hu14.18K322A с точечной мутацией, блокирующей фиксацию C1q на МоАТ с целью снижения комплемент-опосредованной аллодинии, не оказывает влияния на терапевтическую эффективность, подтверждая ведущее значение АЗКЦ в реализации цитотоксичности [46, 47]. Аналогичные результаты получены М. Evers и соавт., которые изменили изотип динутуксимаба с иммуноглобулина (Ig) G1 на IgA1 и определили, что применение IgA1-динутуксимаба как на культурах клеток НБ, так и в эксперименте на мышах не активирует систему комплемента и не вызывает комплемент-опосредованную аллодинию. Более того, это привело к усилению нейтрофил-опосредованной АЗКЦ и противоопухолевого эффекта по сравнению с IgG1-динутуксимабом. Авторы объясняют это тем, что IgG1-изотип МоАТ может связываться в том числе с рецептором Fc γ RIIb (CD16b), ингибирующим цитотоксические функции нейтрофилов, а IgA1-динутуксимаб связывается исключительно с Fc α R (CD89) и не оказывает ингибирующий эффект [48].

ОПУХОЛЕВОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ И ПАССИВНАЯ АНТИ-GD2-ИММУНОТЕРАПИЯ: ВОЗМОЖЕН ЛИ СИНЕРГИЗМ?

Иммунный мониторинг во время терапии дает возможность изучать биологические механизмы ответа и резистентности, что позволяет идентифицировать прогностически значимые биомаркеры, потенциально помогая стратификации пациентов в зависимости от степени ответа [24]. Продемонстрированы более высокие показатели общей и бессобытийной выживаемости у пациентов с большей плотностью опухолеинфильтрирующих лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ в образцах НБ. *MYCN*-амплифицированные опухоли, являясь более агрессивными, характеризуются низким уровнем инфильтрации CD8⁺- и CD4⁺-Т-лимфоцитами, NK-, NKT-клетками, В-лимфоцитами, макрофагами и моноцитами, а также низкой экспрессией CCL2, IFN γ , CXCL9 и CXCL10 по сравнению с *MYCN*-неамплифицированными НБ независимо от стадии заболевания. Однако большая плотность и активность инфильтрирующих опухоль лимфоцитов при *MYCN*-амплифицированных опухолях ассоциирована с лучшим прогнозом [23, 24, 29, 49]. Помимо НБ, улучшение показателей выживаемости при наличии опухоль-инфильтрирующих CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов продемонстрировано при остеосаркоме [50], но не определено при других саркомах у детей. При этом опухоль-инфильтрирующие макрофаги чаще имеют иммуносупрессивный M2-фенотип, способствуют уклонению от иммунного

надзора и снижают степень выраженности NK-опосредованной АЗКЦ при использовании анти-GD2-MoAT [35, 51].

Большой интерес представляют исследования, посвященные вкладу иммунных контрольных точек, в особенности лиганду рецептора программируемой клеточной гибели (PD-L1), поскольку его экспрессия опухолевыми клетками является мощным ингибитором Т-клеточного ответа микроокружения и может быть связана с плохим прогнозом, а ингибирование рецептора программируемой клеточной гибели (PD-1) приводит к усилению клеточной цитотоксичности *in vitro* [23, 52]. Имеются данные о клинической эффективности ингибиторов иммунных контрольных точек при лимфомах, однако их активность при солидных опухолях у детей в монотерапии, вероятно, низка [53, 54]. Сообщается, что экспрессия PD-L1 CD8⁺-Т-лимфоцитами и NK-клетками микроокружения НБ в сочетании с ингибиторами PD-1 характеризуется улучшением противоопухолевой активности эффекторных клеток [55]. Большой интерес представляет возможность применения анти-GD2-MoAT вместе с ингибиторами PD-1 [56]. Так, комбинация субтерапевтических доз динутуксимаба бета в культурах клеток НБ с лейкоцитами показала выраженное усиление экспрессии PD-L1 и нивелирование эффекта АЗКЦ. Добавление ингибитора PD-1 ниволумаба приводило к восстановлению цитотоксичности, а применение динутуксимаба бета совместно с ниволумабом на сингенных PD-L1⁺/GD2⁺-мышинных моделях НБ — к снижению роста опухоли, увеличению выживаемости и усилению цитотоксического воздействия на клетки НБ [57]. Использование биспецифических (в том числе трифункциональных) анти-GD2-CD3-антител на мышинной модели НБ и меланомы совместно с моноклеарными лимфоцитами значительно повышало выживаемость и предотвращало рост опухоли и метастатических очагов [58–60]. При этом монотерапия MoAT приводила к повышению экспрессии PD-1 опухоль-инфильтрирующими Т-лимфоцитами, а сочетание с ингибитором PD-1 усиливало гуморальный иммунный ответ против опухолевых клеток [60].

Помимо экспрессии иммунных контрольных точек, прогностическое значение у пациентов с НБ группы высокого риска имеет экспрессия клетками микроокружения информационных рибонуклеиновых кислот маркеров FOXP3, ARG1, CD14, CD45, а также перфорина-1 дефицит в биоптатах опухоли при установлении диагноза, которая, по данным S. Stigliani и соавт., ассоциирована с лучшими показателями бессобытийной и общей выживаемости, тогда как экспрессия гранзима В не имеет прогностического значения [61].

На основе рассмотренных механизмов клеточной гибели можно предположить, что опухоль-инфильтрирующие лейкоциты могут модулировать реализацию анти-GD2-опосредованной цитотоксичности при различных опухолях, особенно при НБ. Таким образом,

изучение влияния опухолевого микроокружения и молекулярных особенностей иммунокомпетентных клеток на эффективность иммунотерапии актуально и требует дальнейшего изучения.

ВКЛАД НЕИММУННЫХ МЕХАНИЗМОВ АНТИ-GD2-АССОЦИИРОВАННОЙ КЛЕТЧНОЙ ГИБЕЛИ

Помимо описанных механизмов, анти-GD2-MoAT могут подавлять жизнеспособность опухолевых клеток независимо от иммунных клеток путем взаимодействия GD2 с сигнальным путем PI3K/Akt/mTOR, комплексами фокальной адгезии и интегринами [1, 2, 62]. M. Durbas и соавт. проанализировали цитотоксичность на клеточных линиях НБ с использованием антитела 14G2a и выявили специфическое ингибирование сигнального пути PI3K/Akt/mTOR в виде значительного снижения активности белков Akt, mTOR, p70S6 и 4E-BP1 и усиления активности супрессора PTEN, что привело к ингибированию сигнальной сети, отвечающей за стимуляцию трансляции и пролиферации (рис. 4). Сочетание 14G2a с ингибитором Akt перифосиноном, двойными ингибиторами mTOR/PI3K (BEZ-235 и SAR245409) и пан-ингибитором PI3K (LY294002) усиливало цитотоксические эффекты. Кроме того, отмечено ингибирующее действие 14G2a на канонический путь Wnt/β-катенин, семейство факторов транскрипции STAT, экспрессию киназы Aurora A, ERK1/2 и активирующее действие на митогенактивируемые протеинкиназы p38 и c-Jun N-концевые киназы (JNK), что способствует апоптозу и ассоциировано со снижением экспрессии MYCN. Уменьшение фосфорилирования FAK приводило к отделению клеток друг от друга, снижению их жизнеспособности и вызывало апоптоз [63]. На основании сведений о том, что анти-GD2-MoAT могут подавлять функционирование опухолевых клеток независимо от иммунных клеток, B. Liu и соавт. доказали, что *in vitro* MoAT 14G2a эффективно ингибируют непосредственно жизнеспособность, инвазивность культуры клеток остеосаркомы, а также экспрессию и активность матриксной металлопротеиназы 2, синтез которой индуцируется эндотелином-1 — пептидом, вероятно, принимающим участие в ингибировании апоптоза и стимуляции метастазирования при остеосаркоме. Авторы продемонстрировали, что сочетание с селективным антагонистом рецептора эндотелина-1 BQ123 усиливает действие 14G2a, скорее всего, за счет ингибирования пути PI3K/Akt [64]. Результаты исследования W. Zhu и соавт. показали, что 14G2a и цисплатин дозозависимо индуцируют каспаза-зависимый апоптоз в культурах клеток остеосаркомы путем активации, но не усиления экспрессии киназы эндоплазматического ретикулума, подобной протеинкиназе R (PERK), а в сочетании друг с другом они демонстрируют выраженный синергизм [65]. При этом J.P. Fisher и соавт. обнаружили, что динутуксимаб бета не проявляет неиммунную цитотоксичность в от-

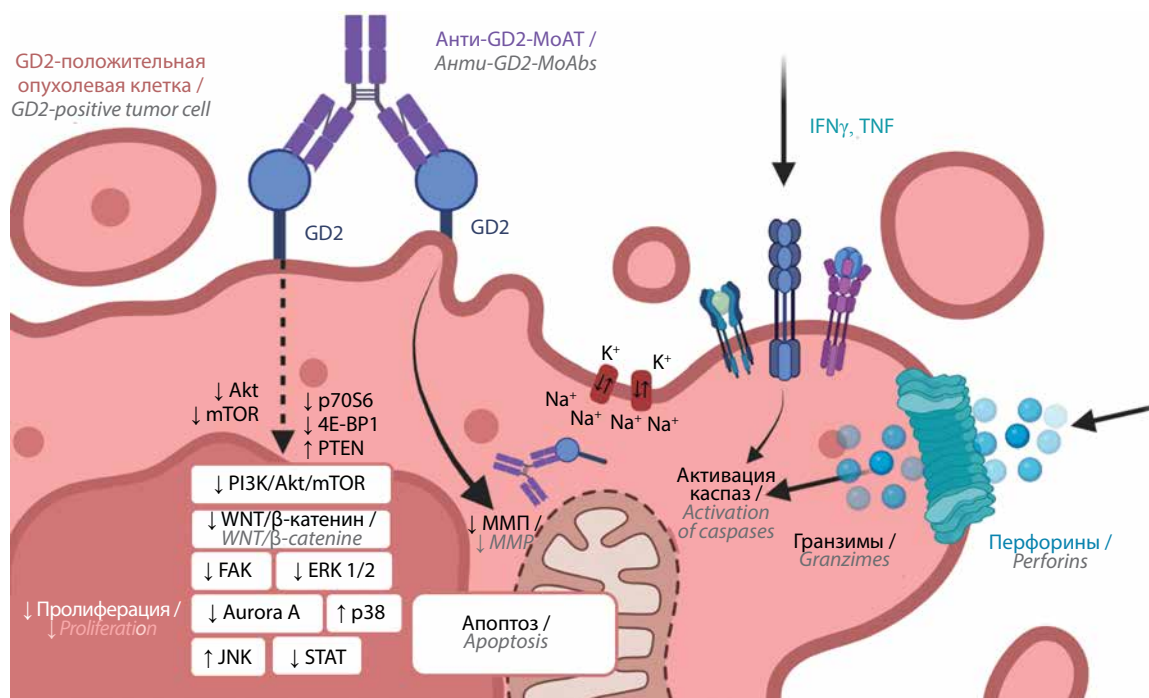


Рис. 4. Механизмы анти-GD2-ассоциированного апоптоза. При взаимодействии GD2 с моноклональными антителами (MoAT) происходит изменение активности сигнальных путей и транскрипционных факторов, что приводит к снижению пролиферативной активности и индукции апоптоза. Взаимодействие интерферона γ ($IFN\gamma$), факторов некроза опухоли (TNF) со специфическими рецепторами, проникновение гранзимов внутрь клетки через перфориновые поры вызывает активацию каспаз, проапоптотических белков и индуцирует апоптоз. Возможная интернализация GD2 с MoAT в митохондрии, вероятно, приводит к снижению митохондриального мембранного потенциала (ММП) и деполаризации клеточной мембраны с индукцией клеточной гибели различными способами. Представлены ключевые аспекты взаимодействий, пропорции условны. Рисунок создан с помощью BioRender.com. Akt — протеинкиназа B; ERK — внеклеточная киназа, регулирующая сигналы; FAK — киназа фокальной адгезии; JNK — c-Jun N-концевые киназы; mTOR — мишень рапамицина млекопитающих; PI3K — фосфоинозитид-3-киназы; PTEN — гомолог фосфатазы и тензина; STAT — белки семейства трансдукторов сигналов и активаторов транскрипции

Fig. 4. Mechanisms of anti-GD2 associated apoptosis. Interaction of GD2 with monoclonal antibody (MoAbs) alters the activity of signaling pathways and transcription factors, which leads to a decrease in proliferative activity and induction of apoptosis. Interaction of interferon γ ($IFN\gamma$), tumor necrosis factors (TNF) with specific receptors, penetration of granzymes into the cell leads through perforin to activation of caspases, proapoptotic proteins and induces apoptosis. Possible internalization of GD2 with MoAbs into mitochondria probably leads to a decrease in mitochondrial membrane potential (MMP) and depolarization of the cell membrane with induction of cell death in various ways. Key aspects of interactions are presented, the proportions are arbitrary. The figure was created using BioRender.com. Akt — protein kinase B; ERK — extracellular signal-regulated kinase; FAK — focal adhesion kinase; JNK — c-Jun N-terminal kinases; mTOR — mammalian target of rapamycin; PI3K — phosphoinositide 3-kinases; PTEN — phosphatase and tensin homolog; STAT — signal transducer and activator of transcription proteins

ношении клеток саркомы Юинга даже в концентрациях, превышающих терапевтические, в отличие от клеток НБ, независимо от уровня экспрессии GD2. При этом продемонстрирована выраженная АЗКЦ при сочетании динуксиама бета, IL-2 и золедроновой кислоты с цитотоксическими $\gamma\delta$ T-лимфоцитами *in vitro*, что может говорить об отсутствии механизмов неиммунной цитотоксичности при саркоме Юинга [66].

Результаты исследования I. Norwasik и соавт. показали, что действие 14G2a на GD2-положительные клеточные линии индуцирует прямую цитотоксичность, достоверно вызывая морфологические изменения клеток: округление, агрегацию, ослабление контакта с культуральным пластиком и разобщение клеток со снижением уровня клеточного аденозинтрифосфата. Реализация данных эффектов может быть обусловлена ингибированием интегринов, связанных с внеклеточным матриксом [67]. Аналогичные результаты

получены М. Thomas и соавт.: клетки активно слипались и формировали агрегаты при воздействии MoAT hu14.18K322A с исходом в апоптоз, некроптоз, при этом признаков некроза, ферроптоза и пироптоза выявлено не было [18]. Тем не менее эти исследования имеют ограничения, и авторские коллективы сообщают о необходимости проведения дополнительных тестов и уточнения роли других путей клеточной гибели [18, 67].

В то же время I.I. Doronin и соавт. в ходе исследования на клеточных линиях не обнаружили значимой активации каспазы-3 и других каспаз после обработки клеток анти-GD2-MoAT, по крайней мере, в качестве инициаторов апоптоза, по сравнению с клетками, обработанными индуктором каспазависимого апоптоза стауроспорином. Использование панкаспазного ингибитора Z-VAD-FMK также не оказало существенного влияния на жизнеспособность клеток, индуцированную антителами против GD2, при этом отмечено

снижение доли апоптотических клеток, обработанных стауроспорином. Авторы предположили, что обработка GD2-положительных клеток анти-GD2-МоАТ индуцирует неклассическую митохондриальнозависимую клеточную гибель с признаками как некроза, так и апоптоза (см. рис. 4). Первым элементом каскада митохондриальнозависимой гибели, вероятно, является быстрая гиперполяризация митохондриальной мембраны, апоптотическое уменьшение клеточного объема и снижение митохондриального мембранного потенциала (признаки апоптоза), а также значительное повышение проницаемости клеточной мембраны (признак некроза) [68]. Нельзя исключить вклад в реализацию GD2-опосредованного апоптоза механизма, аналогичного GD3: интернализации ганглиозида с антителом прямо в митохондрии посредством связывания с тубулином микротрубочек после активации Fas/CD95 и прямой индукции митохондриальнозависимой клеточной гибели [68, 69]. R. Tibbetts и соавт. также отметили, что уровень интернализации комплекса МоАТ с GD2 обратно пропорционален выраженности нейтрофил-опосредованной АЗКЦ, а уровень экспрессии GD2 не влияет на чувствительность к такой АЗКЦ [70].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ведущим механизмом эффективности GD2-направленной иммунотерапии при солидных опухолях детского возраста является, главным образом, АЗКЦ, реализуемая НК-клетками, макрофагами и нейтрофилами. Определенная роль в этом принадлежит и комплементзависимой цитотоксичности, однако клиническая значимость данного механизма, вероятно, не существенная. G-CSF, GM-CSF и IL могут усиливать цитотоксичность. Продолжается поиск соединений, способных модифицировать АЗКЦ. С учетом взаимодействия GD2 с сигнальными путями существуют и неиммунные механизмы цитотоксичности, обусловленные ингибированием путей клеточной сигнализации, главным образом PI3K/Akt/mTOR, а также неклассические митохондриальнозависимые пути при интернализации комплекса ганглиозида с антителом. Указанные механизмы способствуют апоптозу злокачественных клеток, при этом описаны и элементы некроза. Большую актуальность представляет исследование вклада опухолевого микроокружения в GD2-опосредованную цитотоксичность, определение факторов выраженности иммунного ответа и на основании этого — эффективности анти-GD2-иммунотерапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Machy P., Mortier E., Birklé S. Biology of GD2 ganglioside: implications for cancer immunotherapy. *Front Pharmacol* 2023;14:1249929. DOI: 10.3389/fphar.2023.1249929
2. Philippova J., Shevchenko J., Sennikov S. GD2-targeting therapy: a comparative analysis of approaches and promising directions. *Front Immunol* 2024;15:1371345. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1371345
3. Nazha B., Inal C., Owonikoko T.K. Disialoganglioside GD2 Expression in solid tumors and role as a target for cancer therapy. *Front Oncol* 2020;10:1000. DOI: 10.3389/fonc.2020.01000
4. Yesmin F., Bhuiyan R.H., Ohmi Y. et al. Ganglioside GD2 enhances the malignant phenotypes of melanoma cells by cooperating with integrins. *Int J Mol Sci* 2022;23(1):423. DOI: 10.3390/ijms23010423
5. Cheung N.K., Neely J.E., Landmeier B. et al. Targeting of ganglioside GD2 monoclonal antibody to neuroblastoma. *J Nucl Med* 1987;28(10):1577–83.
6. Heiner J.P., Miraldi F., Kallick S. et al. Localization of GD2-specific monoclonal antibody 3F8 in human osteosarcoma. *Cancer Res* 1987;47(20):5377–81.
7. Chang H.R., Cordon-Cardo C., Houghton A.N. et al. Expression of disialogangliosides GD2 and GD3 on human soft tissue sarcomas. *Cancer* 1992;70(3):633–8. DOI: 10.1002/1097-0142(19920801)70:3<633::aid-cnrcr2820700315>3.0.co;2-f
8. Chan G.C., Chan C.M. Anti-GD2 directed immunotherapy for high-risk and metastatic neuroblastoma. *Biomolecules* 2022;12(3):358. DOI: 10.3390/biom12030358
9. Orsi G., Barbolini M., Ficarra G. et al. GD2 expression in breast cancer. *Oncotarget* 2017;8(19):31592–600. DOI: 10.18632/oncotarget.16363
10. Dobrenkov K., Ostrovskaya I., Gu J. et al. Oncotargets GD2 and GD3 are highly expressed in sarcomas of children, adolescents, and young adults. *Pediatr Blood Cancer* 2016;63(10):1780–5. DOI: 10.1002/pbc.26097
11. Кулева С.А., Варфоломеева С.Р., Киргизов К.И. и др. Результаты использования химиоиммунотерапии при рефрактерных/рецидивирующих формах GD2-позитивных костных и мягкотканых сарком у детей. Первый опыт двух центров. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2024;11(4):11–9. DOI: 10.21682/2311-1267-2024-11-4-11-19
12. Kulyova S.A., Varfolomeeva S.R., Kirgizov K.I. et al. Results of chemoimmunotherapy for refractory/recurrent GD2-positive bone and soft tissue sarcomas in children. Two centers first experience. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2024;11(4):11–9. (In Russ.). DOI: 10.21682/2311-1267-2024-11-4-11-19
13. Park J.A., Cheung N.V. Targets and antibody formats for immunotherapy of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2020;38(16):1836–48. DOI: 10.1200/JCO.19.01410
14. Yu A.L., Gilman A.L., Ozkaynak M.F. et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010;363(14):1324–34. DOI: 10.1056/NEJMoa0911123
15. Yu A.L., Gilman A.L., Ozkaynak M.F. et al. Long-term follow-up of a phase III study of ch14.18 (dinutuximab) + cytokine immunotherapy in children with high-risk neuroblastoma: COG Study ANBL0032. *Clin Cancer Res* 2021;27(8):2179–89. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3909
16. Mody R., Yu A.L., Naranjo A. et al. Irinotecan, temozolomide, and dinutuximab with GM-CSF in children with refractory or relapsed neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2020;38(19):2160–9. DOI: 10.1200/JCO.20.00203
17. Federico S.M., McCarville M.B., Shulkin B.L. et al. A pilot trial of humanized anti-GD2 monoclonal antibody (hu14.18k322a)

- with chemotherapy and natural killer cells in children with recurrent/refractory neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2017;23(21):6441–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0379
17. Troschke-Meurer S., Zumpe M., Meißner L. et al. Chemotherapeutics used for high-risk neuroblastoma therapy improve the efficacy of anti-GD2 antibody dinutuximab beta in preclinical spheroid models. *Cancers (Basel)* 2023;15(3):904. DOI: 10.3390/cancers15030904
 18. Thomas M., Nguyen T.H., Drnevich J. et al. Hu14.18K.322A Causes direct cell cytotoxicity and synergizes with induction chemotherapy in high-risk neuroblastoma. *Cancers (Basel)* 2024;16(11):2064. DOI: 10.3390/cancers16112064
 19. Кулева С.А., Варфоломеева С.Р., Киргизов К.И. и др. Много-центровое открытое исследование III фазы по использованию динутуксимаба бета без/с химиотерапией по выбору исследователя у пациентов до 18 лет с костными и мягкотканными саркомами с положительным уровнем экспрессии GD2 и прогрессированием заболевания на фоне 1-й линии полихимиотерапии. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2024;11(2):12–20. DOI: 10.21682/2311-1267-2024-11-2-12-20
 - Kulyova S.A., Varfolomeeva S.R., Kirgizov K.I. et al. A phase III, multicenter, open-label study of dinutuximab beta without/with chemotherapy at the investigator's choice in patients under 18 years old with bone and soft tissue sarcomas with positive expression GD2 and disease progression during the first-line chemotherapy. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2024;11(2):12–20. (In Russ.). DOI: 10.21682/2311-1267-2024-11-2-12-20
 20. Wang W., Erbe A.K., Hank J.A. et al. NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2015;6:368. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00368
 21. Jhunjhunwala S., Hammer C., Delamarre L. Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion. *Nat Rev Cancer* 2021;21(5):298–312. DOI: 10.1038/s41568-021-00339-z
 22. De Maria A., Bozzano F., Cantoni C., Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim) CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(2):728–32. DOI: 10.1073/pnas.1012356108
 23. Wienke J., Dierselhuis M.P., Tytgat G.A.M. et al. The immune landscape of neuroblastoma: challenges and opportunities for novel therapeutic strategies in pediatric oncology. *Eur J Cancer* 2021;144:123–50. DOI: 10.1016/j.ejca.2020.11.014
 24. Szanto C.L., Cornel A.M., Vijver S.V., Nierkens S. Monitoring immune responses in neuroblastoma patients during therapy. *Cancers (Basel)* 2020;12(2):519. DOI: 10.3390/cancers12020519
 25. Aktas E., Kucuksez U.C., Bilgic S. et al. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol* 2009;254(2):149–54. DOI: 10.1016/j.cellimm.2008.08.007
 26. Siebert N., Jensen C., Troschke-Meurer S. et al. Neuroblastoma patients with high-affinity FCGR2A, -3A and stimulatory KIR 2DS2 treated by long-term infusion of anti-GD2 antibody ch14.18/CHO show higher ADCC levels and improved event-free survival. *OncoImmunology* 2016;5(11):e1235108. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1235108
 27. Erbe A.K., Diccianni M.B., Mody R. et al. KIR/KIR-ligand genotypes and clinical outcomes following chemoimmunotherapy in patients with relapsed or refractory neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Immunother Cancer* 2023;11(2):e006530. DOI: 10.1136/jitc-2022-006530
 28. Liu Y., Wang Y., Yang Y. et al. Emerging phagocytosis checkpoints in cancer immunotherapy. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8(1):104. DOI: 10.1038/s41392-023-01365-z
 29. Mora J., Modak S., Kinsey J. et al. GM-CSF, G-CSF or no cytokine therapy with anti-GD2 immunotherapy for high-risk neuroblastoma. *Int J Cancer* 2024;154(8):1340–64. DOI: 10.1002/ijc.34815
 30. Theruvath J., Menard M., Smith B.A.H. et al. Anti-GD2 synergizes with CD47 blockade to mediate tumor eradication. *Nat Med* 2022;28(2):333–44. DOI: 10.1038/s41591-021-01625-x
 31. Martinez-Sanz P., Hoogendijk A.J., Verkuiljen P.J.J.H. et al. CD47-SIRPα checkpoint inhibition enhances neutrophil-mediated killing of dinutuximab-opsonized neuroblastoma cells. *Cancers (Basel)* 2021;13(17):4261. DOI: 10.3390/cancers13174261
 32. Ustyankovskaya Avtenyuk N., Visser N., Bremer E., Wiersma V.R. The neutrophil: the underdog that packs a punch in the fight against cancer. *Int J Mol Sci* 2020;21(21):7820. DOI: 10.3390/ijms21217820
 33. Matlung H.L., Babes L., Zhao X.W. et al. Neutrophils kill antibody-opsonized cancer cells by trogoptosis. *Cell Rep* 2018;23(13):3946–59.e6. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.05.082
 34. Mora J., Castañeda A., Gorostegui M. et al. Naxitamab combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as consolidation for high-risk neuroblastoma patients in complete remission. *Pediatr Blood Cancer* 2021;68(10):e29121. DOI: 10.1002/pbc.29121
 35. Vitale C., Bottino C., Castriconi R. Monocyte and macrophage in neuroblastoma: blocking their pro-tumoral functions and strengthening their crosstalk with natural killer cells. *Cells* 2023;12(6):885. DOI: 10.3390/cells12060885
 36. Jeannin P., Paolini L., Adam C., Delneste Y. The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophages. *FEBS J* 2018;285(4):680–99. DOI: 10.1111/febs.14343
 37. Martinez Sanz P., van Rees D.J., van Zogchel L.M.J. et al. G-CSF as a suitable alternative to GM-CSF to boost dinutuximab-mediated neutrophil cytotoxicity in neuroblastoma treatment. *J Immunother Cancer* 2021;9(5):e002259. DOI: 10.1136/jitc-2020-002259
 38. Ladenstein R., Pötschger U., Gray J. et al. Toxicity and outcome of anti-GD2 antibody ch14.18/CHO in front-line, high-risk patients with neuroblastoma: final results of the phase III immunotherapy randomisation (HR-NBL1/SIOPEN trial). *JCO* 2016;34(15):10500. DOI: 10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.10500
 39. Ladenstein R., Pötschger U., Valteau-Couanet D. et al. Interleukin 2 with anti-GD2 antibody ch14.18/CHO (dinutuximab beta) in patients with high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2018;19(12):1617–29. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30578-3
 40. Chu Y., Nayyar G., Jiang S. et al. Combinatorial immunotherapy of N-803 (IL-15 superagonist) and dinutuximab with *ex vivo* expanded natural killer cells significantly enhances *in vitro* cytotoxicity against GD2+ pediatric solid tumors and *in vivo* survival of xenografted immunodeficient NSG mice. *J Immunother Cancer* 2021;9(7):e002267. DOI: 10.1136/jitc-2020-002267
 41. Imai M., Landen C., Ohta R. et al. Complement-mediated mechanisms in anti-GD2 monoclonal antibody therapy of murine metastatic cancer. *Cancer Res* 2005;65(22):10562–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1894
 42. Golay J., Taylor R.P. The role of complement in the mechanism of action of therapeutic anti-cancer mAbs. *Antibodies (Basel)* 2020;9(4):58. DOI: 10.3390/antib9040058
 43. Meyer S., Leusen J.H., Boross P. Regulation of complement and modulation of its activity in monoclonal antibody therapy of cancer. *MAbs* 2014;6(5):1133–44. DOI: 10.4161/mabs.29670
 44. Mastrangelo S., Rivetti S., Triarico S. et al. Mechanisms, characteristics, and treatment of neuropathic pain and peripheral neuropathy associated with dinutuximab in neuroblastoma patients. *Int J Mol Sci* 2021;22(23):12648. DOI: 10.3390/ijms222312648
 45. Barone G., Barry A., Bautista F. et al. Managing adverse events associated with dinutuximab beta treatment in patients with high-risk neuroblastoma: practical guidance. *Pediatr Drugs* 2021;23(6):537–48. DOI: 10.1007/s40272-021-00469-9
 46. Furman W.L., Federico S.M., McCarville M.B. et al. A phase II trial of Hu14.18K322A in combination with induction chemotherapy in children with newly diagnosed high-risk neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2019;25(21):6320–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1452

47. Furman W.L., McCarville B., Shulkin B.L. et al. Improved outcome in children with newly diagnosed high-risk neuroblastoma treated with chemioimmunotherapy: updated results of a phase II study using hu14.18K322A. *J Clin Oncol* 2022;40(4):335–44. DOI: 10.1200/JCO.21.01375
48. Evers M., Stip M., Keller K. et al. Anti-GD2 IgA kills tumors by neutrophils without antibody-associated pain in the preclinical treatment of high-risk neuroblastoma. *J Immunother Cancer* 2021;9(10):e003163. DOI: 10.1136/jitc-2021-003163
49. Mina M., Boldrini R., Citti A. et al. Tumor-infiltrating T lymphocytes improve clinical outcome of therapy-resistant neuroblastoma. *Oncoimmunology* 2015;4(9):e1019981. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1019981
50. Casanova J.M., Almeida J.S., Reith J.D. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and cancer markers in osteosarcoma: influence on patient survival. *Cancers (Basel)* 2021;13(23):6075. DOI: 10.3390/cancers13236075
51. Liu K.X., Joshi S. “Re-educating” tumor associated macrophages as a novel immunotherapy strategy for neuroblastoma. *Front Immunol* 2020;11:1947. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01947
52. Dondero A., Pastorino F., Della Chiesa M. et al. PD-L1 expression in metastatic neuroblastoma as an additional mechanism for limiting immune surveillance. *Oncoimmunology* 2015;5(1):e1064578. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1064578
53. Davis K.L., Fox E., Merchant M.S. et al. Nivolumab in children and young adults with relapsed or refractory solid tumours or lymphoma (ADVL1412): a multicentre, open-label, single-arm, phase 1–2 trial. *Lancet Oncol* 2020;21(4):541–50. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30023-1
54. Davis K.L., Fox E., Isikwei E. et al. A Phase I/II trial of nivolumab plus ipilimumab in children and young adults with relapsed/refractory solid tumors: a Children’s Oncology Group Study ADVL1412. *Clin Cancer Res* 2022;28(23):5088–97. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-2164
55. Song M., Huang Y., Hong Y. et al. PD-L1-expressing natural killer cells predict favorable prognosis and response to PD-1/PD-L1 blockade in neuroblastoma. *Oncoimmunology* 2023;13(1):2289738. DOI: 10.1080/2162402X.2023.2289738
56. Ehler K., Hansjuergens I., Zinke A. et al. Nivolumab and dinutuximab beta in two patients with refractory neuroblastoma. *J Immunother Cancer* 2020;8(1):e000540. DOI: 10.1136/jitc-2020-000540
57. Siebert N., Zumpe M., Jüttner M. et al. PD-1 blockade augments anti-neuroblastoma immune response induced by anti-GD2 antibody ch14.18/CHO. *Oncoimmunology* 2017;6(10):e1343775. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1343775
58. Xu H., Cheng M., Guo H. et al. Retargeting T cells to GD2 pentasaccharide on human tumors using bispecific humanized antibody. *Cancer Immunol Res* 2015;3(3):266–77. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0230-T
59. Zirngibl F., Ivasko S.M., Grunewald L. et al. GD2-directed bispecific trifunctional antibody outperforms dinutuximab beta in a murine model for aggressive metastasized neuroblastoma. *J Immunother Cancer* 2021;9(7):e002923. DOI: 10.1136/jitc-2021-002923
60. Ivasko S.M., Anders K., Grunewald L. et al. Combination of GD2-directed bispecific trifunctional antibody therapy with Pd-1 immune checkpoint blockade induces anti-neuroblastoma immunity in a syngeneic mouse model. *Front Immunol* 2023;13:1023206. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1023206
61. Stigliani S., Croce M., Morandi F. et al. Expression of FOXP3, CD14, and ARG1 in neuroblastoma tumor tissue from high-risk patients predicts event-free and overall survival. *Biomed Res Int* 2015;2015:347867. DOI: 10.1155/2015/347867
62. Sait S., Modak S. Anti-GD2 immunotherapy for neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2017;17(10):889–904. DOI: 10.1080/14737140.2017.1364995
63. Durbas M., Horwacik I., Boratyn E. et al. GD2 ganglioside specific antibody treatment downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling network in human neuroblastoma cell lines. *Int J Oncol* 2015;47(3):1143–59. DOI: 10.3892/ijo.2015.3070
64. Liu B., Wu Y., Zhou Y., Peng D. Endothelin A receptor antagonism enhances inhibitory effects of anti-ganglioside GD2 monoclonal antibody on invasiveness and viability of human osteosarcoma cells. *PLoS One* 2014;9(4):e93576. DOI: 10.1371/journal.pone.0093576
65. Zhu W., Mao X., Wang W. et al. Anti-ganglioside GD2 monoclonal antibody synergizes with cisplatin to induce endoplasmic reticulum-associated apoptosis in osteosarcoma cells. *Pharmazie* 2018;73(2):80–6. DOI: 10.1691/ph.2018.7836
66. Fisher J.P., Flutter B., Wesemann F. et al. Effective combination treatment of GD2-expressing neuroblastoma and Ewing’s sarcoma using anti-GD2 ch14.18/CHO antibody with Vγ9Vδ2+ γδT cells. *Oncoimmunology* 2015;5(1):e1025194. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1025194
67. Horwacik I., Rokita H. Modulation of interactions of neuroblastoma cell lines with extracellular matrix proteins affects their sensitivity to treatment with the anti-GD2 ganglioside antibody 14G2a. *Int J Oncol* 2017;50(5):1899–914. DOI: 10.3892/ijo.2017.3959
68. Doronin I.I., Vishnyakova P.A., Kholodenko I.V. et al. Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells. *BMC Cancer* 2014;14:295. DOI: 10.1186/1471-2407-14-295
69. Sorice M., Matarrese P., Tinari A. et al. Raft component GD3 associates with tubulin following CD95/Fas ligation. *FASEB J* 2009;23(10):3298–308. DOI: 10.1096/fj.08-128140
70. Tibbetts R., Yeo K.K., Muthugounder S. et al. Anti-disialoganglioside antibody internalization by neuroblastoma cells as a mechanism of immunotherapy resistance. *Cancer Immunol Immunother* 2022;71(1):153–64. DOI: 10.1007/s00262-021-02963-y

Вклад авторов

М.Е. Мельников: поиск, анализ и интерпретация данных литературы, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала; С.А. Кулева, О.Е. Савельева: интерпретация данных литературы, написание текста статьи, научное редактирование; Г.В. Кондратьев, М.М. Васильева: поиск, анализ и интерпретация данных литературы, написание текста статьи.

Authors’ contributions

M.E. Melnikov: search, analysis and interpretation of literary data, article writing, preparation of illustrative material; S.A. Kulyova, O.E. Savelyeva: interpretation of literary data article writing, scientific editing; G.V. Kondratiev, M.M. Vasilyeva: search, analysis and interpretation of literary data, writing the text of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.Е. Мельников / M.E. Melnikov: <https://orcid.org/0000-0003-4744-0882>
 С.А. Кулева / S.A. Kulyova: <https://orcid.org/0000-0003-0390-8498>
 Г.В. Кондратьев / G.V. Kondratiev: <https://orcid.org/0000-0002-1462-6907>
 М.М. Васильева / M.M. Vasilyeva: <https://orcid.org/0009-0000-1190-7220>
 О.Е. Савельева / O.E. Savelyeva: <https://orcid.org/0000-0002-0301-8455>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was completed without external funding.

Статья поступила: 03.03.2025. Принята к публикации: 28.04.2025. Опубликовано онлайн: 23.06.2025.

Article submitted: 03.03.2025. Accepted for publication: 28.04.2025. Published online: 23.06.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-58-67>

Детерминанты ферроптоза – потенциальные предикторы и терапевтические мишени для острого миелоидного лейкоза

В.Е. Шевченко, Т.И. Кушнир, М.В. Гудкова, Н.Е. Арноцкая

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

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Ферроптоз (ФП) – один из видов неапоптотической программируемой гибели клеток, связанной с железозависимым перекисным окислением липидов. При нем наблюдаются снижение активности глутатионпероксидазы 4 (GPX4), необходимой для подавления перекисного окисления липидов, накопление редокс-активного железа и окисление фосфолипидов клеточной мембраны, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты. ФП играет главную роль в механизмах старения организма человека, регулируя дегенерацию – основную причину повреждения тканей и органной недостаточности. Он вносит значительный вклад в развитие возрастных патологий, включая нейродегенеративные состояния, сердечно-сосудистые заболевания и рак. Особый интерес представляет участие ФП в патогенезе возрастзависимых онкологических заболеваний, включая острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). Проведенные ранее исследования показывают, что ФП в значительной степени регулирует чувствительность клеток ОМЛ к химиотерапевтическим препаратам, а некоторые из генов, связанные с ним, играют жизненно важную роль в онкогенезе ОМЛ. Кроме того, представляют интерес исследования влияния иммунной инфильтрации на ФП и прогноз ОМЛ. Таким образом, углубленное изучение уникального механизма ФП при ОМЛ может дать новые представления о диагностике и лечении этого заболевания.

В данном обзоре проанализированы основные регуляторные молекулярные механизмы ФП и его взаимосвязь с возникновением и развитием ОМЛ. Кроме того, обобщены последние достижения в изучении роли ФП в прогнозе и терапии данной патологии.

Ключевые слова: ферроптоз, острый миелоидный лейкоз, активная форма кислорода, липидный обмен, метаболизм железа

Для цитирования: Шевченко В.Е., Кушнир Т.И., Гудкова М.В., Арноцкая Н.Е. Детерминанты ферроптоза – потенциальные предикторы и терапевтические мишени для острого миелоидного лейкоза. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(2):58–67.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-58-67>

Ferroptosis determinants – potential predictors and therapeutic targets for acute myeloid leukemia

V.E. Shevchenko, T.I. Kushnir, M.V. Gudkova, N.E. Arnotskaya

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

Contacts: Valery Evgenievich Shevchenko vshev2015@yandex.ru

Ferroptosis (FP) is a type of non-apoptotic programmed cell death associated with iron-dependent lipid peroxidation. FP is characterized by a decrease in the activity of glutathione peroxidase 4, which is necessary for the suppression of lipid peroxidation, accumulation of redox-active iron and oxidation of cell membrane phospholipids containing polyunsaturated fatty acids. FP plays a central role in the mechanisms of human aging, regulating degeneration – the main cause of tissue damage and organ failure. FP makes a significant contribution to the development of age-related pathologies, including neurodegenerative conditions, cardiovascular diseases, and cancer. Of particular interest is the participation of FP in the pathogenesis of age-related oncological diseases, including acute myeloid leukemia (AML). Previous studies show that FP largely regulates the sensitivity of AML cells to chemotherapeutic drugs, and some of the FP-related genes play a vital role in AML oncogenesis. In addition, there is considerable interest in investigating

the effect of immune infiltration on FP and the prognosis of AML. Thus, an in-depth study of the unique mechanism of FP in AML may provide new insights into the diagnosis and treatment of this disease. This review analyzes the main regulatory molecular mechanisms of FP and the relationship of FP with the occurrence and development of AML. In addition, recent advances in the study of the role of FP in the prognosis and therapy of AML are summarized.

Keywords: ferroptosis, acute myeloid leukemia, reactive oxygen specie, lipid metabolism, iron metabolism

For citation: Shevchenko V.E., Kushnir T.I., Gudkova M.V., Arnotskaya N.E. Ferroptosis determinants – potential predictors and therapeutic targets for acute myeloid leukemia. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(2):58–67. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-58-67>

ВВЕДЕНИЕ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — клональное опухолевое заболевание кроветворной ткани, связанное с мутацией в гемопоэтических стволовых клетках (ГСК), следствиями которой являются блок дифференцировки и бесконтрольная пролиферация незрелых миелоидных бластов [1]. При ОМЛ происходят замещение кроветворной ткани в костном мозге аномальными клетками и нарушение его нормального микроокружения. В большинстве случаев конкретная причина возникновения ОМЛ неизвестна.

Считается, что ОМЛ в среднем заболевают 3–5 человек на 100 тыс. населения в год. При этом частота встречаемости этой патологии резко возрастает у пациентов старше 60 лет и у лиц старше 80 лет составляет 12–13 случаев на 100 тыс. человек. Медиана возраста возникновения ОМЛ — 65 лет, общая 5-летняя выживаемость — около 30 % [1].

В последние годы наблюдается значительный прогресс в диагностике и терапии ОМЛ, благодаря лучшему пониманию патогенных путей, вызывающих данную патологию, включая генетические характеристики и эпигенетические изменения [2]. Для лечения этого заболевания используется химиотерапия (ХТ) на базе многочисленных таргетных низкомолекулярных ингибиторов, а также трансплантация ГСК [3]. Внедрение данных препаратов значительно повысило выживаемость и качество жизни пациентов [4]. Однако прорыва в терапии ОМЛ не произошло, при этом заболевании наблюдается плохой прогноз из-за его агрессивного характера и высокой частоты развития рецидивов. Основная причина резистентности к терапии — формирование устойчивости клеток ОМЛ к индукции апоптоза с помощью различных механизмов [2, 3]. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования, направленные на разработку новых терапевтических подходов для улучшения прогноза ОМЛ.

С открытием ФП как железозависимого типа регулируемой гибели клеток в последние годы появились новые возможности в лечении гематологических опухолей, включая ОМЛ [5, 6]. Для выживания и роста злокачественным клеткам (ЗК) требуется большее количество железа, чем здоровым клеткам [7]. Так, ОМЛ обычно сопровождается перегрузкой железом, прояв-

ляющейся в основном повышенным уровнем ферритина. С учетом зависимости ЗК от железа они более уязвимы к железоиндуцированному апоптозу [8, 9]. Высокая экспрессия детерминант ФП SLC7A11 и GPX4 является фактором риска для пациентов с ОМЛ, а также может служить прогностическим маркером [10]. Кроме того, обнаружено, что индукторы ФП эрастин и RSL3 увеличивают противоопухолевую активность антрациклинов и цитарабина и ингибируют пролиферацию клеток ОМЛ [11]. Повышенный интерес к эрастину привел к открытию его более эффективных аналогов с высоким терапевтическим потенциалом [12].

Таким образом, регулирование сигнального каскада ФП для предотвращения развития и роста злокачественных новообразований вызывает все больший интерес в последние годы [13–15].

Цель работы — анализ роли ФП в развитии и прогнозе ОМЛ и определение возможностей использования ФП в качестве потенциальной терапевтической мишени ОМЛ.

ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФЕРРОПТОЗА

Ферроптоз отличается от апоптоза, некроза и аутофагии и характеризуется снижением объема митохондрий, увеличением плотности липидного бислоя и уменьшением количества или отсутствием митохондриальных крист, в то время как клеточная мембрана и ядерная морфология клеток остаются незатронутыми [16]. С биологической точки зрения образование перекисей липидов при ФП инициируется реакцией Фентона, в которой Fe^{2+} генерируют активные формы кислорода (АФК) на фоне снижения активности GPX4 и внутриклеточного уровня глутатиона (GSH) [17, 18] (рис. 1).

Молекулярные механизмы ФП в целом связаны с 4 сигнальными каскадами: 1) сигналингом GSH/GPX4; 2) ингибирующей системой Xc; 3) сигнальным каскадом мевалоната (MVA); 4) регулированием p53 (см. рис. 1) [14]. Субъединицы SLC7A11 и SLC3A2 составляют антитранспортерную систему Xc клеточной мембраны [19]. Глутамат и цистин импортируются и экспортируются системой Xc в соотношении 1:1. Далее цистин восстанавливается в клетке с образованием GSH, который в присутствии GPX может снижать уровень АФК. GPX4 является важнейшим

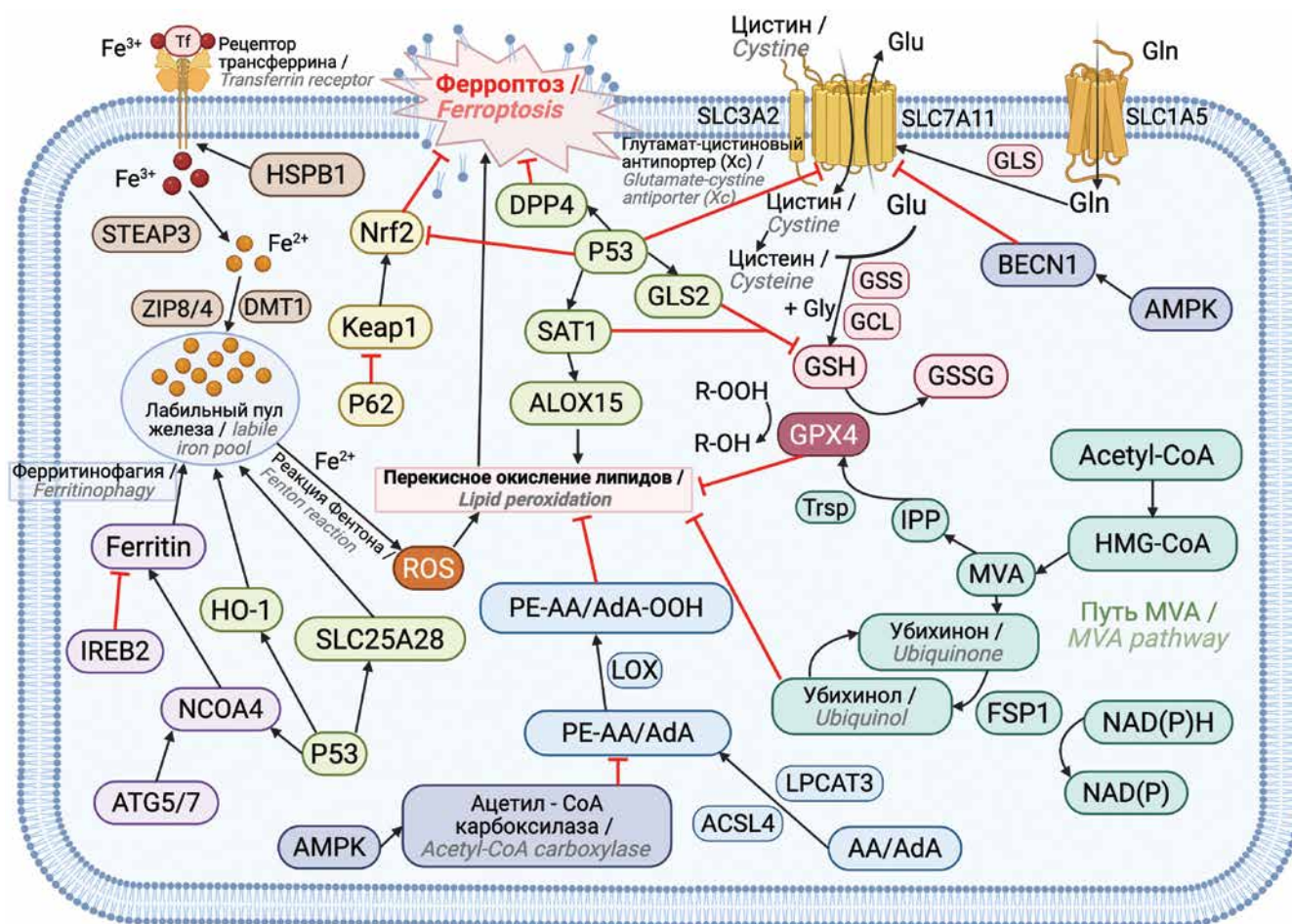


Рис. 1. Основные молекулярные механизмы ферроптоза. Разным цветом помечены различные метаболические процессы. GSH – глутатион; GPX4 – глутатионпероксидаза 4; GSSG – окисленный глутатион; SLC7A11 – член 11 семейства переносчиков растворенных веществ 7; SLC3A2 – член 2 семейства переносчиков растворенных веществ 3; R-OOH – перекись липидов; R-OH – липидные спирты; MVA – мевалонатный путь; HMG-CoA – гидроксиметилглутарил-CoA; IPP – изопентенилпирофосфат; TRSP – селеноцистеинспецифическая транспортная РНК; FSP1 – белок-супрессор ферроптоза 1; GLS2 – глутаминаза 2; SAT1 – спермин N1-ацетилтрансфераза 1; LOX – липоксигеназа; ALOX15 – арахидонат-15-липоксигеназа; BECN1 – беклин-1; DPP4 – дипептидилпептидаза-4; Keap1 – белок 1, ассоциированный с ECH; Nrf2 – фактор 2, связанный с ядерным фактором эритроида 2; HSPB1 – белок теплового шока семейства В (малый), член 1; TfR1 – рецептор трансферрина 1; STEAP3 – шеститрансмембранный эпителиальный антиген простаты 3; DMT1 – дивалентный транспортер металлов 1; ZIP8/4 – транспортер цинка ZIP8/4; NCOA4 – коактиватор ядерного рецептора 4; ATG5/7 – белок аутофагии 5; HO-1 – гемоксигеназа 1; SLC25A28 – член 28 семейства переносчиков растворенных веществ 25; AMPK – протеинкиназа, активируемая AMP; AA – арахидоновая кислота; AdA – производные аденола; PE-AA/AdA – фосфатидилэтанолламины; Acetyl-CoA – ацетилкофермент А; LPCAT3 – лизофосфолипид-ацилтрансфераза 3

Fig. 1. Basic molecular mechanisms of ferroptosis. Different colors represent different metabolic processes. GSH – glutathione; GPX4 – glutathione peroxidase 4; GSSG – oxidized glutathione; SLC7A11 – solute carrier family 7 member 11; SLC3A2 – solute carrier family 3 member 2; R-OOH – lipid hydrogen peroxide; R-OH – lipid alcohols; MVA – mevalonate pathway; HMG-CoA – hydroxymethylglutaryl-CoA; IPP – isopentenyl pyrophosphate; TRSP – selenocysteine-specific transfer RNA; FSP1 – ferroptosis suppressor protein 1; GLS2 – glutaminase 2; SAT1 – spermine N1-acetyltransferase 1; LOX – lipoxygenase; ALOX15 – arachidonate-15-lipoxygenase; BECN1 – beclin 1; DPP4 – dipeptidyl peptidase-4; Keap1 – ECH associated protein 1; Nrf2 – nuclear factor erythroid 2-related factor 2; HSPB1 – heat shock protein family B (small) member 1; TfR1 – transferrin receptor 1; STEAP3 – six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3; DMT1 – divalent metal transporter 1; ZIP8/4 – zinc transporter ZIP8/4; NCOA4 – nuclear receptor coactivator 4; ATG5/7 – autophagy protein 5; HO-1 – heme oxygenase 1; SLC25A28 – solute carrier family 25 member 28; AMPK – AMP-activated protein kinase; AA – arachidonic acid; AdA – adrenol derivatives; PE-AA/AdA – phosphatidylethanolamines; Acetyl-CoA – acetyl coenzyme A; LPCAT3 – lysophospholipid acyltransferase 3

регулятором железозависимой клеточной гибели в семействе GPX [20]. GPX4 преобразует перекиси липидов (R-OOH) в липидные спирты (R-OH), ограничивая железозависимое образование перекисей липидов, и защищает целостность клеточной мембраны от повреждений [21].

Каскад MVA синтезирует изопреновые звенья, такие как изопентенилпирофосфат (IPP) и диметилал-

лилпирофосфат (DMAPP), из ацетилкофермента А (ацетил-CoA) [22]. Этот сигналинг также необходим для включения селеноцистеина в селенопротеины посредством изопрецилирования белка. Ключевым селенопротеином для ФП является GPX4. Ингибирование пути MVA снижает синтез и активность GPX4 и ухудшает удаление перекисей липидов, сенситизируя клетки к ФП [23, 24]. Супрессия каскада MVA также

снижает синтез коэнзима Q_{10} — антиоксиданта, который в партнерстве с белком-супрессором ферроптоза 1 (FSP1) и NADH нейтрализует токсичные липидные радикалы, накапливающиеся в клетках. Таким образом, система коэнзима Q_{10} -FSP1-NADH действует антиферроптозным образом, задерживая индукцию окислительной гибели железозависимых клеток [25].

Внутриклеточный уровень железа имеет решающее значение для поддержания клеточного гомеостаза, а его повышение может вызвать реакцию Фентона и запуск ФП [26]. Таким образом, избыток железа дает возможность избирательно убивать лейкозные клетки и щадить нормальные кроветворные клетки, основываясь на их дифференциальных потребностях в железе. Транспорт железа в клетку осуществляется через трансферриновый рецептор (TfR1) за счет белков-переносчиков (серотрансферрин и лактотрансферрин) в эндосомах. TfR1 представляет собой мембранный белок, который связывается с комплексом Fe^{3+} /трансферрин, что позволяет высвобождать железо в эндоситарные везикулы внутри клетки [13]. Попадая внутрь везикул, нерастворимая форма трехвалентного железа (Fe^{3+}) восстанавливается до растворимой формы двухвалентного железа (Fe^{2+}) под действием фермента железоредуктазы STEAP. Под влиянием SLC11A2 через специальный канал Fe^{2+} высвобождается в цитоплазму, создавая нестабильный пул свободного железа, известный как лабильный пул железа (ЛПЖ) [27]. ЛПЖ регулируется либо цинк-железо-регуляторными белками ZIP8 и ZIP14, либо транспортным белком двухвалентного металла 1 (DMT1) [28]. Железо из ЛПЖ может храниться внутри белка ферритина или переноситься обратно из клетки через экспортный белок железа ферропортин (FPN), чтобы поддерживать низкий уровень ЛПЖ и предотвращать гибель клеток, вызванную железом. Используя TfR1 и FPN, клетки контролируют импорт и экспорт свободного железа, избегая его избытка, которое может вызвать окислительное повреждение [29].

Преобладающий путь поступления железа в цитозоль из ферритина контролируется селективной аутофагией, опосредованной ядерным рецептором коактиватора 4 (NCOA4), посредством которой NCOA4 связывает ферритин для транспортировки его в лизосому, где он разлагается, а затем железо высвобождается для использования клеткой [30]. Ферритин состоит из тяжелой (FTH1) и легкой (FTL) цепей [31]. Эрастин-индуцированный ФП ингибировали путем повышения уровней экспрессии FTL и FTH1 при значительном снижении уровней экспрессии главного регулятора метаболизма железа 2 (IREB2) — важнейшего транскрипционного фактора метаболизма железа [32, 33]. Сверхэкспрессия белка теплового шока β -1 (HSPB1) может еще больше повысить внутриклеточное содержание железа за счет увеличения экспрессии TfR1 [34].

Ферроптоз регулируется p53 с помощью нескольких механизмов [35, 36]:

- путем образования комплекса дипептидилпептидазы-4 (DPP4)-p53 и последующей транслокации фермента DPP4 из клеточной мембраны в ядро. Этот процесс снижает активность DPP4 на клеточной мембране, тем самым уменьшая перекисное окисление липидов (ПОЛ) и ингибируя ФП [37]. Опосредованное p53 ингибирование ФП также повышает уровни экспрессии SLC7A11 за счет ингибирования Nrf2-опосредованной экспрессии гена, что приводит к увеличению синтеза GSH и клиренса перекиси липидов [38, 39];
- p53 также может способствовать ФП благодаря нескольким механизмам: подавлению системы Xc, снижающей поглощение цистина и продукцию GSH [37], и транскрипционной активации глутаминазы-2 для снижения уровня GSH и активности GPX4 [36]. Выявлены дополнительные механизмы, с помощью которых p53 регулирует ФП, модулируя метаболизм и доступность железа [40]. p53 способствует ФП путем транскрипционной активации TfR1 и митохондриального импортера железа, содержащего SLC25A28, что приводит к увеличению поглощения и накопления реактивного железа, сенсibiliзирующего клетки к окислительному повреждению [41].

Кроме того, p53 может стимулировать деградацию белка ферритина, накапливающего железо, путем активации NCOA4. Это приводит к высвобождению и повышению уровня реактивного внутриклеточного железа [42]. И наоборот, p53 также может увеличивать экспрессию гемоксигеназы-1 (HO-1), которая уменьшает общий уровень клеточного железа. Снижая доступность железа, HO-1 ингибирует ПОЛ и подавляет ФП [43]. Несмотря на лучшее понимание метаболизма железа и молекулярных механизмов ФП, до сих пор невозможно точно оценить количество железа, необходимого для опухолевых и нормальных тканей, а также трудно измерить уровень запасов лабильного железа.

Еще один механизм связан с путями метаболизма липидов, такими как p53-SAT1-ALOX15, ACSL4, и каскадом лизофосфолипид-ацилтрансферазы (LPCAT3) [13]. Процесс ПОЛ имеет решающее значение для ФП. Спермин N1-ацетилтрансфераза 1 (SAT1) является транскрипционной мишенью p53 для сигнального пути p53-SAT1-ALOX15, а активация SAT1 может индуцировать ПОЛ для стимуляции ФП, который тесно связан с ALOX15 [16]. ПОЛ инициируется образованием арахидоновой кислоты (AA)/производных адреноила (AdA). Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), такие как AA и AdA, этерифицируются с образованием фосфолипидов на основе фосфатидилэтаноламина (PE-AA/AdA) под действием ACSL4 и LPCAT, что приводит к накоплению PE-AA/AdA в клеточной мембране с образованием перекисей липидов под действием липоксигеназ (LOXs) и реакции Фентона, которые индуцируют ФП [44]. Ферментативный путь использует LOXs, которые являются же-

лезосодержащими диоксигеназами. PE-AA/AdA служат субстратами для 15-LOX с образованием фосфолипидных гидропероксидов (PE-AA/AdA-OOH) [30, 45]. Эти пероксильные радикалы способствуют дальнейшему перекисному окислению соседних ПНЖК [27]. Кроме того, при неферментативном пути свободное редокс-активное железо вступает во взаимодействие с PE-AA/AdA посредством реакций Фентона с образованием мембранодестабилизирующих перекисей липидов [46]. В обоих случаях железозависимое перекисное окисление мембранных ПНЖК, катализируемое промежуточными продуктами PE-AA/AdA, приводит к чрезмерному повреждению свободными радикалами клеточной мембраны, потере ее целостности, истощению антиоксидантов и в конечном счете к осуществлению регулируемой гибели ферроптозных клеток [13, 47].

РОЛЬ ФЕРРОПТОЗА В ОНКОГЕНЕЗЕ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

Как уже отмечалось выше, железо играет большую роль в гемопоэзе и является необходимым компонентом клеток человека. После взаимодействия с комплексом трансферрин — железо мембранный белок TfR1 высвобождает железо посредством эндоцитоза. Когда экспрессия TfR1 подавлена, депривация железа снижает способность ГСК к регенерации и влияет на пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических клеток-предшественников. Накопление АФК, вызванное избытком железа, может привести к окислительному стрессу, повреждающему белки, ДНК, липиды и даже вызывающему гибель клеток [46, 48]. У пациентов с ОМЛ часто появляются тяжелые симптомы, вызванные избытком железа, в первую очередь из-за обширных переливаний крови, необходимых для лечения анемии, вызванной аномальным эритропоэзом и ХТ [30]. Кроме того, быстрая пролиферация специфических гемопоэтических клеток-предшественников у больных ОМЛ приводит к увеличению потребности в железе [49]. Таким образом, с учетом тенденции к перегрузке железом и зависимости ОМЛ от железа индукция ФП представляет собой многообещающий терапевтический подход [30, 49].

GPX4 — антиоксидантный фермент, который использует GSH для преобразования токсичных перекисей липидов в нетоксичные липиды, защищая клетки от ФП. Показано, что GPX4 активируется в клетках ОМЛ, ограничивая ФП за счет снижения уровня перекисей липидов, что в конечном счете увеличивает выживаемость клеток ОМЛ [44] и повышает лекарственную резистентность [50]. Таким образом, GPX4 играет решающую роль в прогрессировании ОМЛ и представляет собой многообещающую терапевтическую мишень.

Выживание ЗК, в частности за счет антиоксидантного ответа, регулируется редокс-чувствительным

Nrf2, который играет большую роль в защите от апоптоза [51]. Nrf2 связан с онкогенезом ОМЛ и регулируется транскрипционным ядерным фактором κ B (NF- κ B), обеспечивая рост ЗК и развитие лекарственной резистентности [52].

Липидный обмен и ФП тесно связаны, так как появление перекисей липидов является одним из признаков ФП [53]. У пациентов с ОМЛ нарушается липидный гомеостаз, а усиленный катаболизм нескольких классов липидов увеличивает риск развития лейкемии [54]. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования для идентификации конкретных молекулярных механизмов, участвующих в возникновении и развитии ОМЛ.

ДЕТЕРМИНАНТЫ ФЕРРОПТОЗА В ПРОГНОЗЕ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

При изучении прогностической значимости генов ФП для выживаемости пациентов с ОМЛ разработана клиническая прогностическая модель вероятности развития того или иного исхода лейкемии [55, 56]. Она потребовалась для улучшения текущей стратификации риска и предоставления большего количества терапевтических вариантов, которые способствуют улучшению исхода ОМЛ. Больных ОМЛ разделили на группы низкого и высокого рисков с учетом общей выживаемости и смертности. Для комбинированной оценки исхода заболевания применяли регрессионный анализ Кокса с учетом клинических характеристик пациентов с ОМЛ, таких как возраст и пол, и данных базы TCGA [56]. С учетом значения ФП при ОМЛ идентифицированы дифференциально экспрессируемые гены, на которые влияет ФП-статус. В результате проведенного анализа составлены наборы из 26 генов ФП, прогнозирующих высокую вероятность плохого исхода, и 12 генов ФП, при которых наблюдается более благоприятный прогноз заболевания (табл. 1) [57].

Функции белков генов ФП все чаще становятся предметом исследований, поскольку их определение способствует пониманию молекулярных механизмов онкогенеза ОМЛ и может служить руководством для будущих стратегий повышения эффективности прогноза и лечения этого заболевания.

DNAJB6 действует как молекулярный белок-шаперон, который функционирует вместе с HSP70, обеспечивая правильное сворачивание белков [58]. При ОМЛ низкие уровни экспрессии DNAJB6 связаны с улучшением прогноза. Полагают, что этот белок может действовать как защитный фактор [58, 59]. При ОМЛ уровни экспрессии HSPB1 также снижены, что рассматривается как негативный прогностический фактор. Фосфорилированная форма HSPB1 ингибирует апоптоз и индуцирует аутофагию, снижая при этом поглощение железа клетками и продукцию перекисей липидов, и таким образом защищает клетки ОМЛ [60]. Антиоксидантный фермент AIFM2 дейст-

Таблица 1. Наборы дифференциально экспрессированных генов ферроптоза для прогноза исхода пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) [57]

Table 1. Signatures of differentially expressed ferroptosis genes for predicting outcome of patients with acute myeloid leukemia (AML) [57]

Набор генов Set of genes	Ген Gene
Гены ферроптоза, предсказывающие плохой прогноз при ОМЛ Ferroptosis genes predict poor prognosis in AML	<i>HSPB1, CHAC1, CISD1, DPP4, GPX4, AIFM2, SQLE, PGD, ACSF2, ZFPM2, ZNF560, ZSCAN4, HMX2, HRASLS, LGALS1, LHX6, CCL23, FAM155B, CD44, FH, SESN2, LPCAT3, ACSL5, SOCS1, AKRIC2, SLC7A11</i>
Гены ферроптоза, предсказывающие более благоприятный прогноз при ОМЛ Ferroptosis genes predicting better prognosis in AML	<i>DNAJB6, MXRA5, PCDHB12, PRINS, TMEM56, TWIST1, ASTN1, DLL3, EFN3, FOXL1, ACSL6, G3BP1</i>

вует в сочетании с GPX4 и GSH, ингибируя перекисное окисление фосфолипидов и предотвращая ФП [56, 61]. Увеличение уровня холестерина повышает устойчивость ЗК к ФП. Холестерин влияет на метаболический мевалонатный каскад, способствуя деградации сквален-эпоксидазы (SQLE), ограничивающей скорость биосинтеза холестерина, тем самым увеличивая уровни как CoQ₁₀, так и сквалена. Повышенная экспрессия SQLE положительно коррелирует с пролиферацией и метастазированием при различных типах рака [62]. 6-фосфоглюконат дегидрогеназа (PGD) участвует в пентозофосфатном каскаде и сверхэкспрессируется во многих ЗК, способствуя их пролиферации, выживанию и метастазированию за счет перепрограммированной биоэнергетики опухоли [63]. Показано, что PGD способствует росту и развитию резистентности к терапии клеточных линий ОМЛ [64]. Роль ацил-КоА-синтетазы (ACSF2) в патогенезе ОМЛ неизвестна, но обнаружено, что ее высокая экспрессия коррелирует с плохим прогнозом при других онкологических заболеваниях. Например, при гепатоцеллюлярной карциноме высокая экспрессия ACSF2 связана с более низкими показателями общей и безрецидивной выживаемости пациентов. Механизмы и эффекты этого фермента при различных злокачественных опухолях все еще изучаются, но его большое значение в прогнозе ОМЛ привлекло широкое внимание [57, 65].

CHAC1 (γ-глутамилциклотрансфераза) регулирует ФП, влияя на внутриклеточный уровень GSH [66]. В частности, CHAC1 как участник реакции на стресс эндоплазматического ретикула индуцирует ФП, регулируя истощение глутатиона, способствуя накоплению внутриклеточного железа и ПОЛ [67].

Предполагается, что сериновая протеаза DPP4 регулирует ФП, воздействуя на мембраноассоциированные процессы ПОЛ [68]. Супрессор опухолей p53 (TP53) ингибирует ФП, напрямую подавляя активность DPP4, что свидетельствует о большой роли DPP4 в регуляции ФП [69]. Нарушение регуляции экспрессии DPP4 при ОМЛ заметно влияет на чувствительность к ХТ, однако задействованные в этом механизмы неясны [70]. GPX4 является ключевым регулятором ФП, ее ингибирование делает устойчивые

к терапии ЗК восприимчивыми к ФП, однако некоторые опухолевые клетки развивают механизмы резистентности, независимые от ФП [71]. Анализ роли семейства GPX в борьбе с ОМЛ показал, что высокая экспрессия GPX4 в образцах ОМЛ связана с низкими показателями общей выживаемости [72]. Фактор транскрипции bHLH семейства твистов 1 (TWIST1) как ключевой фактор в трансформации клеток играет решающую роль в процессе превращения нормальных клеток в раковые. Активность TWIST 1 может регулировать клеточный цикл в клетках ОМЛ, увеличивая их чувствительность к химиотерапевтическим препаратам и повышая эффективность лечения пациентов с ОМЛ, что улучшает прогноз [73]. Дельта-подобный канонический Notch лиганд 3 (DLL3) является нетрадиционным лигандом в сигнальном каскаде Notch. Повышенная регуляция DLL3 может оказывать регуляторное влияние на процессы роста и деления клеток ОМЛ, что в некоторых случаях связано с улучшением показателей выживаемости [74]. LGALS1 обычно ассоциируется с иммуномодулирующей функцией клеток. Повышенная экспрессия LGALS1 может поддерживать уклонение клеток ОМЛ от надзора иммунной системы и усиливать их лекарственную резистентность, что обуславливает плохой прогноз [75].

RHKG2 регулирует перекисное окисление ПНЖК, может влиять на чувствительность клеток к индукторам ФП, таким как эрастин, и модулировать процесс ФП [76]. HSD17B11 — фермент, участвующий в восстановлении или окислении половых гормонов, может быть вовлечен в регуляцию ФП в RSL3-резистентных клетках [77]. Металлредуктаза STEAP3 конвертирует железо из Fe³⁺ в Fe²⁺ и участвует в транскрипции генов апоптоза и регуляции ФП, в частности, благодаря своей роли в p53-опосредованных процессах [78]. HRAS может повышать чувствительность пациентов с ОМЛ к цитарабину [79]. Мутации в гене *HRAS* связаны с чувствительностью к определенным препаратам, таким как цитарабин при ОМЛ [80]. ARNTL ингибирует ФП, подавляя транскрипцию EGLN2 и активируя фактор транскрипции HIF1A, способствующий выживанию, а повышение регуляции ARNTL может увеличить восприимчивость к противоопухолевым препаратам [81].

SLC38A1 — медиатор поглощения глутамина и метаболизма ПОЛ — имеет большое значение для ФП, а высокие уровни его экспрессии связаны с плохим прогнозом при ОМЛ [82]. LPCAT3 способствует включению ПНЖК в фосфолипиды [83]. Ингибирование активности LPCAT3 снижает ПОЛ и уменьшает чувствительность клеток к индукторам ФП, таким как RSL3 и эрастин [84]. Следовательно, регуляция LPCAT3 может значительно влиять на возникновение ФП у пациентов с ОМЛ и потенциально служить новой терапевтической мишенью для лечения ОМЛ.

Таким образом, гены ФП и их продукты как самостоятельные прогностические факторы можно использовать для прогноза исхода при ОМЛ. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить, может ли оценка генов ФП в комбинации с другими нерегулирующими ФП молекулярными механизмами повысить точность прогностических моделей.

РЕГУЛЯТОРЫ ФЕРРОПТОЗА В ТЕРАПИИ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

Основным традиционным методом лечения в большинстве случаев ОМЛ остается ХТ, несмотря на серьезные побочные эффекты и развитие лекарственной резистентности [85]. Широкое применение трансплантации генов СК при терапии ОМЛ ограничено из-за возникновения рецидивов и значительного риска инфицирования в ходе трансплантации и после нее. В последнее время появляется все больше доказательств того, что ФП обладает необходимым потенциалом для успешного уничтожения резистентных клеток ОМЛ. Использование детерминант ФП в качестве таргетов считается новым перспективным подходом к терапии данного заболевания [86]. Тем не менее степень, в которой ФП влияет на химиорезистентность и прогноз при ОМЛ, требует дальнейшего изучения.

В последние годы достигнут значительный прогресс в изучении препаратов, нацеленных на детерминанты ФП, для лечения ОМЛ. К таким лекарственным средствам относятся низкомолекулярные ингибиторы, природные соединения и препараты на основе нанотехнологий, которые продемонстрировали потенциальные терапевтические эффекты в ходе клинических испытаний. Ранее показано, что многие вещества, включая APR-246, ALDH3A2, GCMNP и ряд других, индуцируют ФП в клетках ОМЛ, нарушая баланс между GSH и АФК и ингибируя синтез GPX4 [47, 87, 88]. Таргетная терапия является многообещающей стратегией при лечении ОМЛ. Продemonстрировано, что комбинация GCMNP с блокаторами лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1) может потенциально повысить эффективность лечения лейкемии [88]. Препарат GNPPI12MA улучшает иммунитет у больных ОМЛ, увеличивая инфильтрацию цитотоксических Т-клеток [89]. Регуляция ФП

также включает ряд сигнальных молекул и путей. Например, производные хиназолинона эрастин и HMGB1 [90] регулируют ФП через путь JNK/p38, в то время как дигидроартемизинин (ДНА) и тифанезид (ТУР) — через сигнальный путь 5'АМФ-активируемой протеинкиназы (АМРК) [91, 92].

В настоящее время открыты несколько перспективных природных соединений для лечения ОМЛ. Сообщается, что дигидроартемизинин (ДНА), полученный из широко известной китайской лекарственной травы *Artemisia annua*, значительно ингибирует активность клеток ОМЛ [91]. ТУР является основным флавоноидом, извлекаемым из пыльцы тифа. Выявлено, что ТУР играет большую роль в подавлении пролиферации клеток ОМЛ, способствуя активации сигнала АМРК, индуцируя аутофагию клеток ОМЛ, и в конечном счете вызывает деградацию ферритина, накопление АФК и ФП [92]. Гомокиол, представляющий собой биоактивное фитохимическое производное бисфенола, выделяемый из коры, семенных шариков и листьев деревьев, принадлежащих к роду *Magnolia* [93], обладает мощным антиоксидантным, противовоспалительным, антиангиогенным и противоопухолевым потенциалами и вызывает ФП в клетках ОМЛ [93].

Теломераза обеспечивает репликативное бессмертие при большинстве видов рака, включая ОМЛ. Имелтестат является первым в своем классе ингибитором теломеразы с клинической эффективностью при миелофиброзе и миелодиспластических синдромах. Он действует как мощный индуктор ФП через регуляцию метаболизма ПНЖК, способствуя активному ПОЛ и окислительному стрессу при ОМЛ [94].

Результаты проведенного анализа показали, что, несмотря на достигнутый прогресс, эффективность этих препаратов по сравнению со стандартными методами лечения ОМЛ все еще требует дальнейшей оценки. При внедрении индукторов ФП в клиническую практику для лечения ОМЛ необходимо принимать во внимание их безопасность, эффективность и долгосрочные эффекты. В дальнейших исследованиях следует учитывать также реальную чувствительность различных групп пациентов с ОМЛ к препаратам и методам лечения, а также индивидуальные характеристики пациентов. При таком подходе к разработке лекарственных средств может быть достигнуто заметное улучшение показателей выживаемости и качества жизни больных с данной патологией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы в изучении ФП при ОМЛ достигнут значительный прогресс. ФП — новая форма гибели клеток — отличается от апоптоза и обладает большим противоопухолевым потенциалом. Метаболические и генетические изменения в клетках ОМЛ создают благоприятную среду для ФП. Несколько его молекулярных мишеней, тесно связанных с ОМЛ,

включая GPX4, SLC7A11, FSP1 и DPP4, идентифицированы с помощью моделей ОМЛ. Кроме того, обнаружено, что некоторые препараты индуцируют ФП в клетках ОМЛ. Поскольку ФП участвует в метаболизме

и окислительном стрессе клеток ОМЛ, изучение его роли в онкогенезе и лекарственной устойчивости ОМЛ может пролить свет на новые возможности лечения этой патологии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Shallis R.M., Wang R., Davidoff A. et al. Epidemiology of acute myeloid leukemia: recent progress and enduring challenges. *Blood Rev* 2019;36:70–87. DOI: 10.1016/j.blre.2019.04.005
- Medinger M., Heim D., Halter J.P. et al. Diagnostik und therapie der akuten myeloischen leukämie. *Ther Umsch* 2019;76(9):481–6. DOI: 10.1024/0040-5930/a001126
- Pelcovits A., Niroula R. Acute myeloid leukemia: a review. *R I Med J* (2013) 2020;103(3):38–40.
- Döhner H., Wei A.H., Löwenberg B. Towards precision medicine for AML. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;18(9):577–90. DOI: 10.1038/s41571-021-00509-w
- Ren Y., Mao X., Xu H. et al. Ferroptosis and EMT: key targets for combating cancer progression and therapy resistance. *Cell Mol Life Sci* 2023;80(9):263. DOI: 10.1007/s00018-023-04907-4
- Zhang C., Liu X., Jin S. et al. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance. *Mol Cancer* 2022;21(1):47. DOI: 10.1186/s12943-022-01530-y
- Mou Y., Wang J., Wu J. et al. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. *J Hematol Oncol* 2019;12(1):34. DOI: 10.1186/s13045-019-0720-y
- Lei G., Zhuang L., Gan B. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer. *Nat Rev Cancer* 2022;22(7):381–96. DOI: 10.1038/s41568-022-00459-0
- Liang C., Zhang X., Yang M., Dong X. Recent progress in ferroptosis inducers for cancer therapy. *Adv Mater* 2019;31(51):e1904197. DOI: 10.1002/adma.201904197
- Han C., Zheng J., Li F. et al. Novel prognostic signature for acute myeloid leukemia: bioinformatics analysis of combined CNV-driven and ferroptosis-related genes. *Front Genet* 2022;13:849437. DOI: 10.3389/fgene.2022.849437
- Yu Y., Meng Y., Xu X. et al. A ferroptosis inducing and leukemic cell targeting drug nanocarrier formed by redox responsive cysteine polymer for acute myeloid leukemia therapy. *ACS Nano* 2023;17(4):3334–45. DOI: 10.1021/acsnano.2c06313
- Борисова Л.М., Осипов В.Н., Голубева И.С. и др. Производные 3-гидроксихиназолина, аналоги эрастина, индуцируют ферроптоз в клетках карциномы молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии* 2022;9(1):48–56. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-48-56
- Borisova L.M., Osipov V.N., Golubeva I.S. et al. 3-Hydroxyquinazoline derivatives, analogues of erastin, induced ferroptosis in breast cancer cells. *Uspekhi molekularnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(1):48–56. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-48-56
- Liang D., Minikes A.M., Jiang X. Ferroptosis at the intersection of lipid metabolism and cellular signaling. *Mol Cell* 2022;82(12):2215–27. DOI: 10.1016/j.molcel.2022.03.022
- Balihodzic A., Prinz F., Dengler M.A. et al. Non-coding RNAs and ferroptosis: potential implications for cancer therapy. *Cell Death Differ* 2022;29(6):1094–106. DOI: 10.1038/s41418-022-00998-x
- 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
- Shevchenko V.E., Nikiforova Z.N., Kushnir T.I. et al. Ferroptosis determinants — potential therapeutic targets glioblastoma stem cells. *Uspekhi molekularnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(3):60–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-60-68
- Li J., Cao F., Yin H.L. et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis* 2020;11:88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2
- Chen X., Li J., Kang R. et al. Ferroptosis: machinery and regulation. *Autophagy* 2021;17(9):2054–81. DOI: 10.1080/15548627.2020.1810918
- Su Y., Zhao B., Zhou L. et al. Ferroptosis, a novel pharmacological mechanism of anti-cancer drugs. *Cancer Lett* 2020;483:127–36. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.02.015
- Tang D., Chen X., Kang R. et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Res* 2021;31(2):107–25. DOI: 10.1038/s41422-020-00441-1
- Liu Y., Wan Y., Jiang Y. et al. GPX4: the hub of lipid oxidation, ferroptosis, disease and treatment. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2023;1878(3):188890. DOI: 10.1016/j.bbcan.2023.188890
- Forcina G.C., Dixon S.J. GPX4 at the crossroads of lipid homeostasis and ferroptosis. *Proteomics* 2019;19(18):e1800311. DOI: 10.1002/pmic.201800311
- Xing K., Bian X., Shi D. et al. miR-612 enhances RSL3-induced ferroptosis of hepatocellular carcinoma cells via mevalonate pathway. *J Hepatocell Carcinoma* 2023;10:2173–85. DOI: 10.2147/JHC.S433332
- Ou M., Jiang Y., Ji Y. et al. Role and mechanism of ferroptosis in neurological diseases. *Mol Metab* 2022;61:101502. DOI: 10.1016/j.molmet.2022.101502
- Noe R., Inglese N., Romani P. et al. Organic selenium induces ferroptosis in pancreatic cancer cells. *Redox Biol* 2023;68:102962. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102962
- Zheng J., Conrad M. The metabolic underpinnings of ferroptosis. *Cell Metab* 2020;32(6):920–37. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.10.011
- Park E., Chung S.W. ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation. *Cell Death Dis* 2019;10(11):822. DOI: 10.1038/s41419-019-2064-5
- Stockwell B.R. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications. *Cell* 2022;185(14):2401–21. DOI: 10.1016/j.cell.2022.06.003
- Fuhrmann D.C., Brune B. A graphical journey through iron metabolism, microRNAs and hypoxia in ferroptosis. *Redox Biol* 2022;54:102365. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102365
- Bayir H., Dixon S.J., Tyurina Y.Y. et al. Ferroptotic mechanisms and therapeutic targeting of iron metabolism and lipid peroxidation in the kidney. *Nat Rev Nephrol* 2023;19(5):315–36. DOI: 10.1038/s41581-023-00689-x
- Grignano E., Birsén R., Chapuis N. From iron chelation to overload as a therapeutic strategy to induce ferroptosis in leukemic cells. *Front Oncol* 2020;10:586530. DOI: 10.3389/fonc.2020.586530
- Zeng F., Nijati S., Tang L. et al. Ferroptosis detection: from approaches to applications. *Angew Chem Int Ed* 2023;62(35):e202300379. DOI: 10.1002/anie.202300379
- Chen X., Kang R., Kroemer G. et al. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;18(5):280–96. DOI: 10.1038/s41571-020-00462-0
- Koppula P., Zhuang L., Gan B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. *Protein Cell* 2021;12(8):599–620. DOI: 10.1007/s13238-020-00789-5

34. Sun X., Ou Z., Xie M. et al. HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death. *Oncogene* 2015;34(45):5617–25. DOI: 10.1038/onc.2015.32
35. Xia J., Si H., Yao W. et al. Research progress on the mechanism of ferroptosis and its clinical application. *Exp Cell Res* 2021;409(2):112932. DOI: 10.1016/j.yexcr.2021.112932
36. Liu J., Zhang C., Wang J. et al. The regulation of ferroptosis by tumor suppressor p53 and its pathway. *Int J Mol Sci* 2020;21(21):8387. DOI: 10.3390/ijms21218387
37. Lei P., Bai T., Sun Y. Mechanisms of ferroptosis and relations with regulated cell death: a review. *Front Physiol* 2019;10:139. DOI: 10.3389/fphys.2019.00139
38. Xu R., Wang W., Zhang W. Ferroptosis and the bidirectional regulatory factor p53. *Cell Death Discov* 2023;9(1):197. DOI: 10.1038/s41420-023-01517-8
39. Wang H., Guo M., Wei H. et al. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8(1):92. DOI: 10.1038/s41392-023-01347-1
40. Liu Y., Gu W. p53 in ferroptosis regulation: the new weapon for the old guardian. *Cell Death Differ* 2022;29(5):895–910. DOI: 10.1038/s41418-022-00943-y
41. Gong D., Chen M., Wang Y. et al. Role of ferroptosis on tumor progression and immunotherapy. *Cell Death Discov* 2022;8(1):427. DOI: 10.1038/s41420-022-01218-8
42. Liu Y., Gu W. The complexity of p53-mediated metabolic regulation in tumor suppression. *Semin Cancer Biol* 2022;85:4–32. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.03.010
43. Gao Y., Zhang H., Wang J. et al. Annexin A5 ameliorates traumatic brain injury-induced neuroinflammation and neuronal ferroptosis by modulating the NF- κ B/HMGB1 and Nrf2/HO-1 pathways. *Int Immunopharmacol* 2023;114:109619. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109619
44. Ursini F., Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis: the role of GSH and GPx4. *Free Radic Biol Med* 2020;152:175–85. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.027
45. Li D., Li Y. The interaction between ferroptosis and lipid metabolism in cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2020;5(1):108. DOI: 10.1038/s41392-020-00216-5
46. Pope L.E., Dixon S.J. Regulation of ferroptosis by lipid metabolism. *Trends Cell Biol* 2023;33(12):1077–87. DOI: 10.1016/j.tcb.2023.05.003
47. Zhao L., Zhou X., Xie F. et al. Ferroptosis in cancer and cancer immunotherapy. *Cancer Commun (Lond)* 2022;42(2):88–116. DOI: 10.1002/cac2.12250
48. Song X., Zhu S., Chen P. et al. AMPK-mediated BECN1 phosphorylation promotes ferroptosis by directly blocking system Xc-activity. *Curr Biol* 2018;28(15):2388–99. DOI: 10.1016/j.cub.2018.05.094
49. Farge T., Saland E., de Toni F. et al. Chemotherapy-resistant human acute myeloid leukemia cells are not enriched for leukemic stem cells but require oxidative metabolism. *Cancer Discov* 2017;7(7):716–35. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0441
50. Auberger P., Favreau C., Savy C. et al. Emerging role of glutathione peroxidase 4 in myeloid cell lineage development and acute myeloid leukemia. *Cell Mol Biol Lett* 2024;29(1):98. DOI: 10.1186/s11658-024-00613-6
51. Zhong X., Zhang Z., Shen H. et al. Hepatic NF- κ B-inducing kinase and inhibitor of NF- κ B kinase subunit α promote liver oxidative stress, ferroptosis, and liver injury. *Hepatol Commun* 2021;5(10):1704–20. DOI: 10.1002/hep4.1757
52. Rushworth S.A., Zaitseva L., Murray M.Y. et al. High Nrf2 expression in human acute myeloid leukemia is driven by NF- κ B and underlies chemo-resistance. *Blood* 2012;120(26):5188–98. DOI: 10.1182/blood-2012-04-422121
53. Akiyama H., Zhao R., Ostermann L.B. et al. Mitochondrial regulation of GPX4 inhibition-mediated ferroptosis in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2024;38(4):729–40. DOI: 10.1038/s41375-023-02117-2
54. Pabst T., Kortz L., Fiedler G.M. et al. The plasma lipidome in acute myeloid leukemia at diagnosis in relation to clinical disease features. *BBA Clin* 2017;7:105–14. DOI: 10.1016/j.bbacli.2017.03.002
55. Yin Z., Li F., Zhou Q. et al. A ferroptosis-related gene signature and immune infiltration patterns predict the overall survival in acute myeloid leukemia patients. *Front Mol Biosci* 2022;9:959738. DOI: 10.3389/fmolb.2022.959738
56. Prada-Arismendy J., Arroyave J.C., Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Rev* 2017;31(1):63–76. DOI: 10.1016/j.blre.2016.08.005
57. Han C., Zheng J., Li F. et al. Novel prognostic signature for acute myeloid leukemia: bioinformatics analysis of combined CNV-driven and ferroptosis-related genes. *Front Genet* 2022;13:849437. DOI: 10.3389/fgene.2022.849437
58. Jiang B., Zhao Y., Shi M. et al. DNAB6 promotes ferroptosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Dig Dis Sci* 2020;65(7):1999–2008. DOI: 10.1007/s10620-019-05929-4
59. Meng E., Shevde L.A., Samant R.S. Retraction: Emerging roles and underlying molecular mechanisms of DNAB6 in cancer. *Oncotarget* 2023;14:669. DOI: 10.18632/oncotarget.28439
60. Yan X.S., Sun Y.J., Du J. et al. Effects of ferroptosis-related gene HSPB1 on acute myeloid leukaemia. *Int J Lab Hematol* 2024;46(5):899–909. DOI: 10.1111/ijlh.14319
61. Ma Z., Ye W., Huang X. et al. The ferroptosis landscape in acute myeloid leukaemia. *Aging (Albany NY)* 2023;15(22):13486–503. DOI: 10.18632/aging.205257
62. Sun Q., Liu D., Cui W. et al. Cholesterol-mediated ferroptosis suppression reveals essential roles of coenzyme Q and squalene. *Commun Biol* 2023;6(1):1108. DOI: 10.1038/s42003-023-05477-8
63. Shi J., Wu P., Sheng L. et al. Ferroptosis-related gene signature predicts the prognosis of papillary thyroid carcinoma. *Cancer Cell Int* 2021;21(1):669. DOI: 10.1186/s12935-021-02389-7
64. Bhanot H., Weisberg E.L., Reddy M.M. et al. Acute myeloid leukemia cells require 6-phosphogluconate dehydrogenase for cell growth and NADPH-dependent metabolic reprogramming. *Oncotarget* 2017;8(40):67639–50. DOI: 10.18632/oncotarget.18797
65. Song Y., Tian S., Zhang P. et al. Construction and validation of a novel ferroptosis-related prognostic model for acute myeloid leukaemia. *Front Genet* 2021;12:708699. DOI: 10.3389/fgene.2021.708699
66. Dixon S.J., Patel D.N., Welsch M. et al. Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic-reticulum stress and ferroptosis. *eLife* 2014;3:e02523. DOI: 10.7554/eLife.02523
67. Zhang X., Peng T., Li C. et al. Inhibition of C1SD1 alleviates mitochondrial dysfunction and ferroptosis in mice with acute lung injury. *Int Immunopharmacol* 2024;130:111685. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.111685
68. Xie Y., Zhu S., Song X. et al. The tumour suppressor p53 limits ferroptosis by blocking DPP4 activity. *Cell Rep* 2017;20(7):1692–704. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.07.055
69. Kang R., Kroemer G., Tang D. The tumor suppressor protein p53 and the ferroptosis network. *Free Radic Biol Med* 2019;133:162–8. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.074
70. Shin D., Kim E.H., Lee J. et al. Nrf2 inhibition reverses resistance to GPX4 inhibitor-induced ferroptosis in head and neck cancer. *Free Radic Biol Med* 2018;129:454–62. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.426
71. Wei J., Nai G.Y., Dai Y. et al. Dipetidyl peptidase-4 and transferrin receptor serve as prognostic biomarkers for acute myeloid leukemia. *Ann Transl Med* 2021;9(17):1381. DOI: 10.21037/atm-21-3368
72. Wei J., Xie Q., Liu X. et al. Identification of the prognostic value of glutathione peroxidases expression levels in acute myeloid leukemia. *Ann Transl Med* 2020;8(11):678. DOI: 10.21037/atm-20-3296
73. Zhang L., Song A., Yang Q.C. et al. Integration of AIEgens into covalent organic frameworks for pyroptosis- and ferroptosis-primed cancer immunotherapy. *Nat Commun* 2023;14(1):5355. DOI: 10.1038/s41467-023-41121-z

74. Wang J., Zhuo Z., Wang Y. et al. Identification and validation of a prognostic risk-scoring model based on ferroptosis-associated cluster in acute myeloid leukaemia. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:800267. DOI: 10.3389/fcell.2021.800267
75. Ruvolo P.P., Ma H., Ruvolo V.R. et al. LGALS1 acts as a pro-survival molecule in AML. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2020;1867(10):118785. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2020.118785
76. Zhu W., Liu D., Lu Y. et al. PHKG2 regulates RSL3-induced ferroptosis in *Helicobacter pylori*-related gastric cancer. *Arch Biochem Biophys* 2023;740:109560. DOI: 10.1016/j.abb.2023.109560
77. Sabatier M., Birsén R., Lauture L. et al. C/EBPα confers dependence on fatty-acid anabolic pathways and vulnerability to lipid oxidative-stress-induced ferroptosis in FLT3-mutant leukaemia. *Cancer Discov* 2023;13(7):1720–47. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-22-0411
78. Chen X., Hu S., Han Y. et al. Ferroptosis-related STEAP3 acts as predictor and regulator in diffuse large B-cell lymphoma through immune infiltration. *Clin Exp Med* 2023;23(6):2601–17. DOI: 10.1007/s10238-023-00996-4
79. Dai E., Han L., Liu J. et al. Ferroptotic damage promotes pancreatic tumorigenesis through a TMEM173/STING-dependent DNA-sensor pathway. *Nat Commun* 2020;11(1):6339. DOI: 10.1038/s41467-020-20154-8
80. Sadeghi M., Moslehi A., Kheiry H. et al. The sensitivity of acute myeloid leukaemia cells to cytarabine is increased by suppressing the expression of heme oxygenase-1 and hypoxia-inducible factor-1α. *Cancer Cell Int* 2024;24(1):217. DOI: 10.1186/s12935-024-03393-3
81. Chen X., Song X., Li J. et al. Identification of HPCAL1 as a specific autophagy receptor involved in ferroptosis. *Autophagy* 2023;19(1):54–74. DOI: 10.1080/15548627.2022.2059170
82. Zhang H., Sun C., Sun Q. et al. Susceptibility of acute myeloid leukaemia cells to ferroptosis and evasion strategies. *Front Mol Biosci* 2023;10:1275774. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1275774
83. Liu J., Kang R., Tang D. Signaling pathways and defence mechanisms of ferroptosis. *FEBS J* 2022;289(22):7038–50. DOI: 10.1111/febs.16059
84. Cui J., Wang Y., Tian X. et al. LPCAT3 is transcriptionally regulated by YAP/ZEB/EP300 and collaborates with ACSL4 and YAP to determine ferroptosis sensitivity. *Antioxid Redox Signal* 2023;39(7–9):491–511. DOI: 10.1089/ars.2023.0237
85. Strickland S.A., Vey N. Diagnosis and treatment of therapy-related acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2022;171:103607. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2022.103607
86. Roberts D., Langston A.A., Heffner L.T. Acute myeloid leukemia in young adults: does everyone need a transplant? *J Oncol Pract* 2019;15(6):315–20. DOI: 10.1200/JOP.18.00574
87. Li Q., Su R., Bao X. et al. Glycyrrhetic acid nanoparticles combined with ferrotherapy for improved cancer immunotherapy. *Acta Biomater* 2022;144:109–20. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.03.030
88. Diao J., Jia Y., Dai E. et al. Ferroptotic therapy in cancer: benefits, side effects, and risks. *Mol Cancer* 2024;23(1):89. DOI: 10.1186/s12943-024-01999-9
89. Su R., Dong L., Li Y. et al. Targeting FTO suppresses cancer stem cell maintenance and immune evasion. *Cancer Cell* 2020;38(1):79–96. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.04.017
90. Wén Q., Liu J., Kang R. et al. The release and activity of HMGB1 in ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;510(2):278–83. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.01.090
91. Chen G.Q., Benthani F.A., Wu J. et al. Artemisinin compounds sensitize cancer cells to ferroptosis by regulating iron homeostasis. *Cell Death Differ* 2020;27(1):242–54. DOI: 10.1038/s41418-019-0352-3
92. Zhu H.Y., Huang Z.X., Chen G.Q. et al. Typhaneoside prevents acute myeloid leukemia through suppressing proliferation and inducing ferroptosis associated with autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;516(4):1265–71. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.06.070
93. Lai X., Sun Y., Zhang X. et al. Honokiol induces ferroptosis by upregulating HMOX1 in acute myeloid leukemia cells. *Front Pharmacol* 2022;13:897791. DOI: 10.3389/fphar.2022.897791
94. Bruedigam C., Porter A.H., Song A. et al. Imetelstat-mediated alterations in fatty acid metabolism to induce ferroptosis as a therapeutic strategy for acute myeloid leukemia. *Nat Cancer* 2024;5(1):47–65. DOI: 10.1038/s43018-023-00653-5

Вклад авторов

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

Т.И. Кушнир: анализ данных литературы;

М.В. Гудкова: систематизация данных, редактирование;

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

Authors' contributions

V.E. Shevchenko: system analysis, analysis of the received data, article writing;

T.I. Kushnir: analysis of literature data;

M.V. Gudkova: data systematization, editing

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

ORCID авторов / ORCID of authors

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

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

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

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

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

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

Статья поступила: 01.06.2025. **Принята к публикации:** 11.06.2025. **Опубликована онлайн:** 23.06.2025.

Article submitted: 01.06.2025. **Accepted for publication:** 11.06.2025. **Published online:** 23.06.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-68-76>

Подкожный ксенографт меланомы человека MelCher5k/*BRAF*⁺ с экспрессией CD20

И. Н. Михайлова^{1,2}, Е. М. Трещалина¹, С. Ш. Каршиева¹, Д. А. Хоченков¹, Н. В. Андропова¹, И. Ж. Шубина¹, М. В. Киселевский¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; Россия, 660022 Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

Контакты: Ирина Николаевна Михайлова irmikhaylova@gmail.com

Введение. Метастатическая меланома кожи (ММК) характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом. Значимая ремиссия ММК связана с применением вемурафениба, блокирующего пролиферацию клеток с мутацией в гене *BRAF*. Однако после отмены этого препарата быстро развивается рецидив, вызывающий необходимость продолжения лечения. Поиски другой терапевтической мишени в первичной ММК привели к малочисленной субпопуляции стволовоподобных клеток, экспрессирующих антиген CD20. Пилотные клинические испытания ритуксимаба, блокирующего CD20, не дали ожидаемых результатов. Мы расценили это как отсутствие контроля над экспрессией CD20 в рецидивных клетках, что доступно только *in vivo* в адекватной модели рецидивирующей ММК/*BRAF*⁺ человека с высокой экспрессией CD20.

Цель исследования – создание модели *in vivo* рецидивирующей ММК/*BRAF*⁺ человека и оценка представленности субпопуляции клеток с экспрессией CD20.

Материалы и методы. В исследовании использованы вемурафениб (Roche, Швейцария), культура клеток меланомы человека MelCher5k/*BRAF*⁺ и иммунодефицитные мыши-самцы Balb/c nude массой тела 20–23 г, разведенные и содержащиеся в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н. Н. Блохина. Животных с трансплантированной опухолью (*n* = 12) распределяли по 2 группам: с применением вемурафениба (экспериментальная группа) и без него (группа контроля). Сравнительную оценку динамики роста опухолевых узлов в группах проводили по соотношению объемов с помощью стандартного критерия Т/С (treatment/control), выраженному в процентах. Динамику экспрессии маркеров S100, CD20 и CD45 определяли методом проточной цитофлуориметрии до начала введения вемурафениба и в конце наблюдения.

Результаты. У мышей с MelCher5k/*BRAF*⁺, получавших вемурафениб с 7-х по 21-е сутки, с 10-х суток наблюдалась редукция опухоли с полной ремиссией к 20-м суткам. Рецидивы с развитием опухолевого узла в месте имплантации (возобновленный рост клеток меланомы) возникали на 28-е сутки (через неделю после отмены препарата), а затем в течение 34–41-х суток опухоль быстро прогрессировала. У мышей, получавших вемурафениб, доля CD20⁺-клеток в новом очаге составила 35 %, что в 1,82 раза превысило долю CD20⁺-клеток в опухоли мышей, не получавших этот препарат (19 %). При этом клетки вновь возникшей опухоли экспрессировали маркер меланомы S100 и не экспрессировали CD45.

Заключение. *In vivo* на модели MelCher5k/*BRAF*⁺ показано, что в рецидивном опухолевом узле, развивающемся после применения вемурафениба, значительно увеличивается доля стволовоподобных клеток, экспрессирующих CD20. Эти данные свидетельствуют о целесообразности использования разработанной модели для оценки клинической перспективности направленных на CD20 агентов, способных продлить ремиссию после отмены вемурафениба при рецидивирующей меланоме.

Ключевые слова: ксенографт меланомы человека *BRAF*⁺, вемурафениб, ремиссия, CD20

Для цитирования: Михайлова И. Н., Трещалина Е. М., Каршиева С. Ш. и др. Подкожный ксенографт меланомы человека MelCher5k/*BRAF*⁺ с экспрессией CD20. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(2):68–76.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-68-76>

MelCher5k/*BRAF*⁺ subcutaneous human melanoma xenograft with CD20 expression

I. N. Mikhaylova^{1,2}, H. M. Treshalina¹, S. Sh. Karshieva¹, D. A. Khochenkov¹, N. V. Andronova¹, I. Zh. Shubina¹, M. V. Kiselevskiy¹

¹N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²V. F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk 660022, Russia

Contacts: Irina Nikolaevna Mikhailova irmikhaylova@gmail.com

Introduction. Metastatic melanoma of the skin (mMC) is characterized by an extremely unfavorable prognosis of survival. Significant remission of mMK is associated with the use of vemurafenib, which blocks the proliferation of cells with a mutation in the *BRAF* gene. However, after its cancellation, relapse develops rapidly, determining the need for continued treatment. The search for another therapeutic target in the primary mMC led to a small subpopulation of stem-like CD20 antigen-expressing cells. Pilot clinical trials of CD20-blocking rituxibam did not yield the desired result, which we interpreted as a lack of control of CD20 expression in recurrent cells, which is available only *in vivo* in an adequate human model of recurrent mMK/*BRAF*⁺ with high CD20 expression.

Aim. To create an *in vivo* model of recurrent human mMC/*BRAF*⁺ with control of the representation of a subpopulation of cells with CD20 expression.

Materials and methods. Vemurafenib (Roche, Switzerland), human melanoma cell culture MelCher5k/*BRAF*⁺, male Balb/c nude immunodeficient mice weighing 20–23 g breeding and maintenance at the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology were used. Mice with a transplanted tumor ($n = 12$) were divided into 2 groups: without the drug (control) and with the drug (vemurafenib). A comparative assessment of the growth dynamics of tumor nodes in the groups was carried out according to the volume ratio using the standard T/C (treatment/control) criterion, expressed as a percentage. The dynamics of the expression of S100, CD20, and CD45 markers was evaluated by flow cytometry before the start of vemurafenib administration and at the end of follow-up.

Results. According to the data obtained, in mice with MelCher5k/*BRAF*⁺ treated with vemurafenib from days 7 to 21, tumor reduction was observed from day 10 with complete remission by day 20. Relapses with the development of a tumor node at the implantation site (renewed growth of melanoma cells) occurred on day 28 (a week after drug withdrawal), and then the tumor progressed rapidly over the course of 34–41 days. In mice treated with vemurafenib, the proportion of CD20⁺ cells in the new focus was 35 %, which was 1.82 times higher than the proportion of CD20⁺ cells in the tumor of mice not treated with this drug (19 %). At the same time, the cells of the newly emerged tumor expressed the melanoma marker S100⁺ and did not express CD45.

Conclusion. Thus, *in vivo*, using the MelCher5k/*BRAF*⁺ model, it was shown that in a recurrent tumor node developing after the use of vemurafenib, the proportion of stem-like cells expressing CD20 significantly increases. These data suggest that it is advisable to use the model to evaluate the clinical prospects of CD20-targeted agents capable of prolonging remission after vemurafenib withdrawal in patients with recurrent melanoma.

Keywords: *BRAF*⁺ human melanoma xenograft, vemurafenib, remission, CD20

For citation: Mikhaylova I.N., Treshalina H.M., Karshieva S.Sh. et al. MelCher5k/*BRAF*⁺ subcutaneous human melanoma xenograft with CD20 expression. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(2):68–76. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-68-76>

ВВЕДЕНИЕ

В 2023 г. в России зарегистрированы 11 605 новых случаев меланомы кожи [1]. Прогрессирование заболевания в виде метастазирования характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом и высокой смертностью в течение 1-го года с момента появления отдаленных метастазов. Лечение метастатической меланомы кожи (мМК) по-прежнему остается сложной задачей, несмотря на появление ряда новых многообещающих подходов с использованием иммунотерапевтических и таргетных препаратов. В связи с этим необходим поиск новых вариантов терапии данной патологии для улучшения долгосрочного контроля над опухолью.

Медиана общей выживаемости пациентов с мМК, получавших стандартную химиотерапию, как правило, не превышает 9 мес [2]. В ходе генетических исследований мМК выявлена доминирующая мутация в гене *BRAF*⁺, которая встречается примерно в 50 % случаев [3, 4]. С учетом данной мутации созданы таргетные препараты, использование которых улучшило показатели выживаемости пациентов с *BRAF*⁺-мМК [5]. Однако в большинстве случаев на фоне терапии инги-

биторами *BRAF* происходит прогрессирование заболевания.

Известно, что мМК содержит различные клеточные субпопуляции, наличие которых ассоциировано с прогрессированием заболевания. Одна из таких субпопуляций, обладающая характеристиками стволовых клеток, экспрессирует CD20 [6, 7]. По данным ряда исследований при иммунофенотипировании опухоли до начала лечения мМК обнаруживают до 2 % CD20⁺-клеток [8, 9]. Этот белок является В-клеточным маркером лимфопролиферативных заболеваний, для лечения которых успешно применяют ритуксимаб — препарат анти-CD20. Результаты ограниченных клинических испытаний показали, что у пациентов с мМК IV стадии без признаков заболевания после хирургического лечения, лучевой или химиотерапии наблюдается удлинение стадии ремиссии при адъювантном применении этого лекарственного средства [10]. При этом у таких больных, получавших адъювантную терапию ритуксимабом, медианы безрецидивной и общей выживаемости не были достигнуты в течение 42 мес после прекращения лечения; спустя 2 года 6 из 9 пациентов были живы, причем 5 из них — без

рецидива [10]. По данным пилотного клинического исследования эффективности ритуксимаба у 7 больных мМК медиана выживаемости без прогрессирования составила 6,3 мес, общей выживаемости — 14,7 мес, при этом наблюдалась хорошая переносимость препарата [11]. В ходе эксперимента *in vitro* с использованием сфероидов, полученных из клеток мМК/*BRAF*⁺, продемонстрирована перспективность применения комбинации нацеленных на мутантный ген *BRAF* таргетных препаратов с ритуксимабом [7]. Результаты клинических исследований и экспериментов *in vivo*, посвященных оценке эффективности комбинированной терапии *BRAF*⁺-мМК вемурафенибом и ритуксимабом, до настоящего времени опубликованы не были, что мы связываем, прежде всего, с отсутствием описанных моделей *in vivo*, в которых проанализирована представленность субпопуляции клеток с экспрессией CD20.

Таким образом, остается открытым вопрос о перспективности применения ритуксимаба в терапии *BRAF*⁺-мМК с целью продления ремиссии после лечения вемурафенибом, что послужило основанием для создания модели *in vivo* рецидивирующей *BRAF*⁺-меланомы с оценкой уровня экспрессии CD20.

Цель исследования — создание модели *in vivo* рецидивирующей *BRAF*⁺-мМК человека и определение представленности субпопуляции клеток с экспрессией CD20.

Задачи исследования: 1) получение ксенографтов на иммунодефицитных мышах-самцах Balb/c nude с использованием культуры клеток меланомы человека MelCher5k/*BRAF*⁺; 2) характеристика терапевтического эффекта вемурафениба — оценка размера ксенографта с определением продолжительности ремиссии после отмены препарата до появления рецидива опухоли; 3) характеристика клеточного состава ксенографта MelCher5k/*BRAF*⁺ на основе определения экспрессии маркеров меланоцитов (S100), стволовоподобных клеток (CD20) и В-лимфоцитов (CD45) в подкожных ксенографтах с помощью проточной цитофлуориметрии на стадиях формирования первичной опухоли и ее рецидива у животных, получавших вемурафениб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты и реактивы

В работе использован вемурафениб (Roche, Швейцария). В качестве растворителя применяли физиологический раствор («ПанЭко», Россия). Для анализа экспрессии маркеров использованы моноклональные антитела к S100 (Cat.# MA5–12969, Thermo Fisher Scientific, США), CD20-PE (anti-human antibody, Cat.# IM14351, Beckman Coulter, США), CD45 с PerCP (anti-human CD45 antibody anti-CD45-H130; Cat.# 304026, Biolegend, США).

Клетки

В работе использовали культуру клеток меланомы человека MelCher5k/*BRAF*⁺, полученную и охарактеризованную в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина [12–15]. Клетки MelCher5k/*BRAF*⁺ культивировали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 2 mM L-глутамина («ПанЭко», Россия), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HiMedia, Индия), при 37 °C и 5 % CO₂. Клетки пассировали 2 раза в неделю, рассаживая их в соотношении 1:5 при достижении 80–90 % конфлюэнтности. Для приготовления клеточной суспензии клетки MelCher5k/*BRAF*⁺ снимали 0,25 % раствором трипсина и этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), промывали 2 раза в растворе фосфатно-солевого буфера (PBS) («ПанЭко», Россия), подсчитывали с помощью инвертированного микроскопа NIB610 (Nexcore, Китай) и ресуспендировали в среде 199 («ПанЭко», Россия) до концентрации 10 × 10⁶ клеток в мл.

Экспрессию сигнальных маркеров меланоцитов (S100), стволовоподобных клеток (CD20), а также В-клеток (CD45) в клетках подкожного ксенографта меланомы человека MelCher/5k/*BRAF*⁺ оценивали методом проточной цитофлуориметрии.

Эксперименты на животных

Животные. В опытах использовали 8-недельных иммунодефицитных мышей-самцов Balb/c nude массой тела 20–23 г из разведения Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Животных содержали в индивидуальных клетках со свободным доступом к стерильному брикетированному корму и воде, размещенных в стерильном боксовом помещении с естественным освещением. В кондиционированном помещении поддерживали температуру 26 ± 2 °C и влажность воздуха 55 ± 15 %.

Получение ксенографтов. Для получения подкожных ксенографтов суспензию клеток MelCher5k/*BRAF*⁺ имплантировали билатерально под кожу правого и левого бока каждой мыши по 10,0 × 10⁶ клеток в 0,2 мл среды 199 (0-е сутки). При достижении среднего объема опухолей 52 мм³ (7-е сутки) мышей рандомизированно распределяли по 2 группам (контроля и вемурафениба) и начинали введение препарата.

Обработка животных вемурафенибом и оценка его эффективности. Обработка животных препаратом выполнена по методике, предложенной ранее [13, 12]. Мыши получали вемурафениб перорально в разовой дозе 75 мг/кг ежедневно в течение 14 сут; суммарная доза составила 1050 мг/кг. Животные группы контроля получали физиологический раствор в эквивалентных объемах и режиме. Опухолевые узлы измеряли во вре-

мя и после окончания применения вемурафениба 2 раза в неделю в течение 40 сут. Объем опухолевого узла определяли по стандартной формуле.

В качестве критерия эффективности воздействия использовали стандартный показатель Т/С (treatment/control), который выражали в процентах, принимая за 100 % величину объема опухоли в группе контроля на каждый срок наблюдения. Пороговое значение Т/С — ≤ 42 % [15]. Показатель вычисляли по формуле:

$$\frac{T}{C} = \frac{V_b}{V_k} \times 100,$$

где V_b — средний объем опухоли (мм³) в группе вемурафениба, V_k — средний объем опухоли (мм³) в группе контроля. V_k принимался за 100 %.

Эвтаназия животных. На 41-е сутки после последнего измерения опухолевых узлов мышей выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации шейных позвонков.

Анализ экспрессии маркеров

Динамику экспрессии маркеров S100, CD20 и CD45 в подкожных ксенографтах MelCher5k/*BRAF*⁺ оценивали с помощью метода проточной цитофлуориметрии в 2 временных точках: до начала терапии вемурафенибом и в конце наблюдения. Для этого проводили эвтаназию мышей, опухоли выделяли, дезагрегировали с помощью 0,25 % раствора трипсин-ЭДТА до получения суспензии единичных клеток, затем отмывали центрифугированием в полной ростовой среде и дважды в PBS и фиксировали в формалине.

Перед окрашиванием антителами клетки отмывали от формалина центрифугированием в PBS. Далее к клеточной суспензии добавляли антитела для выявления клеточных популяций, экспрессирующих S100, CD20 и CD45. Антитела к S100 использовали в разведении 1:50, клетки инкубировали на льду в течение 30 мин, затем промывали буфером FACS (PBS — по массовому объему (weigh/volume), 0,2 % теллячьего сывороточного альбумина (veal serum albumin, VSA), 10 mM NaN₃). Далее вносили по 5 мкл вторичных козьих антимышиных иммуноглобулинов (goat anti-mouse IgG), конъюгированных с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (FITC, Thermo, 31569), и инкубировали на льду в течение 30 мин. После клетки промывали буфером FACS, вносили по 20 мкл антител к CD20, конъюгированных с флуорохромом — R-фикоэритрином (PE), или 5 мкл антител к CD45, конъюгированных со специфической меткой PerCP, и инкубировали на льду в течение 30 мин. Клетки промывали буфером FACS и определяли количество окрашенных клеток с помощью цитофлуориметра Novocyt 2000R (Agilent Technologies, США) и программного обеспечения ACEA Novoflow 1.3 (ACEA Bioscience, Бельгия).

Статистическая обработка полученных данных

Статистический анализ полученных в опытах *in vivo* данных проводили с использованием программного обеспечения Statistical Package for the Social Sciences версии 25.0 (IBM, США). Различия между контрольной и экспериментальной группами определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика роста ксенографтов MelCher5k/*BRAF*⁺

Для оценки динамики роста подкожных ксенографтов использовали прививочную дозу 10×10^6 клеток, которая в 100 % случаев вызывала у иммунодефицитных мышей Balb/c nude развитие опухолей в течение недели после имплантации. Динамику роста опухоли у животных как группы вемурафениба, так и контрольной группы оценивали путем измерения объема опухолевых узлов и обсчета полученных данных с использованием стандартной формулы [15].

Динамика роста подкожных ксенографтов MelCher5k/*BRAF*⁺ в контрольной группе описывалась двухфазной кривой, состоящей из фазы медленного роста, которая длится до 14 сут, и фазой быстрого роста (экспоненциальной фазой), которая продолжается с 14-х по 34-е сутки. При этом латентный период роста опухоли короткий — пальпируемые опухолевые узлы визуализируются у всех животных уже на 3-и сутки после имплантации клеток. На 7-е сутки объем опухолей в среднем составил 54 мм³. На 41-е сутки после имплантации опухолевых клеток объем опухолей в контрольной группе оказался равным 2165 мм³ (рис. 1).

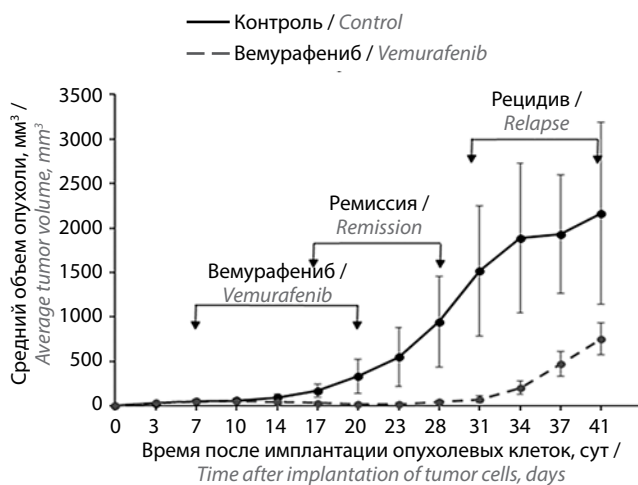


Рис. 1. Влияние вемурафениба на динамику роста подкожных ксенографтов меланомы человека MelCher5k/*BRAF*⁺ ($n = 12$). На рисунке приведены средние значения с указанием погрешностей в виде стандартной ошибки среднего. Различия статистически значимы при $p < 0,05$

Fig. 1. Vemurafenib impact on the growth of subcutaneous xenografts of human melanoma MelCher5k/*BRAF*⁺ ($n = 12$). The figure shows the mean values with errors as standard error of the mean. Differences are statistically significant at $p < 0.05$

Таблица 1. Объем ксенографтов MelCher5k/BRAF⁺ в сравниваемых группах мышей nude после отмены вемурафенибаTable 1. The volume of MelCher5k/BRAF⁺ xenografts in the groups being compared of the nude mice after cancellations of vemurafenib

День опыта Day of the experiment	Объем опухоли (среднее значение ± стандартное отклонение), мм ³ Tumor volume (average value ± standard deviation), mm ³		T/C, %
	Группа контроля Control group	Группа вемурафениба* Vemurafenib group*	
23	548,9 ± 334,7	21,2 ± 13,1	4
28	944,4 ± 509,3	41,6 ± 21,7	4
31	1516,8 ± 732,7	71,4 ± 39,1	5
34	1887,1 ± 842,9	202,2 ± 72,6	11
37	1930,2 ± 669,0	471,3 ± 139,1	24
41	2165,1 ± 1025,6	753,8 ± 179,4	35

*Различия между группами статистически значимы ($p \leq 0,05$).*Differences between the groups ($p \leq 0.05$).

На 7-е сутки после подкожной имплантации опухолевых клеток, когда средний объем опухолей достиг 52 мм³, мышам группы вемурафениба начинали перорально вводить препарат в дозе 75 мг/кг и продолжали это делать по 20-е сутки от начала эксперимента. На фоне применения вемурафениба (7–20-е сутки) наступала ремиссия: опухолевый рост прекращался, наблюдалось уменьшение размеров опухолей, вплоть до практически непальпируемых. Через 3 нед после введения препарата (с 23-х суток) рост опухолей возобновился, и к концу наблюдения (к 41-й неделе эксперимента) их объем достиг 753,8 мм³, что было интерпретировано как развитие рецидива (см. рис. 1).

Следует отметить, что в группе вемурафениба объем вновь возникшей опухоли по сравнению с размером опухоли у мышей контрольной группы вплоть до 31-х суток эксперимента составил не более 5 %, а затем с 34-х суток эксперимента начинался ее более активный рост (табл. 1).

Таким образом, наша модельная система адекватно воспроизвела закономерности регрессии опухоли под действием вемурафениба и развития рецидива после его отмены.

Анализ экспрессии маркеров меланоцитов (S100), стволовоподобных клеток (CD20) и В-клеток (CD45)

На 7-е сутки после имплантации клеток MelCher5k/BRAF⁺, когда размер опухоли составлял 54 мм³, полученная из дезагрегированных ксенографтов суспензия меланомных клеток на 65,4 % была представлена клетками MelCher5k/BRAF⁺, экспрессирующими S100. При этом только 0,4 % клеток опухоли экспрессировали одновременно S100 и CD20. Остальная часть общей популяции опухолевых клеток, вероятно, должна быть отнесена к мышинным стромальным клеткам (рис. 2).

На 41-е сутки роста ксенографта популяция клеток меланомы у мышей контрольной группы была на 98,45 % представлена клетками, экспрессирующими S100, из которых 79,16 % клеток экспрессировали лишь S100. Доля клеток, в которых выявлена экспрессия и S100, и CD20, возросла до 19,3 %. При этом доля клеток, экспрессирующих CD20, но не экспрессирующих S100, т.е., возможно, соответствующих инфильтрации опухоли В-лимфоцитами, не превышала 0,05 %.

У мышей группы вемурафениба на 41-е сутки эксперимента 95,88 % опухолевых клеток экспрессировали S100, при этом 35,16 % клеток экспрессировали также CD20, а доля клеток, экспрессирующих только S100, составила 60,72 % (рис. 3). Это означает, что доля клеток мМК, коэкспрессирующих CD20 и S100, возросла в 1,82 раза по сравнению с животными контрольной группы, которые не получали вемурафениб.

CD20 представляет собой В-лимфоцитарный антиген, регулирующий пролиферацию. Хотя и наблюдалась коэкспрессия CD20 и S100, которая свидетельствует о том, что эти клетки должны принадлежать кластеру клеток меланомы, мы решили дополнительно провести анализ экспрессии CD45 — маркера В-лимфоцитов. По результатам нашего исследования экспрессия CD45 отмечена лишь в 0,68 % клеток в контрольной группе и в 1,76 % клеток в группе вемурафениба в кластере опухолевых клеток (рис. 4).

Таким образом, в созданной нами модели выявлено увеличение субпопуляции клеток меланомы, коэкспрессирующих S100 и CD20.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования продемонстрировали, что разработанная нами модельная система мМК, представленная ксенографтом меланомы человека MelCher5k/BRAF⁺, позволяет адекватно воспроизвести развитие рецидива опухоли. Как и следовало ожидать,

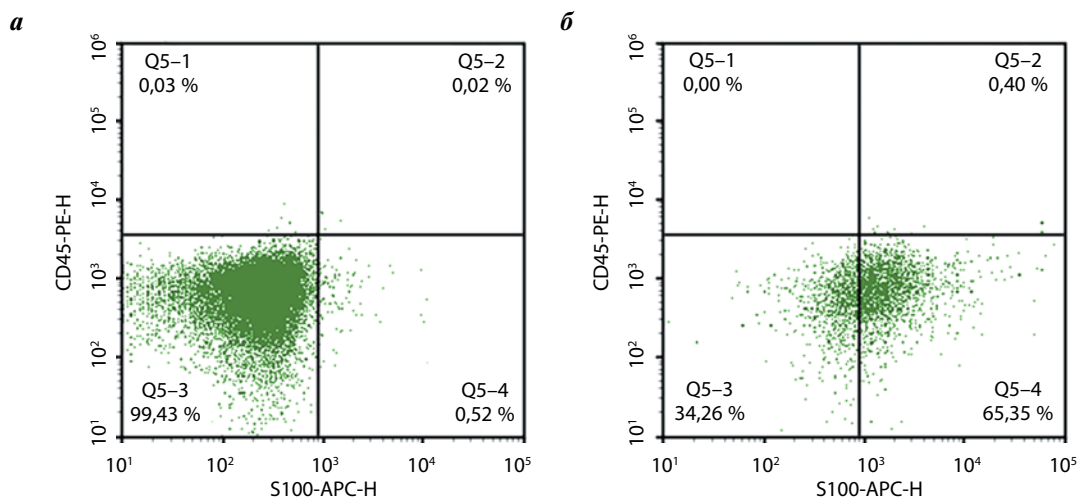


Рис. 2. Экспрессия *S100* и *CD20* в клетках *MelCher5k/BRAF⁺* на 7-е сутки после имплантации в группе контроля: а — изотипический контроль; б — экспрессия *S100* и *CD20*

Fig. 2. Expression of *S100* and *CD20* in the cells of *MelCher5k/BRAF⁺* on day 7 after tumor implantation in the control group: а — isotypic control; б — expression of *S100* and *CD20*

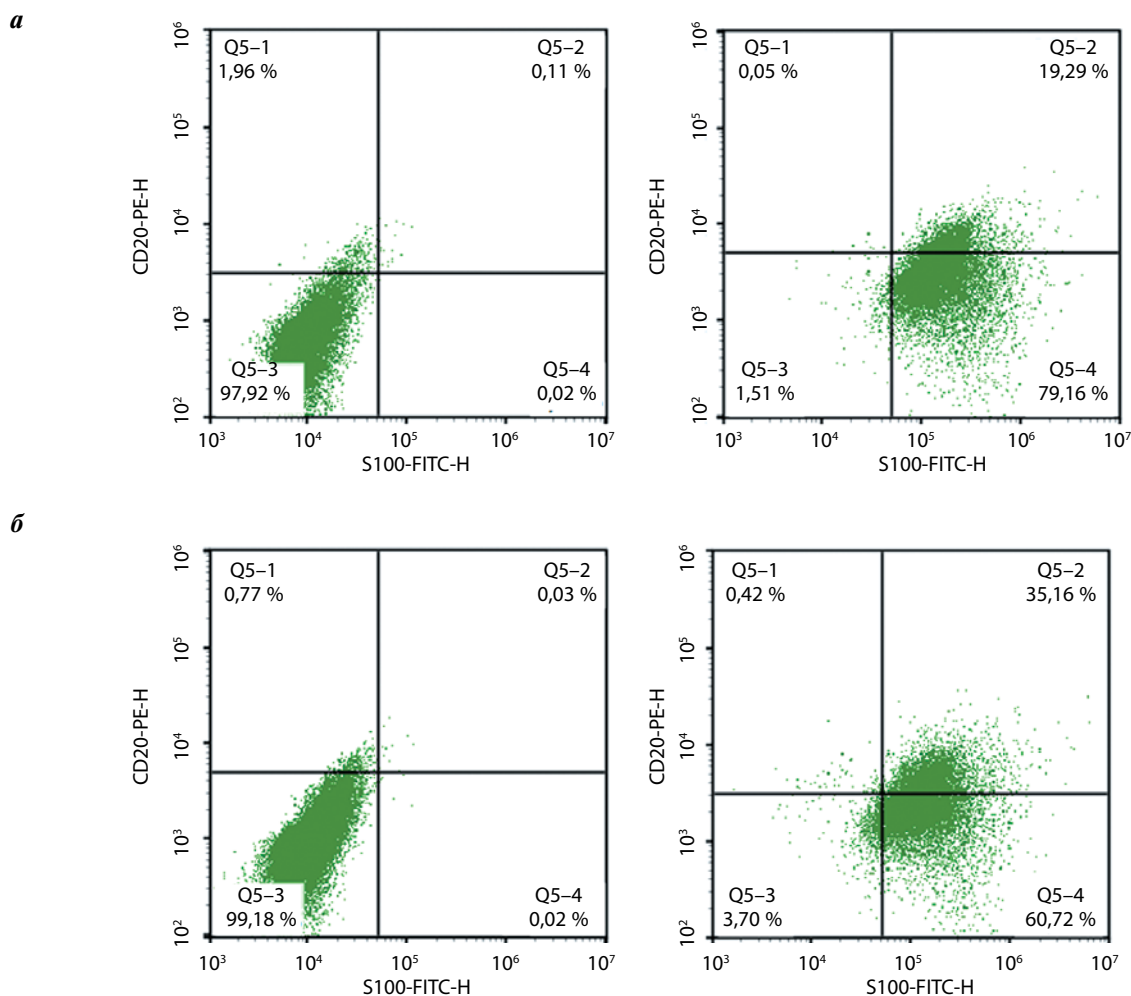


Рис. 3. Уровни экспрессии *S100* и коэкспрессии *S100* и *CD20* в клетках первичной *MelCher5k/BRAF⁺* в группе контроля без вемурафениба (а) и в группе рецидива меланомы после применения вемурафениба (б): слева — изотипический контроль; справа — экспрессия *S100* и *CD20*

Fig. 3. Levels of *S100* expression and co-expression of *S100* and *CD20* in the primary melanoma *MelCher5k/BRAF⁺* cells of control group (а) and relapse in the group of melanoma recurrence after the use of vemurafenib (б): left — isotypic control; right — *S100* and *CD20* expression

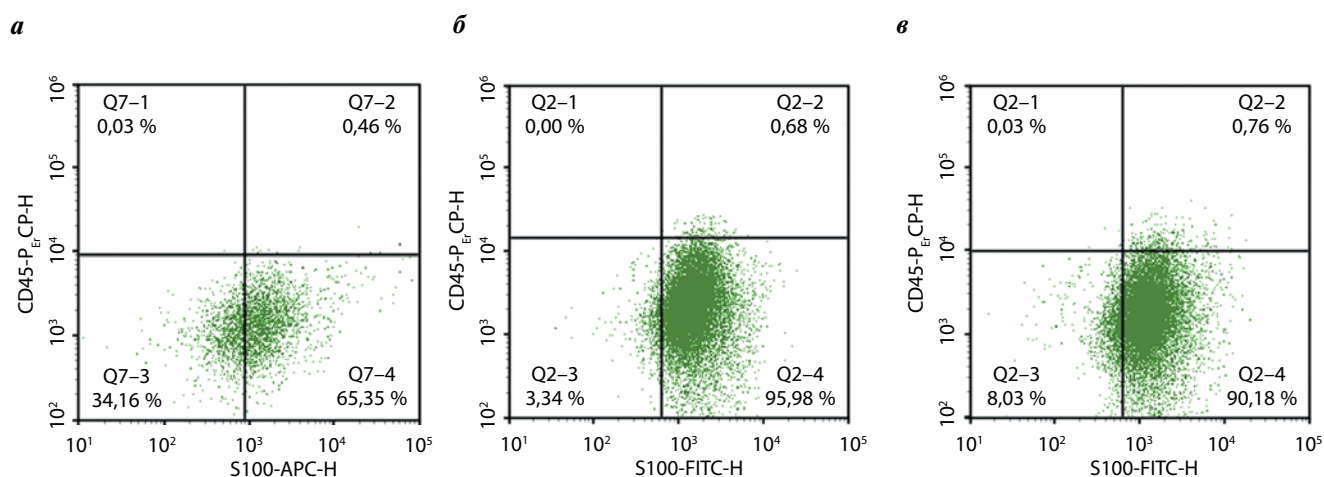


Рис. 4. Экспрессия CD45 в клетках подкожных ксенографтов MelCher5k/*BRAF*⁺: а — на 41-е сутки роста исходной опухоли; б — в группе контроля; в — в группе рецидива меланомы после терапии вемурафенибом

Fig. 4. CD45 expression in the cells of subcutaneous xenografts MelCher5k/*BRAF*⁺: а — on day 41 of growth of the initial tumor; б — in the control group; в — in the group of melanoma recurrence after vemurafenib therapy

ксенографт, сформированный клетками MelCher5k/*BRAF*⁺, высокочувствителен к действию вемурафениба, который ингибирует активную форму киназы B-Raf, селективно подавляя пролиферацию клеток с мутантной формой фермента. Так, в результате двухнедельного лечения вемурафенибом через неделю после его окончания объем опухоли значительно уменьшился и составил 4 % ее объема до терапии, и подавление ее роста наблюдалось до 34-х суток эксперимента. Однако отмена препарата приводит к постепенному накоплению мутантной формы киназы B-Raf в оставшихся жизнеспособных клетках опухоли и возникновению рецидива. Мы продемонстрировали, что эта ситуация, наблюдаемая у пациентов с мМК при лечении вемурафенибом, воспроизводится в нашей модельной системе.

Таким образом, мы разработали адекватную модель для анализа возможности дальнейшего лечения рецидивов мМК, возникших после эффективного применения вемурафениба.

Анализ наличия субклона клеток меланомы, экспрессирующей CD20, хорошо согласуется с современными данными молекулярно-генетических исследований о поликлональности мМК [6]. В частности, ключевые генетические факторы меланомы часто распределены гетерогенно внутри опухолей, что приводит к генетическому разнообразию сосуществующих в опухоли многочисленных субклонов с разными скоростями роста, метастатическим потенциалом и ответами на лечение. Наличие стволовых клеток меланомы является одной из потенциальных причин инвазии и метастазирования [4, 16–18]. Следует отметить, что субпопуляция опухолевых меланоцитов, экспрессирующих CD20, играет большую роль в патогенезе мМК, несмотря на их относительно низкое содержание (≤ 2 %). Так, в экспериментах с ксенографтами мела-

номы человека, полученными путем подкожной имплантации клеток биопсийного опухолевого образца, элиминация CD20⁺-клеток с помощью химерного рецептора антигена Т-клеток (chimeric antigen receptor of T-cells, CAR-T) приводила к регрессии опухоли [8, 19].

Результаты нашего исследования продемонстрировали увеличение доли клеток, экспрессирующих CD20⁺, после применения вемурафениба, что согласуется с данными, полученными Н. Tsao и соавт. в ходе эксперимента *in vitro* по увеличению доли субклона клеток, экспрессирующих CD20, среди опухолевых меланоцитов, оказавшихся резистентными к обработке ингибитором B-Raf [7]. По мнению авторов, эти данные позволяют использовать ритуксимаб — антитело к CD20 — в комбинированной терапии мМК для продления ремиссии. Следует отметить, что повышение доли опухолевых меланоцитов, экспрессирующих CD20, наблюдалось после эффективной терапии не только вемурафенибом, но и другими антимеланомными препаратами, в частности дабрафенибом, и даже после использования экзосом с адриамицином или вариантов генетически модифицированной Т-клеточной терапии [20, 21].

В ходе пилотного клинического исследования эффективности ритуксимаба, применявшегося в терапии 7 пациентов с мМК после хирургического, лучевого и химиотерапевтического лечения, получены предварительные данные, свидетельствующие о перспективности такой терапии. При этом авторы особо подчеркивают хорошую переносимость данного препарата больными мМК. Эффективное применение ритуксимаба продемонстрировано и в описании клинического случая терапии мМК, в котором представлены данные о регрессии большинства метастазов в ходе лечения. При этом наблюдались исчезновение меланомных клеток, экспрессирующих CD20, и снижение

уровня маркера меланоцитов S100 в плазме крови до почти физиологического уровня [6].

Таким образом, мы разработали адекватную модельную систему для изучения возможности использования ингибиторов В-Raf, таких как вемурафениб или дабрафениб, в комбинации с адьювантом ритуксимабом. Данные предклинических экспериментальных и пилотных клинических исследований также свидетельствуют о перспективности применения такого подхода к терапии мМК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном исследовании разработана модель *ex vivo* мМК с мутацией в гене *BRAF*, охарактеризована динамика роста опухоли при терапии вемурафенибом и без нее и оценена представленность опухолевого субклона клеток, экспрессирующих антиген CD20. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения данной модели для определения перспектив использования комбинированной терапии мМК таргетными препаратами вемурафенибом и ритуксимабом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Marti J.L.G., Hyder T., Nasrazadani A. et al. The evolving landscape of HER2-directed breast cancer therapy. *Curr Treat Options Oncol* 2020;21(10):82. DOI: 10.1007/s11864-020-00780-6
- Tarantino P., Viale G., Press M.F. et al. ESMO expert consensus statements (ECS) on the definition, diagnosis, and management of HER2-low breast cancer. *Ann Oncol* 2023;34(8):645–59. DOI: 10.1016/j.annonc.2023.05.008
- Ferguson K.M. Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys* 2008;37:353–73. DOI: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125829
- Li X., Zhao L., Chen C. et al. Can EGFR be a therapeutic target in breast cancer? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2022;1877(5):188789. DOI: 10.1016/j.bbcan.2022.188789
- Raghav K.P.S., Moasser M.M. Molecular pathways and mechanisms of HER2 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2023;29(13):2351–61. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-0283
- Lyu H., Han A., Polsdof E. et al. Understanding the biology of HER3 receptor as a therapeutic target in human cancer. *Acta Pharm Sin B* 2018;8(4):503–10. DOI: 10.1016/j.apsb.2018.05.010
- Kilroy M.K., Park S., Feroz W. et al. HER3 alterations in cancer and potential clinical implications. *Cancers (Basel)* 2022;14(24):6174. DOI: 10.3390/cancers14246174
- Papa F., Grinda T., Rassy E. et al. Long road towards effective HER3 targeting in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2024;129:102786. DOI: 10.1016/j.ctrv.2024.102786
- Uliano J., Corvaja C., Curigliano G., Tarantino P. Targeting HER3 for cancer treatment: a new horizon for old target. *ESMO Open* 2023;8(1):100790. DOI: 10.1016/j.esmoop.2023.100790
- Hoxhaj G., Manning B.D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2020;20(2):74–88. DOI: 10.1038/s41568-019-0216-7
- Mishra R., Alanazi S., Yuan L. et al. Activating HER3 mutations in breast cancer. *Oncotarget* 2018;9(45):27773–88. DOI: 10.18632/oncotarget.25576
- Murugan A.K., Grieco M., Tsuchida N. RAS mutations in human cancers: roles in precision medicine. *Semin Cancer Biol* 2019;59:23–35. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.06.007
- Kamian S., Ashoori H., Vahidian F., Davoudi S. The relevance of common *K-RAS* gene mutations and *K-RAS* mRNA expression with clinicopathological findings and survival in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2023;24(3):909–14. DOI: 10.31557/APJCP.2023.24.3.909
- Banys-Paluchowski M., Milde-Langosch K., Fehm T. et al. Clinical relevance of H-RAS, K-RAS, and N-RAS mRNA expression in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2020;179(2):403–14. DOI: 10.1007/s10549-019-05474-8
- Hossain M.A. Targeting the RAS upstream and downstream signaling pathway for cancer treatment. *Eur J Pharmacol* 2024;979:176727. DOI: 10.1016/j.ejphar.2024.176727
- Wang L., Lu Q., Jiang K. et al. BRAF V600E mutation in triple-negative breast cancer: a case report and literature review. *Oncol Res Treat* 2022;45(1–2):54–61. DOI: 10.1159/000520453
- Khojasteh Poor F., Keivan M., Ramazii M. et al. Mini review: the FDA-approved prescription drugs that target the MAPK signaling pathway in women with breast cancer. *Breast Dis* 2021;40(2):51–62. DOI: 10.3233/BD-201063
- Miricescu D., Totan A., Stanescu-Spinu I.I. et al. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects. *Int J Mol Sci* 2020;22(1):173. DOI: 10.3390/ijms22010173
- Hinz N., Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. *Cell Commun Signal* 2019;17(1):154. DOI: 10.1186/s12964-019-0450-3
- Nunnery S.E., Mayer I.A. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in hormone-positive breast cancer. *Drugs* 2020;80(16):1685–97. DOI: 10.1007/s40265-020-01394-w
- Shen L.S., Jin X.Y., Wang X.M. et al. Advances in endocrine and targeted therapy for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer. *Chin Med J* 2020;133:1099–108. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000745
- Mosele F., Stefanovska B., Lusque A. et al. Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2020;31(3):377–86. DOI: 10.1016/j.annonc.2019.11.006
- Ertay A., Liu H., Liu D. et al. WDHD1 is essential for the survival of PTEN-inactive triple-negative breast cancer. *Cell Death Dis* 2020;11(11):1001. DOI: 10.1038/s41419-020-03210-5
- Hanker A.B., Sudhan D.R., Arteaga C.L. Overcoming endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 2020;37(4):496–513. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.009
- Endicott S.J., Ziemba Z.J., Beckmann L.J. et al. Inhibition of class I PI3K enhances chaperone-mediated autophagy. *J Cell Biol* 2020;219(12):202001031. DOI: 10.1083/jcb.202001031
- Rugo H.S., Raskina K., Schrock A.B. et al. Biology and targetability of the extended spectrum of PIK3CA mutations detected in breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2023;29(6):1056–67. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-2115
- Riobo-Del Galdo N.A., Montero Á.L., Wertheimer E.V. Role of Hedgehog signaling in breast cancer: pathogenesis and therapeutics. *Cells* 2019;8(4):375. DOI: 10.3390/cells8040375
- Habib J.G., O'Shaughnessy J.A. The hedgehog pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Med* 2016;5(10):2989–3006. DOI: 10.1002/cam4.833

29. Patel D.K., Kesharwani R., Verma A. et al. Scope of Wnt signaling in the precise diagnosis and treatment of breast cancer. *Drug Discov Today* 2023;28(7):103597. DOI: 10.1016/j.drudis.2023.103597
30. Xu X., Zhang M., Xu F., Jiang S. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Mol Cancer* 2020;19(1):165. DOI: 10.1186/s12943-020-01276-5
31. Harbeck N., Penault-Llorca F., Cortes J. et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2019;5(1):66. DOI: 10.1038/s41572-019-0111-2
32. Theodosiou A., Arhondakis S., Baumann M., Kossida S. Evolutionary scenarios of Notch proteins. *Mol Biol Evol* 2009;26(7):1631–40. DOI: 10.1093/molbev/msp075
33. Krishna B.M., Jana S., Singhal J. et al. Notch signaling in breast cancer: from pathway analysis to therapy. *Cancer Lett* 2019;461:123–31. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.07.012
34. Huang P., Chen A., He W. et al. BMP-2 induces EMT and breast cancer stemness through Rb and CD44. *Cell Death Discov* 2017;3:17039. DOI: 10.1038/cddiscovery.2017.39
35. Nilendu P., Kumar A., Kumar A. et al. Breast cancer stem cells as last soldiers eluding therapeutic burn: a hard nut to crack. *Int J Cancer* 2018;142(1):7–17. DOI: 10.1002/ijc.30898

Вклад авторов

И.Н. Михайлова, Е.М. Трещалина: разработка концепции исследования, сбор данных, анализ и интерпретация результатов, написание текста статьи;

С.Ш. Каршиева: разработка дизайна исследования, постановка опыта, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;

Д.А. Хоченков: интерпретация данных, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала;

Н.В. Андропова, И.Ж. Шубина: интерпретация данных, написание текста статьи;

М.В. Киселевский: разработка дизайна исследования, анализ и интерпретация данных.

Authors' contributions

I.N. Mikhaylova, H.M. Treshalina: development of the research concept, data collection, analysis and interpretation of the results, article writing;

S.S. Karshieva: developing a research design, setting up an experience, analyzing and interpreting data, article writing;

D.A. Khochenkov: data interpretation, article writing, preparation of illustrative material;

N.V. Andronova, I.Zh. Shubina: interpretation of data, article writing;

M.V. Kiselevskiy: research design development, data analysis and interpretation.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.Н. Михайлова / I.N. Mikhaylova: <https://orcid.org/0000-0002-7659-6045>

Е.М. Трещалина / H.M. Treshalina: <https://orcid.org/0000-0002-3878-3958>

С.Ш. Каршиева / S.Sh. Karshieva: <https://orcid.org/0000-0003-2469-2315>

Д.А. Хоченков / D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>

И.Ж. Шубина / I.Zh. Shubina: <https://orcid.org/0000-0002-9374-3158>

М.В. Киселевский / M.V. Kiselevskiy: <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (протокол № Act708n от 23.08.2010).

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

Compliance with principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (protocol No. Act708n dated 08.23.2010).

The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Research and Other Scientific Purposes.

Статья поступила: 05.09.2024. **Принята к публикации:** 11.03.2025. **Опубликована онлайн:** 23.06.2025.

Article submitted: 05.09.2024. **Accepted for publication:** 11.03.2025. **Published online:** 23.06.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-77-88>

Роль остатка пролина Р325 в распознавании эпитопа МХ35 натрийзависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках карциномы яичника

Л.Ф. Булатова, И.А. Слīdzюк, А.В. Килунов, В.С. Скрипова, Р.Г. Киямова

Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18, корп. 1

Контакты: Рамзия Галлямовна Киямова kiyatova@mail.ru

Введение. Одним из ключевых компонентов клеточных мембран являются мембранные белки, обеспечивающие широкий спектр функций – от транспорта и передачи сигналов до координации межклеточных взаимодействий. Среди них особый интерес представляет натрийзависимый фосфатный транспортер NaPi2b, играющий большую роль в поддержании гомеостаза фосфатов и содержащийся в большом количестве в ряде опухолевых клеток. В состав большого внеклеточного домена (ВКД) NaPi2b входит эпитоп МХ35, который представляет значительный интерес в контексте разработки моноклональных антител для таргетной терапии карциномы яичника и легкого. Распознавание эпитопа МХ35 зависит от конформации большого ВКД, обусловленной дисульфидными связями и гликозилированием. Между двумя остатками цистеина – С322 и С328 – находится остаток пролина Р325, который, как мы предполагаем, может участвовать в формировании конформации большого ВКД NaPi2b посредством образования дисульфидной связи С322–С328, влияющей на взаимодействие моноклональных антител и эпитопа МХ35.

Цель исследования – изучение влияния остатка пролина в положении 325 в области большого ВКД транспортера NaPi2b на взаимодействие моноклональных антител L3(28/1) с эпитопом МХ35.

Материалы и методы. В исследовании использованы клеточные линии эпителиальной карциномы яичника человека OVCAR-8 и OVCAR-4. Путем сайт-направленного мутагенеза остаток пролина Р325 NaPi2b заменили на остаток аланина, в результате чего были получены клетки OVCAR-8, стабильно экспрессирующие мутантный вариант NaPi2b^{р.Р325А}. С помощью вестерн-блот-анализа и лазерной конфокальной микроскопии изучено влияние замены р.Р325А NaPi2b на взаимодействие моноклональных антител L3(28/1) и эпитопа МХ35. Для определения влияния мутации р.Р325А на формирование дисульфидных связей в большом ВКД NaPi2b проводили модификацию тиоловых групп остатков цистеина с использованием малеимидсодержащих соединений.

Результаты. Выявлено, что замена р.Р325А NaPi2b не оказывает значительного влияния на распознавание эпитопа МХ35 антителами L3(28/1) как при вестерн-блот-анализе, так и при конфокальной микроскопии. Количество дисульфидных связей в большом ВКД NaPi2b^{р.Р325А} не менялось по сравнению с NaPi2b дикого типа.

Заключение. Замена р.Р325А транспортера NaPi2b не оказывает значимого влияния на распознавание эпитопа МХ35 антителами и формирование дисульфидных связей в большом ВКД NaPi2b. Дальнейшие исследования могут быть направлены на более детальное изучение роли других замен в большом ВКД NaPi2b и их влияния на доступность эпитопа для антител.

Ключевые слова: NaPi2b, эпитоп МХ35, остаток пролина Р325, моноклональное антитело, карцинома яичника

Для цитирования: Булатова Л.Ф., Слīdzюк И.А., Килунов А.В. и др. Роль остатка пролина Р325 в распознавании эпитопа МХ35 натрийзависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках карциномы яичника. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(2):77–88.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-77-88>

The role of proline P325 residue in the recognition of the MX35 epitope of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies in ovarian carcinoma cells

L.F. Bulatova, I.A. Slidzuk, A.V. Kilunov, V.S. Skripova, R.G. Kiyamova

Research Laboratory "Biomarker", Institute of Fundamental Medicine and Biology of the Kazan Federal University; Bld. 1, 18 Kremlevskaya St.; Kazan 420008, Russia

Contacts: Ramziya Gallyamovna Kiyamova kiyamova@mail.ru

Introduction. One of the key components of cell membranes are membrane proteins, which provide a wide range of functions – from transport and signal transmission to coordination of intercellular interactions. Among them, of particular interest is the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b, which plays an important role in maintaining phosphate homeostasis and is characterized by an increased content in a number of tumor cells. The large extracellular domain (ECD) of NaPi2b contains the MX35 epitope, which is of significant interest in the context of the development of monoclonal antibodies for targeted therapy of ovarian and lung carcinoma. Recognition of the MX35 epitope depends on the conformation of the large ECD, which is influenced by disulfide bonds and glycosylation. Between cysteine residues C322 and C328, there is a proline residue P325, which we hypothesize may contribute to the conformation of the NaPi2b large ECD by forming a disulfide bond between C322 and C328, potentially affecting the interaction of monoclonal antibodies with the MX35 epitope.

Aim. To study the impact of the proline residue at position 325 in the large ECD of the transporter NaPi2b on the interaction of monoclonal antibodies L3(28/1) with the MX35 epitope.

Materials and methods. The human ovarian epithelial carcinoma cell lines OVCAR-8 and OVCAR-4 were used in the study. By site-directed mutagenesis, the proline residue P325 of NaPi2b was replaced with an alanine residue, resulting in OVCAR-8 cells stably expressing the mutant variant of NaPi2b^{p.P325A}. The effect of the p.P325A substitution in NaPi2b on the interaction of monoclonal antibodies L3(28/1) with the MX35 epitope was analyzed using western blotting and laser confocal microscopy. To assess the impact of the p.P325A mutation on the formation of disulfide bonds in the NaPi2b large ECD, cysteine residues thiol groups were modified using maleimide-containing compounds.

Results. It was found that the substitution of p.P325A in NaPi2b did not significantly affect the recognition of the MX35 epitope by L3(28/1) antibodies, as shown by both western blot analysis and confocal microscopy. The number of disulfide bonds in the large ECD of the mutant NaPi2b^{p.P325A} form was unchanged compared to wild-type NaPi2b.

Conclusion. Substitution p.P325A in the NaPi2b transporter does not have a significant effect on the recognition of the MX35 epitope by antibodies or the formation of disulfide bonds in the NaPi2b large ECD. Future studies could focus on a more detailed investigation of the roles of other substitutions in the NaPi2b large ECD and their influence on the epitope's accessibility to antibodies.

Keywords: NaPi2b, MX35 epitope, proline residue P325, monoclonal antibody, ovarian carcinoma

For citation: Bulatova L.F., Slidzuk I.A., Kilunov A.V. et al. The role of proline P325 residue in the recognition of the MX35 epitope of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies in ovarian carcinoma cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(2):77–88. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-77-88>

ВВЕДЕНИЕ

Мембранные белки представляют собой важный класс молекул, обеспечивающих регуляцию широкого спектра биологических процессов, включая трансмембранный транспорт веществ, рецепторно-опосредованное распознавание, передачу внутриклеточных сигналов, а также межклеточные взаимодействия [1]. Около 30 % всех генов, аннотированных в полном геноме клетки, кодируют мембранные белки [2]. Локализация на клеточной мембране делает такие белки особенно ценными с точки зрения разработки таргетных лекарственных препаратов [3]. В связи с этим исследование пространственной организации и конформационных особенностей мембранных белков, в частности их внеклеточных доменов, представляет собой приоритетное направление для выявления новых молекулярных мишеней, пригодных для разработки таргетной терапии.

Транспортер NaPi2b, который входит в семейство натрийзависимых фосфатных транспортеров SLC34, функционирует как трансмембранный переносчик фосфата и играет большую роль в регуляции фосфатного обмена у человека, млекопитающих и других позвоночных организмов [4]. Высокая экспрессия гена, кодирующего транспортер NaPi2b, наблюдается в клетках различных злокачественных новообразований, что делает NaPi2b привлекательной мишенью для разработки таргетных противоопухолевых препаратов [5–10]. Предметом особого интереса является большой внеклеточный домен (ВКД, 188–361 а.о.) NaPi2b, поскольку именно в его пределах локализуется эпитоп MX35 (311–340 а.о.) [11], который служит мишенью для терапевтических моноклональных антител (мАТ), разрабатываемых для таргетного лечения карцином яичника и легкого [12, 13]. Установлено, что доступность эпитопа MX35 для связывания

с антителами определяется структурными особенностями большого ВКД NaPi2b, в частности гликозилизацией и наличием дисульфидных связей [14]. Обработка лизатов опухолевых клеток с высокой экспрессией NaPi2b восстанавливающими агентами, такими как ди-тиотреитол (ДТТ), приводит к утрате способности МАТ к распознаванию эпитопа MX35 при проведении вестерн-блот-анализа [11, 15–17]. Показано, что замена остатков цистеина в позициях 303, 322, 328 и 350 на остатки аланина, моделирующая условия, при которых дисульфидные связи нарушены, вызывает полную утрату связывания эпитопа MX35 с МАТ. Эти данные свидетельствуют о большом значении остатков цистеина в формировании пространственной структуры большого ВКД NaPi2b, необходимой для обеспечения доступности эпитопа MX35 [18, 19].

Интересно, что в районе эпитопа MX35 располагается остаток пролина в положении 325. Он находится в непосредственной близости от остатков цистеина в позициях 322 и 328, которые согласно структурной модели, предсказанной с использованием алгоритма AlphaFold DeepMind, могут участвовать в формировании дисульфидной связи [15]. Такая пространственная организация указывает на возможную роль остатка пролина в стабилизации конформации большого ВКД и, как следствие, доступности эпитопа MX35. С учетом способности остатка пролина обеспечивать изгибы в полипептидной цепи за счет своей жесткой циклической структуры [20] мы предположили, что остаток пролина в позиции 325 может опосредованно вызывать образование дисульфидной связи между остатками цистеина С322 и С328, обуславливая изменение конформации большого ВКД и сближая данные остатки цистеина в пространстве.

Таким образом, исследование участия остатка пролина Р325 в формировании дисульфидной связи между остатками цистеина С322 и С328 в большом ВКД NaPi2b, а также его роли в распознавании эпитопа MX35 МАТ представляет собой актуальное направление. С этой целью мы заменили остаток пролина в позиции 325 на остаток аланина методом сайт-направленного мутагенеза и изучили распознавание эпитопа MX35 МАТ с использованием вестерн-блот-анализа и лазерной конфокальной микроскопии. Кроме того, было проведено сравнение количества дисульфидных связей в большом ВКД мутантной формы NaPi2b (NaPi2b^{P.325A}) и транспортера дикого типа (NaPi2b^{WT}) с помощью модификации тиоловых групп остатков цистеина с применением малеимидсодержащих соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моноклональные антитела. Для распознавания NaPi2b^{P.325A} и NaPi2b^{WT} в ходе вестерн-блот-анализа и конфокальной микроскопии использовали первичные мышинные МАТ L3(28/1) [21], распознающие эпитоп MX35 в области большого ВКД транспортера NaPi2b, и мышинные МАТ N-NaPi2b(15/1), направленные

против внутриклеточного N-концевого домена NaPi2b [17]. Для контроля загрузки белка при проведении вестерн-блот-анализа применяли первичные мышинные МАТ против глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH; HyTest, Россия). В качестве вторичных антител использовали козы анти тела, которые связываются с Fc-фрагментом мышинных антител, конъюгированные с пероксидазой хрена или с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США).

Клеточные линии и бактериальные штаммы. В исследовании использованы клеточные линии карциномы яичника человека: OVCAR-8 (Creative Biolabs, США), в которой отсутствует эндогенная экспрессия гена транспортера NaPi2b, и OVCAR-4 (Merck Millipore, США), эндогенно экспрессирующая ген транспортера NaPi2b^{WT}, в качестве положительного контроля [16]. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 («Панэко», Россия), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Capricorn, Германия), 2 мМ аланил-глутамин («Панэко», Россия), 100 ЕД/мл пенициллина («Панэко», Россия), 100 мкг/мл стрептомицина («Панэко», Россия). Клетки почки эмбриона человека НЕК-293Т (ATCC, США) использовали для получения лентивирусных частиц. Клетки культивировали в питательной среде DMEM («Панэко», Россия), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Capricorn, Германия), 4 мМ аланил-глутамин («Панэко», Россия), 100 ЕД/мл пенициллина («Панэко», Россия), 100 мкг/мл стрептомицина («Панэко», Россия). Все клеточные линии культивировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

Для создания рекомбинантных плазмид, кодирующих транспортер NaPi2b с аминокислотной заменой р.Р325А, использовали компетентные клетки бактерий *Escherichia coli* (*E. coli*) штамма XL1-Blue («Евроген», Россия), которые культивировали в лизогенной среде LB (PanReac AppliChem, Германия).

Получение клеток карциномы яичника OVCAR-8, синтезирующих NaPi2b^{P.325A}. Клетки карциномы яичника OVCAR-8, синтезирующие NaPi2b^{P.325A}, получали с помощью лентивирусной трансдукции. Для этого методом сайт-направленного мутагенеза сначала получали рекомбинантную плазмиду, содержащую комплементарную ДНК (кДНК) мутантной формы транспортера NaPi2b с заменой остатка пролина в положении 325 на остаток аланина, с использованием набора реактивов Quick Change II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, США) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве матрицы применяли рекомбинантную плазмиду для транзientной трансфекции pcDNA3.1(+)/NaPi2b, содержащую кДНК дикого типа фосфатного транспортера NaPi2b (*SLC34A2*, NM_006424.2). Наличие целевой мутации подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру.

Для сайт-направленного мутагенеза использовали следующие праймеры: прямой праймер 5'-ССААСAG

AGGGAAGCGGAGGTGCAGTTAG-3', обратный праймер 5'-СТААСТGCACCTCCGCTTCCCTCTGTTGG-3'. Затем кДНК NaPi2b^{p.P325A} клонировали в лентивирусный вектор pLV-CMV-H4-puro с помощью рестриктаз EcoRI и BamHI с последующей амплификацией в клетках *E. coli* штамма XL-1 Blue и выделением плазмидной ДНК с использованием набора Plasmid MiniPrep («Евроген», Россия). Лентивирусные частицы получали путем трансфекции клеток HEK-293T упаковочными плазмидами psPAX2 (Addgene #12260), pMD2.G (Addgene #12259) и рекомбинантным лентивирусным вектором pLV-CMV-H4-puro/NaPi2b^{p.P325A}. Лентивирусную трансдукцию клеток OVCAR-8 проводили, как описано ранее [22], с последующим отбором клональных сублиний методом редкого посева. В экспериментах также использовали полученные нами ранее клетки OVCAR-8, стабильно экспрессирующие NaPi2b^{WT} (OVCAR-8/NaPi2b^{WT}) или пустой вектор pLV-CMV-H4-puro без вставки (OVCAR-8/empty).

Модификация тиоловых групп остатков цистеина.

Метод разработан для определения количества дисульфидных связей между остатками цистеина во внеклеточных доменах белков [23]. При его использовании свободные сульфгидрильные группы остатков цистеина, не вовлеченные в формирование дисульфидных связей, блокируются 3-(N-малеимидопропионил)-биоцитином (MPB). Затем существующие во внеклеточных доменах дисульфидные связи восстанавливаются с помощью трис(2-карбоксиэтил)-фосфина (ТСЕР), высвобождая новые тиоловые группы, которые далее ковалентно модифицируются метоксиполиэтиленгликолем малеимидом-5000 (mPEG-Mal-5000). Эта модификация сопровождается увеличением молекулярной массы исследуемого белка пропорционально числу свободных сульфгидрильных групп (около 5 кДа на одну группу), что можно оценить по его электрофоретической подвижности МАТ в вестерн-блот-анализе.

Суспензии живых клеток (по 2 млн клеток на образец) линий OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} и OVCAR-8/NaPi2b^{WT} последовательно обрабатывали химическими агентами MPB, ТСЕР и mPEG-Mal-5000. Клетки инкубировали со 100 мкМ MPB в течение 13 мин, с 2,5 мМ ТСЕР (для восстановления дисульфидных связей) в течение 40 мин и модифицировали с помощью 2,5 мМ mPEG-Mal-5000 в течение 40 мин. Все инкубации проводили в условиях 37 °C и 5 % CO₂. После каждой инкубации клетки 3 раза отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с последующим центрифугированием при 900 об/мин в течение 3 мин.

Вестерн-блот-анализ. Для проведения вестерн-блот-анализа получали растворимые белковые фракции лизатов клеток OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A}, OVCAR-8/NaPi2b^{WT}, OVCAR-8/empty и OVCAR-4. Перед загрузкой образцов в гель для проведения электрофореза растворимые белковые фракции смешивали с загрузочным буфером (0,25 М Трис основной, 30 % глицерин, 0,15 % бромфеноловый синий, 10 % додецилсуль-

фат натрия, pH 6,8) с добавлением 0,5 М восстанавливающего дисульфидные связи агента ДТТ или без него. Образцы инкубировали 5 мин при температуре 95 °C. Электрофорез белков осуществляли в 10 % полиакриламидном геле в камере MINI-Protean TETRA (Bio-Rad, США).

Перенос белков с геля на PVDF-мембрану проводили методом мокрого переноса, используя буфер (0,25 М Трис основной, 1,92 М глицин, 20 % метанол, pH 8,3). В качестве положительного контроля применяли образцы, полученные из клеток OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-4. В качестве отрицательного контроля использовали образцы, полученные из клеток OVCAR-8/empty. Для распознавания эпитопа MX35 транспортера NaPi2b применяли первичные мышиные МАТ L3(28/1). Уровень содержания транспортера NaPi2b в исследуемых образцах оценивали с помощью первичных мышиных МАТ N-NaPi2b(15/1) против внутриклеточного N-концевого домена NaPi2b, распознавание которого не зависит от добавления восстанавливающих дисульфидные связи агентов и аминокислотных замен в области большого ВКД [17]. Для контроля равномерной загрузки белков использовали первичные мышиные МАТ против GAPDH. В качестве вторичных антител применяли козы анти тела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена. Хемилюминесцентный сигнал детектировали с помощью прибора ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США) с использованием программы Image Lab (Bio-Rad, США).

Эксперименты проводили в 3 биологических повторениях. Для анализа влияния замены p.P325A на доступность эпитопа MX35 транспортера NaPi2b для МАТ L3(28/1) проводили количественную оценку его распознавания по интенсивности хемилюминесцентного сигнала от МАТ L3(28/1) с учетом уровня содержания транспортера NaPi2b и загрузки образцов. Денситометрический анализ интенсивности хемилюминесцентного сигнала выполняли в программе Image Lab для образцов лизатов клеток OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A}, не содержащих ДТТ. Сначала для учета погрешностей при загрузке образцов интенсивность сигнала для МАТ L3(28/1) и N-NaPi2b(15/1) каждого образца нормализовали на интенсивность сигнала от МАТ против GAPDH для этих же образцов. Затем для учета уровня содержания транспортера NaPi2b нормализованные значения интенсивности сигнала для МАТ L3(28/1) делили на нормализованные значения интенсивности сигнала для МАТ N-NaPi2b(15/1) в тех же образцах. Полученные значения использовали для статистического анализа, который проводили в программе GraphPad Prism с использованием U-критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Лазерная конфокальная микроскопия. Для изучения взаимодействия МАТ с эпитопом MX35 в NaPi2b^{p.P325A} с помощью лазерной конфокальной микроскопии использовали интактные (живые) и/или фиксированные и пермеабелизованные клетки карциномы яичника

OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A}. За 1 день до проведения эксперимента клетки предварительно пассивировали на культуральные чашки Петри со стеклянным дном (Mattek, США) в количестве 50 тыс. на чашку.

Интактные клетки инкубировали с первичными мАТ L3(28/1) в среде RPMI-1640 без содержания фенолового красного («Панэко», Россия) в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С. Образцы отмывали от первичных антител ФСБ 3 раза по 5 мин. После отмывки клетки инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488, в течение 30 мин при температуре 37 °С. Образцы отмывали от вторичных антител ФСБ 3 раза по 5 мин.

Оценку уровня содержания транспортера NaPi2b проводили в фиксированных и пермеабилizованных клетках OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} с использованием мАТ N-NaPi2b(15/1). Клетки фиксировали 4 % раствором параформальдегида (PanReas AppliChem, Германия) в течение 20 мин при комнатной температуре. Для удаления остатков параформальдегида их промывали ФСБ 3 раза по 5 мин. Блокировку и пермеабилизацию клеток проводили блокирующим буфером (3 % раствор бычьего сывороточного альбумина на ФСБ), содержащим 0,1 % Тритона X-100 (PanReas AppliChem, Германия). Инкубацию клеток с первичными мАТ N-NaPi2b(15/1) осуществляли в течение 1 ч при комнатной температуре в блокирующем буфере. Образцы отмывали от первичных антител ФСБ 3 раза по 5 мин. После отмывки клетки инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США), в блокирующем буфере при комнатной температуре в течение 30 мин. Образцы отмывали от вторичных антител ФСБ 3 раза по 5 мин.

Для визуализации ядер интактных и фиксированных клеток использовали красители Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, США) в конечной концентрации 1 мкг/мл и йодид пропидия (Thermo Fisher Scientific, США) в конечной концентрации 0,1 мкг/мл с добавлением 10 мкг/мл РНКазы А (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы инкубировали с красителями за 30 мин до визуализации на микроскопе, без отмывки. Анализ образцов проводили с помощью лазерного конфокального микроскопа Stedyscon (Abberior, США).

Эксперименты выполняли в 3 биологических повторях. По результатам эксперимента проводили цифровую и статистическую обработку флуоресцентного сигнала, полученного с микрофотографий. Количественную оценку интенсивности флуоресценции выполняли с использованием программного обеспечения ImageJ на основе анализа 9 полей изображения для каждого образца. Для каждого поля рассчитывали интегральную интенсивность (integrated density) по каналу Alexa Fluor 488 (зеленый спектр 488/520 нм — флуоресценция соответствует сигналу от вторичных антител, специфичных к первичным антителам против NaPi2b) и количество клеток, окрашенных Hoechst

33342 (синий спектр 405/525 нм — используется для окрашивания ядерной ДНК). Для повышения точности измерений из интегральной интенсивности сигнала Alexa Fluor 488 вычитали фоновую флуоресценцию, которую вычисляли путем умножения средней интенсивности (mean gray value) по 6 областям фона одного поля зрения на площадь изображения. Для каждого из 9 полей изображения определяли удельную интенсивность флуоресценции Alexa Fluor 488 на 1 клетку, которую рассчитывали путем деления интегральной интенсивности флуоресценции Alexa Fluor 488 после вычитания фоновой флуоресценции на количество клеток, окрашенных Hoechst 33342. На основе полученных данных по 9 полям изображения для каждого образца определяли среднее значение удельной интенсивности флуоресценции Alexa Fluor 488.

Для анализа влияния замены p.P325A на доступность эпитопа MX35 для распознавания мАТ L3(28/1) среднюю удельную интенсивность флуоресценции Alexa Fluor 488 образцов клеток OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A}, окрашенных мАТ L3(28/1), делили на среднюю удельную интенсивность флуоресценции Alexa Fluor 488 образцов этих же клеток, окрашенных мАТ N-NaPi2b(15/1), для учета уровня содержания транспортера в исследуемых клетках. Полученные значения использовали для статистического анализа с применением U-критерия Манна–Уитни в программе GraphPad Prism. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распознавание эпитопа MX35 моноклональными антителами в NaPi2b^{p.P325A}. На рис. 1 представлена схема получения клеток карциномы яичника OVCAR-8, стабильно экспрессирующих NaPi2b^{WT} и NaPi2b^{p.P325A}. На рис. 1, а изображена модель структуры большого ВКД NaPi2b^{WT} из базы AlphaFold DeepMind [15], в области которого находятся 4 остатка цистеина C303, C322, C328 и C350. Между остатками цистеина C322 и C328, которые согласно модели AlphaFold образуют дисульфидную связь (см. рис. 1, а), расположен остаток пролина в положении 325 (P325). Мы получили клетки карциномы яичника OVCAR-8, экспрессирующие либо NaPi2b^{WT} (OVCAR-8/NaPi2b^{WT}), либо NaPi2b^{p.P325A} (OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A}), используя сайт-направленный мутагенез и лентивирусную трансдукцию. Предполагается, что в результате данной замены может нарушаться образование дисульфидной связи в области большого ВКД NaPi2b (см. рис. 1, б).

Для оценки влияния мутации p.P325A на распознавание эпитопа MX35 мАТ L3(28/1) проведен вестерн-блот-анализ лизатов OVCAR-8/NaPi2b^{WT} или OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A}. Анализ проводили как в присутствии ДТТ, так и без него, что позволило оценить степень распознавания эпитопа MX35 в зависимости от наличия или отсутствия дисульфидных связей внутри большого ВКД NaPi2b. Для верификации

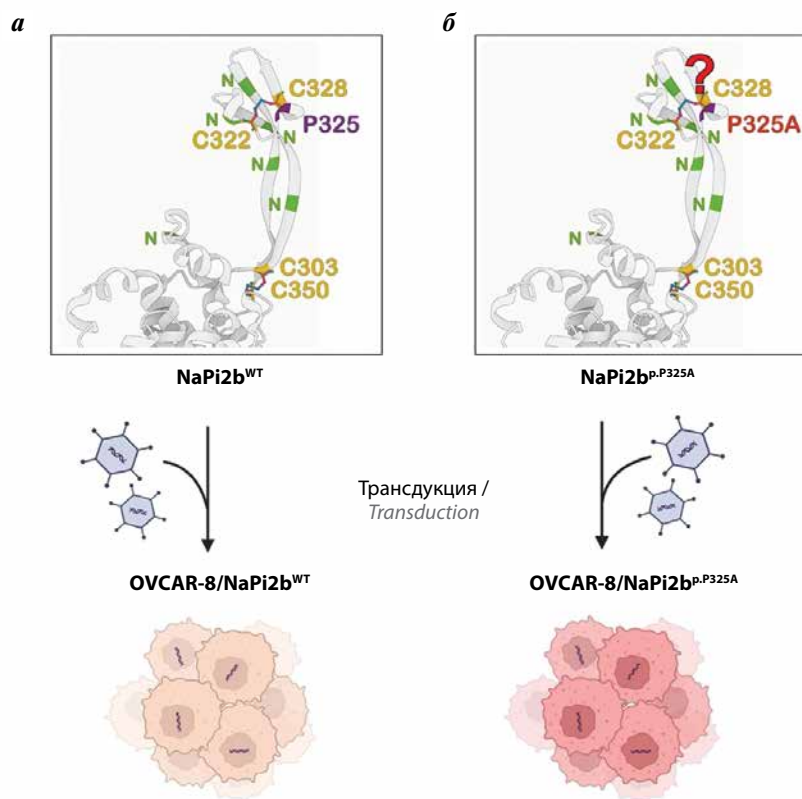


Рис. 1. Схема получения клеток карциномы яичника OVCAR-8, стабильно экспрессирующих дикий тип транспортера NaPi2b (NaPi2b^{WT}) (а) или его мутантную форму с заменой остатка пролина на остаток аланина в положении 325 (NaPi2b^{p.P325A}) (б)
Fig. 1. Schematic representation of generating OVCAR-8 ovarian carcinoma cells stably expressing either the wild-type NaPi2b transporter (NaPi2b^{WT}) (а) or its mutant form with a proline-to-alanine substitution at position 325 (NaPi2b^{p.P325A}) (б)

уровня экспрессии NaPi2b в образцах использовали МАТ N-NaPi2b(15/1), направленные против N-концевого домена транспортера, эпитоп которого не чувствителен к восстановлению дисульфидных связей (рис. 2, а). Полученные данные подтвердили наличие как NaPi2b^{WT}, так и OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} в соответствующих клетках карциномы яичника (см. рис. 2, а, дорожки 1–4), а также эндогенного транспортера NaPi2b в образцах клеток OVCAR-4, которые использовали в качестве положительного контроля (см. рис. 2, а, дорожки 7 и 8). Следует отметить, что интенсивность хемилюминесцентного сигнала не уменьшалась при добавлении ДТТ, как и ожидалось для МАТ N-NaPi2b(15/1) (см. рис. 2, а) [17]. Результаты вестерн-блот-анализа образцов клеток OVCAR-8/emrty, которые использовали в качестве отрицательного контроля, подтвердили отсутствие в них транспортера NaPi2b (см. рис. 2, а, дорожки 5 и 6).

Результаты вестерн-блот-анализа распознавания эпитопа MX35 антителами L3(28/1) показали, что интенсивность специфического сигнала снижается во всех образцах при добавлении ДТТ, что связано с изменением доступности эпитопа MX35 для МАТ при восстановлении дисульфидных связей (рис. 2, б, дорожки 2, 4, 8) и подтверждает полученные ранее данные [11, 15]. Для оценки

влияния замены остатка пролина на остаток аланина в позиции 325 на распознавание эпитопа MX35 МАТ L3(28/1) проведена количественная обработка результатов вестерн-блот-анализа, полученных для NaPi2b^{p.P325A} и NaPi2b^{WT}. На основе этих данных построен график, отражающий относительную интенсивность сигнала, соответствующего связыванию антител с эпитопом MX35, с учетом уровня экспрессии рекомбинантного NaPi2b в клетках OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} и OVCAR-8/NaPi2b^{WT} (рис. 2, в). Выявлено незначительное повышение распознавания NaPi2b^{p.P325A} по сравнению с NaPi2b^{WT}, однако в ходе статистической обработки данных с применением U-критерия Манна–Уитни не обнаружено значимых различий в связывании антител L3(28/1) с эпитопом MX35 в NaPi2b^{p.P325A} по сравнению с NaPi2b^{WT}.

Далее мы провели сравнительный анализ распознавания NaPi2b^{p.P325A} и NaPi2b^{WT} в клетках OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} и OVCAR-8/NaPi2b^{WT} соответственно с использованием лазерной конфокальной микроскопии. Для начала был оценен уровень содержания рекомбинантного NaPi2b в пермеабилizованных клетках с использованием антител N-NaPi2b(15/1), направленных против внутриклеточного N-концевого домена

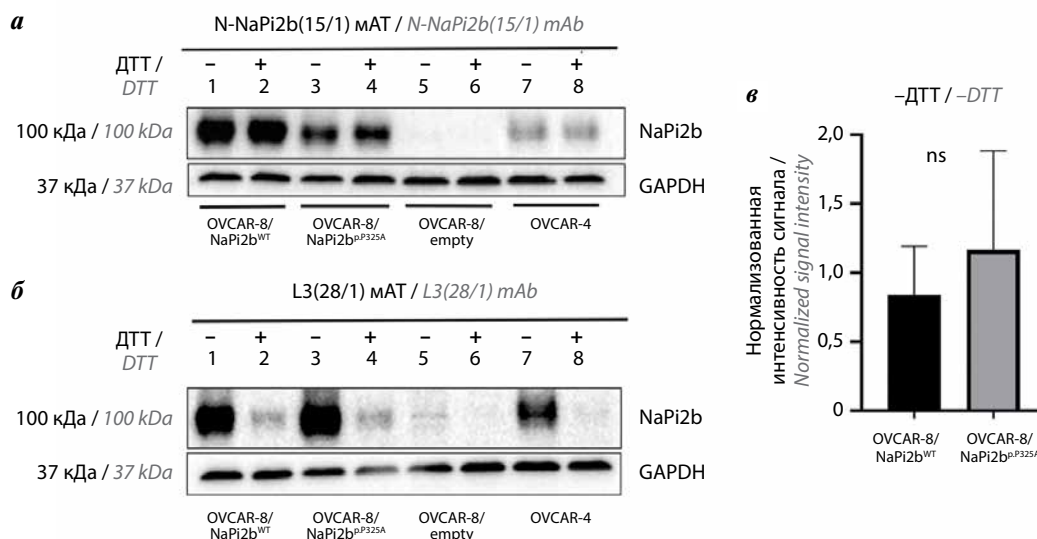


Рис. 2. Результаты вестерн-блот-анализа содержания рекомбинантного натрийзависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами (мАТ) N-NaPi2b(15/1) против N-концевого домена транспортера (а) и доступности эпитопа MX35 NaPi2b для распознавания мАТ L3(28/1) (б). Сравнение распознавания эпитопа MX35 антителами L3(28/1) в мутантной форме NaPi2b с заменой остатка пролина на остаток аланина в положении 325 (NaPi2b^{P325A}) и NaPi2b дикого типа (NaPi2b^{WT}) с учетом уровня содержания белка NaPi2b в исследуемых образцах без добавления дитиотреитола (ДТТ) (в). GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; ns – отсутствие статистически значимых различий ($p > 0,05$)

Fig. 2. Western blot analysis of recombinant sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b content using N-NaPi2b(15/1) monoclonal antibodies (mAb) against the N-terminal domain of the transporter (a), and the availability of the MX35 NaPi2b epitope for recognition by L3(28/1) mAb (b). Comparison of MX35 epitope recognition by L3(28/1) antibodies in NaPi2b^{P325A} and NaPi2b^{WT}, considering the NaPi2b protein levels in the samples without dithiothreitol (DTT) addition (c). GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ns – no statistically significant differences ($p > 0.05$)

NaPi2b (рис. 3, а). Статистическая обработка данных микроскопии показала, что уровень флуоресцентного сигнала в клетках, экспрессирующих NaPi2b^{P325A}, был значимо выше по сравнению с клетками, экспресси-

рующими NaPi2b^{WT} (рис. 3, б). Это свидетельствует о более высоком уровне экспрессии NaPi2b^{P325A} по сравнению с NaPi2b^{WT} в исследуемых клетках OVCAR-8.

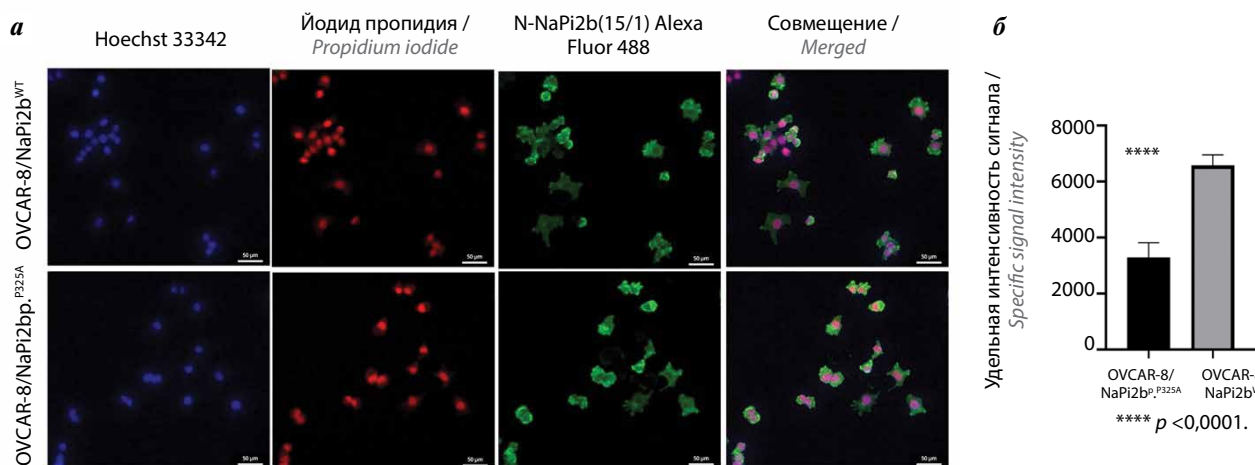


Рис. 3. Содержание рекомбинантного транспортера NaPi2b в клетках OVCAR-8, экспрессирующих NaPi2b^{WT} и NaPi2b^{P325A} по данным лазерной конфокальной микроскопии: а – визуализация NaPi2b в фиксированных и пермеабилizованных клетках с использованием моноклональных антител N-NaPi2b(15/1), распознающих N-концевой домен транспортера; б – содержание NaPi2b в клетках OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-8/NaPi2b^{P325A} (удельная интенсивность флуоресценции). Статистическая значимость различий определена с использованием U-критерия Манна–Уитни. NaPi2b^{P325A} – мутантная форма NaPi2b с заменой остатка пролина на остаток аланина в положении 325; NaPi2b^{WT} – NaPi2b дикого типа

Fig. 3. Recombinant NaPi2b transporter content in OVCAR-8 cells expressing NaPi2b^{WT} and NaPi2b^{P325A} according to laser confocal microscopy: (a) visualization of NaPi2b in fixed and permeabilized cells using N-NaPi2b(15/1) monoclonal antibody recognizing the N-terminal domain of the transporter; (b) NaPi2b content between OVCAR-8/NaPi2b^{WT} and OVCAR-8/NaPi2b^{P325A} cells based on specific fluorescence intensity. Statistical significance of differences was calculated using the Mann–Whitney U-criterion. NaPi2b^{P325A} – mutant form of NaPi2b with a proline residue replaced by alanine at position 325; NaPi2b^{WT} – wild-type NaPi2b

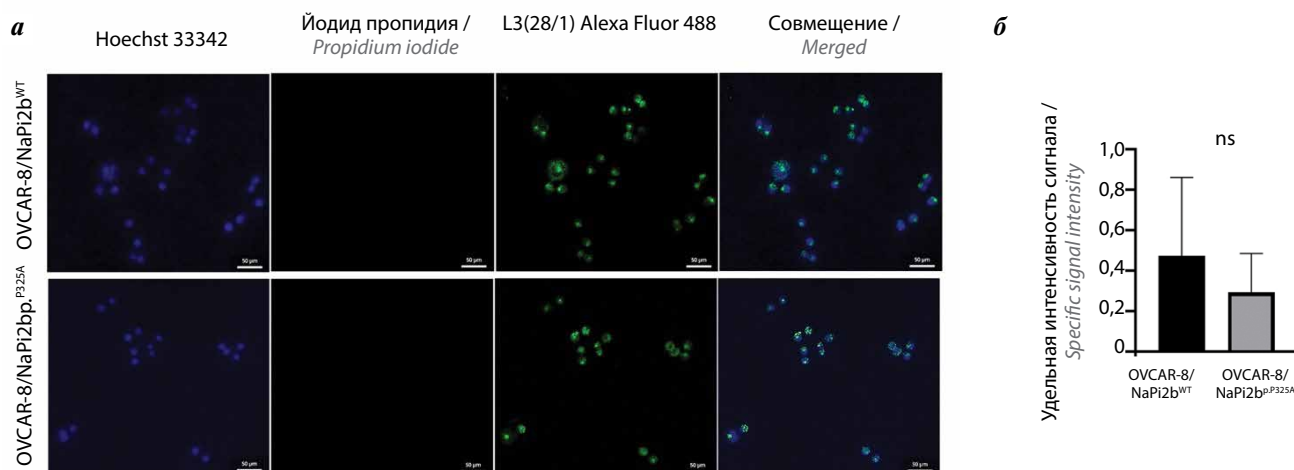


Рис. 4. Распознавание эпитопа MX35 транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках OVCAR-8, экспрессирующих NaPi2b^{WT} и NaPi2b^{p.P325A}, методом лазерной конфокальной микроскопии: а – визуализация NaPi2b в живых интактных клетках с использованием моноклональных антител L3(28/1), распознающих эпипептид MX35; б – сравнение распознавания эпитопа MX35 NaPi2b в клетках OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} на основе удельной интенсивности флуоресценции. Статистическая значимость различий рассчитана с использованием U-критерия Манна–Уитни. NaPi2b^{p.P325A} – мутантная форма NaPi2b с заменой остатка пролина на остаток аланина в положении 325; NaPi2b^{WT} – NaPi2b дикого типа; ns – отсутствие статистически значимых различий ($p > 0,05$)

Fig. 4. Recognition of the MX35 epitope of the NaPi2b transporter by monoclonal antibodies in OVCAR-8 cells expressing NaPi2b^{WT} and NaPi2b^{p.P325A} by laser confocal microscopy: a – visualization of NaPi2b in live intact cells using L3(28/1) monoclonal antibody recognizing the MX35 epitope; б – comparison of MX35 epitope recognition by NaPi2b between OVCAR-8/NaPi2b^{WT} and OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} cells based on specific fluorescence intensity. Statistical significance of differences was calculated using the Mann–Whitney U-criterion. NaPi2b^{p.P325A} – mutant form of NaPi2b with a proline residue replaced by alanine at position 325; NaPi2b^{WT} – wild-type NaPi2b; ns – no statistically significant differences ($p > 0.05$)

На следующем этапе работы проанализирована связь между заменой остатка пролина на остаток аланина в позиции 325 в большом ВКД NaPi2b и доступностью эпитопа MX35 для распознавания мАТ L3(28/1). Интактные клетки карциномы яичника OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} и OVCAR-8/NaPi2b^{WT} инкубировали с мАТ L3(28/1) и визуализировали с помощью микроскопии (рис. 4, а). Для подтверждения целостности плазматической мембраны исследуемых клеток использовали окрашивание йодидом пропидия. Для оценки количества клеток проводили окрашивание ядер Hoechst 33342. Отсутствие флуоресцентного сигнала в красном канале указывает на то, что мембрана клеток остается непроницаемой для йодида пропидия. Это свидетельствует о сохранении интактности клеток. Таким образом, флуоресцентный сигнал в зеленом канале соответствует мембранному окрашиванию NaPi2b и локализации эпитопа MX35 на поверхности клеток (см. рис. 4, а).

Для статистической оценки влияния замены остатка пролина на остаток аланина в позиции 325 на эффективность распознавания эпитопа MX35 антителами L3(28/1) проанализированы количественные данные, полученные с помощью лазерной конфокальной микроскопии интактных клеток OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} и OVCAR-8/NaPi2b^{WT}, с учетом уровня экспрессии NaPi2b в соответствующих образцах, как описано в разделе «Материалы и методы». Несмотря на то что в среднем распознавание NaPi2b^{p.P325A} антителами L3(28/1) оказалось хуже по сравнению с NaPi2b^{WT}, различия не были статистически значимыми (рис. 4, б).

Полученные данные свидетельствуют о том, что замена р.Р325А в транспортере NaPi2b не оказывает существенного влияния на доступность эпитопа MX35 для распознавания мАТ L3(28/1) при анализе с использованием конфокальной микроскопии.

Таким образом, результаты вестерн-блот-анализа и лазерной конфокальной микроскопии не подтвердили наличие значимых различий в узнаваемости эпитопа MX35 антителами L3(28/1) между NaPi2b^{p.P325A} и NaPi2b^{WT}. В ходе статистической обработки данных не выявлено значимого изменения уровня связывания антител с эпипептидом MX35 в мутантной форме NaPi2b^{p.P325A}.

Модификация тиоловых групп остатков цистеина в NaPi2b^{p.P325A}. В ходе выполнения данной работы изучено влияние замены р.Р325А на количество дисульфидных связей в большом ВКД NaPi2b. Для этого мы использовали метод химической модификации тиоловых групп остатков цистеина малеимидсодержащими соединениями [23]. Исследование проводили на живых клетках OVCAR-8/NaPi2b^{p.P325A} и OVCAR-8/NaPi2b^{WT} для модификации тиоловых групп остатков цистеина, локализованных во ВКД транспортера NaPi2b, без воздействия на внутриклеточные домены, также содержащие остатки цистеина. Лизаты клеток после химической модификации использовали для вестерн-блот-анализа электрофоретической подвижности транспортера NaPi2b антителами N-NaPi2b(15/1). Результаты вестерн-блот-анализа лизатов модифицированных и немодифицированных клеток представлены на рис. 5.

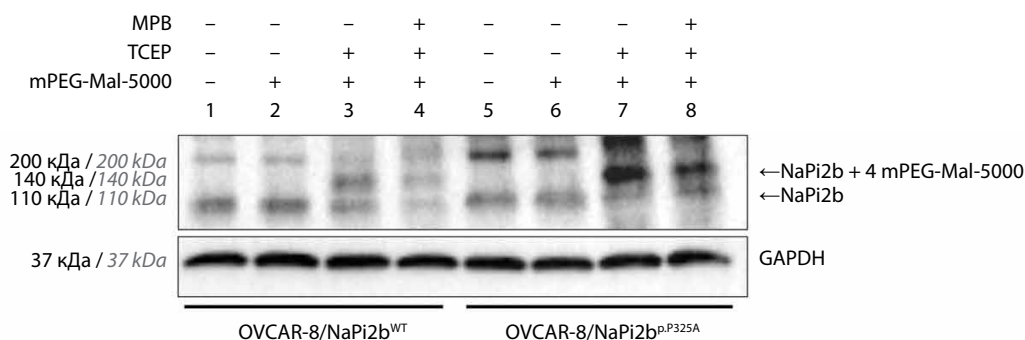


Рис. 5. Результаты вестерн-блот-анализа лизатов клеток карциномы яичника OVCAR-8/NaPi2b^{WT} и OVCAR-8/NaPi2b^{P325A} после модификации maleimидсодержащими соединениями. Детекцию NaPi2b проводили с использованием моноклональных антител N-NaPi2b(15/1). MPB — 3-(N-maleimidopropionил)-биоцитин; TCEP — трис-(2-карбокsetил)-фосфин гидрохлорида; mPEG-Mal-5000 — метоксиполиэтилен-гликоль maleimид-5000; GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

Fig. 5. Results of Western blot analysis of lysates of OVCAR-8/NaPi2b^{WT} and OVCAR-8/NaPi2b^{P325A} ovarian carcinoma cells after modification with maleimide-containing compounds. NaPi2b detection was performed using N-NaPi2b(15/1) monoclonal antibody. MPB — 3-(N-maleimidopropionyl)-biocytin. TCEP — tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride; mPEG-Mal-5000 — methoxypolyethylene glycol maleimide 5000; GAPDH — glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Специфический сигнал, детектируемый в ходе вестерн-блот-анализа с использованием антител N-NaPi2b(15/1), наблюдался в области около 100 кДа в лизатах немодифицированных клеток как OVCAR-8/NaPi2b^{P325A}, так и OVCAR-8/NaPi2b^{WT}, что соответствует молекулярной массе NaPi2b без воздействия модифицирующих и восстанавливающих агентов (см. рис. 5, дорожки 1 и 5). Обработка клеток только модифицирующим агентом mPEG-Mal-5000 не привела к изменению электрофоретической подвижности транспортера как в NaPi2b^{WT}, так и в NaPi2b^{P325A} (см. рис. 5, дорожки 2 и 6). Это указывает на отсутствие свободных тиоловых групп в большом ВКД NaPi2b и, следовательно, говорит о том, что все 4 остатка цистеина (C303, C322, C328 и C350) вовлечены в образование 2 дисульфидных связей. Восстановление дисульфидных связей с дальнейшей модификацией клеток mPEG-Mal-5000 привело к изменению электрофоретической подвижности транспортера NaPi2b примерно на 20 кДа. Скорее всего, к каждой молекуле NaPi2b присоединились 4 молекулы mPEG-Mal-5000, каждая молекулярной массой 5000 кДа, что увеличило молекулярную массу NaPi2b на 20 кДа (см. рис. 5, дорожки 3 и 7). Это означает, что восстанавливающий агент разрушает 2 дисульфидные связи в области большого ВКД, переводя тиоловые группы 4 остатков цистеина большого ВКД NaPi2b в восстановленную форму и высвобождая их для модификации mPEG-Mal-5000. В случае предварительной обработки клеток MPB, который связывается со свободными тиоловыми группами и делает их недоступными для химической модификации, с дальнейшим восстановлением дисульфидных связей и модификацией mPEG-Mal-5000, мы наблюдаем аналогичный сдвиг специфической полосы на 20 кДа (см. рис. 5, дорожки 4 и 8). Это подтверждает, что в области большого ВКД транспортера NaPi2b отсутствуют свободные тиоловые группы, а все 4 остатка

цистеина (C303, C322, C328 и C350) вовлечены в образование 2 дисульфидных связей.

Таким образом, полученные в ходе эксперимента данные указывают на то, что замена остатка пролина на остаток аланина в позиции 325 не нарушает формирование дисульфидных связей в большом ВКД NaPi2b. Все 4 остатка цистеина продолжают участвовать в образовании 2 дисульфидных связей, обеспечивающих стабильную конформацию большого ВКД NaPi2b.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе данной работы изучено влияние замены остатка пролина на остаток аланина в позиции 325 на способность МАТ L3(28/1) распознавать эпитоп MX35 в составе транспортера NaPi2b. Для этого проводили вестерн-блот-анализ и конфокальную микроскопию клеток OVCAR-8, стабильно экспрессирующих либо мутантную форму NaPi2b^{P325A}, либо транспортер дикого типа NaPi2b^{WT}. Кроме того, выполнено сравнение количества дисульфидных связей, формирующихся в большом ВКД NaPi2b^{P325A} и NaPi2b^{WT}.

Данные, полученные с использованием вестерн-блот-анализа и лазерной конфокальной микроскопии, свидетельствуют о том, что замена остатка пролина на остаток аланина в позиции 325 NaPi2b не оказывает влияния на эффективность распознавания эпитопа MX35 МАТ L3(28/1) (см. рис. 2 и 4). Количество дисульфидных связей в области большого ВКД NaPi2b^{P325A} и NaPi2b^{WT} также не различалось (см. рис. 5).

Таким образом, наше предположение о том, что остаток пролина в положении 325 играет ключевую роль в распознавании эпитопа MX35 МАТ за счет участия в формировании дисульфидной связи между остатками цистеина C322 и C328 в большом ВКД транспортера NaPi2b, не подтвердилось. Это может быть связано со многими причинами, включая необ-

ходимость использования более чувствительных методов анализа.

Результаты конфокальной микроскопии демонстрируют повышенное содержание NaPi2b^{p.P325A} в исследуемых клетках (см. рис. 3), однако снижение распознавания эпитопа MX35 в NaPi2b^{p.P325A} не было статистически значимым (см. рис. 4, б). Таким образом, можно говорить о тенденции к ухудшению распознавания антителами эпитопа MX35 NaPi2b^{p.P325A} по сравнению с NaPi2b^{WT}. Возможно, необходимо увеличить количество анализируемых клеток и данных для статистического анализа с помощью таких методов, как широкопольная флуоресцентная микроскопия, что позволит выявить значимые различия. Кроме того, отсутствие влияния замены p.P325A на распознавание эпитопа MX35 может быть обусловлено тем, что ключевую роль в доступности данного эпитопа играет не дисульфидная связь C322–C328, а связь C303–C350, которая, согласно данным литературы, может образоваться в области большого ВКД NaPi2b [11, 15].

Образование 2 дисульфидных связей как в NaPi2b^{p.P325A}, так и в NaPi2b^{WT} (см. рис. 5) позволяет предположить, что остаток пролина в положении 325 не влияет на количество образуемых дисульфидных связей в большом ВКД этого транспортера. Согласно ранее опубликованным данным, одиночные остатки пролина могут способствовать изгибам только в коротких полипептидных петлях, которые содержат от 2 до 10 аминокислотных остатков [24]. Поскольку большой ВКД NaPi2b состоит из 174 а.о. [11], можно предположить, что изгиб полипептидной петли в большом ВКД NaPi2b, предсказанный с использованием алгоритма AlphaFold DeepMind [15], зависит не только от присутствия остатка пролина в положении 325.

Необходимо учитывать, что на настоящий момент отсутствуют экспериментальные данные, однозначно указывающие на пары остатков цистеина, формирующих дисульфидные связи, необходимые для поддержания такой конформации большого ВКД NaPi2b, при которой эпитоп MX35 становится доступным для распознавания антителами в опухолевых клетках. В связи с этим выявленное отсутствие влияния мутации p.P325A на распознавание эпитопа MX35 может быть обусловлено тем, что остатки цистеина в позициях 322 и 328 не участвуют в формировании дисульфидной связи, обеспечивающей пространственную доступность эпитопа. Вместо этого они, вероятно, вовлечены в образование других дисульфидных связей, например C303–C322 и C328–C350. Данный вопрос остается нерешенным и требует дальнейших исследований.

Таким образом, хотя замена остатка пролина P325 не повлияла ни на распознавание эпитопа MX35 МАТ, ни на количество образуемых дисульфидных связей внутри большого ВКД, вопреки первоначальной гипотезе, полученные результаты вносят большой вклад

в понимание молекулярных механизмов, ответственных за поддержание конформационной стабильности большого ВКД NaPi2b. Кроме того, с учетом недавних разработок новых гуманизированных антител против NaPi2b [12, 25], для определения эффективности которых при карциномах яичника и легкого планируется провести доклинические и клинические испытания, важным направлением дальнейших исследований является анализ вклада других аминокислотных остатков в доступность эпитопа MX35 для антител. Целесообразно изучить наследственные мутации в участке гена *SLC34A2*, кодирующем область большого ВКД NaPi2b у пациентов с онкологическими заболеваниями, и оценить их влияние на распознавание эпитопа MX35 терапевтическими МАТ. Так, показано, что при аминокислотной замене p.T330V в белке NaPi2b эпитоп MX35 становится недоступным для распознавания соответствующими МАТ [26]. Это указывает на вероятность того, что больные с заменой p.T330V в транспортере NaPi2b могут быть нечувствительны к терапии на основе антител, нацеленных на эпитоп MX35. В связи с этим создание клеточных моделей, экспрессирующих различные мутантные формы NaPi2b, идентифицированные у онкологических пациентов, и последующее исследование доступности эпитопа MX35 в этих моделях представляют собой перспективные направления разработки прогностических инструментов для оценки эффективности таргетной терапии опухолей на основе антител против NaPi2b.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования установлено, что аминокислотная замена остатка пролина в позиции 325 транспортера NaPi2b не оказывает значимого влияния на распознавание эпитопа MX35 МАТ в области большого ВКД в опухолевых клетках карциномы яичника. Кроме того, выявлено, что в NaPi2b^{p.P325A} количество дисульфидных связей не изменяется по сравнению с NaPi2b^{WT}. Наблюдаемая тенденция к снижению доступности эпитопа MX35 для антител в живых клетках карциномы яичника может свидетельствовать о необходимости применения более высокочувствительных методов детекции, включая широкопольную флуоресцентную микроскопию.

Важным направлением будущих исследований также является изучение роли других аминокислотных остатков в доступности эпитопа MX35 транспортера NaPi2b для МАТ. Кроме того, полученные на примере NaPi2b данные позволят раскрыть механизмы образования опухоль-специфических эпитопов, доступных для распознавания антителами только в клетках опухолей, и проводить поиск подобных эпитопов для разработки высокоэффективных таргетных препаратов для улучшения диагностики и лечения онкологических заболеваний.

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

- Guo L., Wang S., Li M., Cao Z. Accurate classification of membrane protein types based on sequence and evolutionary information using deep learning. *BMC Bioinformatics* 2019;20:1–17. DOI: 10.1186/s12859-019-3275-6
- Krogh A., Larsson B., Von Heijne G., Sonnhammer E.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 2001;305(3):567–80. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4315
- Overington J.P., Al-Lazikani B., Hopkins A.L. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(12):993–6. DOI: 10.1038/nrd2199
- Forster I.C. The molecular mechanism of SLC34 proteins: insights from two decades of transport assays and structure-function studies. *Pflügers Arch* 2019;471(Pt 2):15–42. DOI: 10.1007/s00424-018-2207-z
- Bulatova L., Savenkova D., Nurgalieva A. et al. Toward a topology-based therapeutic design of membrane proteins: validation of NaPi2b topology in live ovarian cancer cells. *Front Mol Biosci* 2022;9:895911. DOI: 10.3389/fmolb.2022.895911
- Vlasenkova R., Nurgalieva A., Akberova N. et al. Characterization of SLC34A2 as a potential prognostic marker of oncological diseases. *Biomolecules* 2021;11(12):1878. DOI: 10.3390/biom11121878
- Soares I.C., Simões K., de Souza J.E.S. et al. *In silico* analysis and immunohistochemical characterization of NaPi2b protein expression in ovarian carcinoma with monoclonal antibody MX35. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012;20(2):165–72. DOI: 10.1097/pai.0b013e318228e232
- Kiyamova R., Shyian M., Lyzogubov V.V. et al. Immunohistochemical analysis of NaPi2b protein (MX35 antigen) expression and subcellular localization in human normal and cancer tissues. *Exp Oncol* 2011;33(3):157–61.
- Gryshkova V., Goncharuk I., Gurtovyy V. et al. The study of phosphate transporter NaPi2b expression in different histological types of epithelial ovarian cancer. *Exp Oncol* 2009;31(1):37–42.
- Rangel L.B.A., Sherman-Baust C.A., Wernyj R.P. et al. Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression. *Oncogene* 2003;22(46):7225–32. DOI: 10.1038/sj.onc.1207008
- Yin B.W.T., Kiyamova R., Chua R. et al. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas. *Cancer Immun* 2008;8:3.
- Horsley E., Jabeen A., Veillard N. et al. Preclinical development of NaPi2b-PL2202, a novel camptothecin-based antibody-drug conjugate targeting solid tumors expressing NaPi2b. *Cancer Res* 2024;84(6_Suppl):5085. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2024-5085
- Fessler S., Dirksen A., Collins S.D. et al. XMT-1592, a site-specific dolasynthen-based NaPi2b-targeted antibody-drug conjugate for the treatment of ovarian cancer and lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2020;80(16_Suppl):2894. DOI: 10.1158/1538-7445.am2020-2894
- Kiyamova R., Minigulova L.F., Skripova V. et al. N-glycosylation status of membrane phosphate transporter NaPi2b is crucial for its epitope recognition by monoclonal antibody in tumour cells. *Ann Oncol* 2020;31(5):S1227–8. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.08.2193
- Корогаева А.В., Булатова Л.Ф., Власенкова Р.А., Киямова Р.Г. Распознавание Na-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках бактерий и эукариот. *Биотехнология* 2022;38(5):66–72. Корогаева А.В., Булатова Л.Ф., Власенкова Р.А., Киямова Р.Г. Recognition of the Na-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies in bacterial and eukaryotic cells. *Biotechnologia* = *Biotechnology* 2022;38(5):66–72. (In Russ.). DOI: 10.56304/S023427582205009X
- Минигулова Л.Ф., Скрипова В.С., Нургуалиева А.К. и др. Распознавание натрийзависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами N-NaPi2b в клетках карциномы яичника. *Ученые записки Казанского университета* 2020;162(4):529–40. DOI: 10.26907/2542-064X.2020.4.529-540
- Minigulova L.F., Skripova V.S., Nurgalieva A.K. et al. Recognition of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies N-NaPi2b in ovarian cancer cells. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta* = *Academic notes of Kazan University* 2020;162(4):529–40. (In Russ.). DOI: 10.26907/2542-064X.2020.4.529-540
- Gryshkova V., Lituev D., Savinska L. et al. Generation of monoclonal antibodies against tumor-associated antigen MX35 sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b. *Hybridoma (Larchmt)* 2011;30(1):37–42. DOI: 10.1089/hyb.2010.0064
- Bulatova L.F., Skripova V.S., Nurgalieva A.K. et al. Structurally constrained tumor-specific epitope within the largest extracellular domain of sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b. *Ann Oncol* 2021;32(5):S368–9. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.08.304
- Булатова Л.Ф., Скрипова В.С., Коротаева А.В. и др. Распознавание мутантных форм натрийзависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках рака яичника. *Казанский медицинский журнал* 2022;103(4):608–16. DOI: 10.17816/KMJ2022-608
- Bulatova L.F., Skripova V.S., Korotaeva A.V. et al. Recognition of mutant forms of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies in ovarian cancer cells. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal* = *Kazan medical journal* 2022;103(4):608–16. (In Russ.). DOI: 10.17816/KMJ2022-608
- Nadeau V.G., Deber C.M. Structural impact of proline mutations in the loop region of an ancestral membrane protein. *Biopolymers* 2016;106(1):37–42. DOI: 10.1002/bip.22765
- Kiyamova R., Gryshkova V., Ovcharenko G. et al. Development of monoclonal antibodies specific for the human sodium-dependent phosphate co-transporter NaPi2b. *Hybridoma* 2008;27(4):277–84. DOI: 10.1089/hyb.2008.0015
- Boichuk S., Dunaev P., Skripova V. et al. Unraveling the mechanisms of sensitivity to anti-FGF therapies in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors (GIST) lacking secondary KIT mutations. *Cancers (Basel)* 2023;15(22):5354. DOI: 10.3390/cancers15225354
- McKinnon L.J., Fukushima J., Endow J.K. et al. Membrane chaperoning of a thylakoid protease whose structural stability is modified by the protonmotive force. *Plant Cell* 2020;32(5):1589–609. DOI: 10.1105/tpc.19.00797
- Krieger F., Möglich A., Kiefhaber T. Effect of proline and glycine residues on dynamics and barriers of loop formation in polypeptide chains. *J Am Chem Soc* 2005;127(10):3346–52. DOI: 10.1021/ja042798i
- Schmitt S., Mai I., Machui P. et al. TUB-040, a novel Napi2b-targeting ADC built with ethynylphosphonamidate conjugation chemistry, demonstrates high and long-lasting anti-tumor efficacy via Topoisomerase-I inhibition and excellent tolerability predictive of a wide therapeutic window in humans. *Cancer Res* 2024;84(6_Suppl):2622. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2024-2622
- Gryshkova V.S., Filonenko V.V., Kiyamova R.G. Inhibition of sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b function with MX35 antibody. *Biopolym Cell* 2011;27:193–8. DOI: 10.7124/bc.0000B9

Вклад авторов

Л.Ф. Булатова: разработка дизайна исследования, проведение экспериментов, анализ данных, написание текста статьи;
И.А. Слīdzюк, А.В. Килунов, В.С. Скрипова: проведение экспериментов, анализ данных;
Р.Г. Киямова: разработка концепции и дизайна исследования, анализ данных, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contributions

L.F. Bulatova: development of research design, conducting experiments, data analysis, article writing;
I.A. Slidziuk, A.V. Kilunov, V.S. Skripova: conducting experiments, data analysis;
R.G. Kiyamova: development of the research concept and design, data analysis, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID authors

Л.Ф. Булатова / L.F. Bulatova: <https://orcid.org/0000-0001-6696-8477>
И.А. Слīdzюк / I.A. Slidziuk: <https://orcid.org/0009-0001-6709-1010>
А.В. Килунов / A.V. Kilunov: <https://orcid.org/0009-0007-2262-4200>
В.С. Скрипова / V.S. Skripova: <http://orcid.org/0000-0002-6342-0390>
Р.Г. Киямова / R.G. Kiyamova: <https://orcid.org/0000-0002-2547-2843>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (грант № 23-15-00456, <https://rscf.ru/project/23-15-00456/>).

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation grant (grant No. 23-15-00456, <https://rscf.ru/project/23-15-00456/>).

Статья поступила: 28.10.2024. Принята к публикации: 28.04.2025. Опубликовано онлайн: 23.06.2025.

Article submitted: 28.10.2024. Accepted for publication: 28.04.2025. Published online: 23.06.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-89-103>

Влияние ингибитора обратной транскриптазы эфавиренза на индуцированную 5-азацитидином экспрессию длинных диспергированных повторов LINE1 и генетическую нестабильность в клетках острого миелоидного лейкоза

Х.М. Магомедова¹, И.А. Антонова¹, М.С. Стрелков^{1,2}, В.А. Нуртдинова¹, В.Т. Чешевик³, К.И. Кирсанов^{1,2}, Г.А. Белицкий¹, М.Г. Якубовская^{1,2}, О.А. Власова¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;

³УО «Полесский государственный университет»; Беларусь, 225710 Пинск, ул. Днепровской флотилии, 23

Контакты: Ольга Александровна Власова olya_vlasov@mail.ru, Марианна Геннадиевна Якубовская mgyakubovskaya@mail.ru

Введение. Использование гипометилирующих агентов в терапии острого миелоидного лейкоза позволило увеличить общую выживаемость пациентов на 12 %. Однако, наряду с мощным противоопухолевым эффектом, эти агенты оказывают негативное влияние на стабильность генома из-за транспозиции активированных LINE1, чем обусловлена малая продолжительность ремиссии. Поскольку для ретротранспозиции LINE1 необходима кодируемая ими обратная транскриптаза ORF2 LINE1, гомологичная ферменту ретровирусов, мы предложили использовать гипометилирующие агенты в комбинации с нуклеозидным ингибитором этого фермента, чтобы снизить генотоксическое действие 5-азацитидина.

Цель исследования – оценить влияние эфавиренза на эффекты 5-азацитидина в отношении культивируемых клеток острого миелоидного лейкоза: цитотоксическую активность, экспрессию длинных диспергированных повторов LINE1 и уровень генетической нестабильности.

Материалы и методы. Исследование проведено на клетках острого миелоидного лейкоза THP-1 и KG-1. В качестве гипометилирующих агентов и ингибитора обратной транскриптазы использованы 5-азацитидин и эфавиренз соответственно. Цитотоксическое действие препаратов и их комбинаций определяли с помощью резазуринового теста, долю апоптотических и некротических клеток оценивали с использованием проточной цитофлуориметрии, экспрессию LINE1 – с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для оценки уровня повреждения ДНК применяли метод ДНК-комет.

Результаты. Выявлено отсутствие влияния эфавиренза на цитотоксичность 5-азацитидина. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания 2-го кодируемого LINE1 белка – ORF1 – и проточной цитометрии продемонстрировано отсутствие воздействия эфавиренза на уровень экспрессии LINE1. В то же время данные теста ДНК-комет свидетельствуют о снижении генотоксического эффекта 5-азацитидина при его использовании в комбинации с эфавирензом.

Заключение. Результаты нашего исследования впервые показали перспективность развития нового подхода к терапии острого миелоидного лейкоза с использованием гипометилирующих агентов путем их комбинации с ингибиторами обратной транскриптазы.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, гипометилирующий агент, ингибитор обратной транскриптазы ретровирусов, длинные диспергированные повторы LINE1, 5-азацитидин, эфавиренз

Для цитирования: Магомедова Х.М., Антонова И.А., Стрелков М.С. и др. Влияние ингибитора обратной транскриптазы эфавиренза на индуцированную 5-азацитидином экспрессию длинных диспергированных повторов LINE1 и генетическую нестабильность в клетках острого миелоидного лейкоза. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(2):89–103.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-89-103>

Effect of the reverse transcriptase inhibitor efavirenz on 5-azacytidine-induced LINE1 long interspersed repeat expression and genetic instability in acute myeloid leukemia cells

K.M. Magomedova¹, I.A. Antonova¹, M.S. Strelkov^{1,2}, V.A. Nurtdinova¹, V.T. Cheshchevik³, K.I. Kirsanov^{1,2}, G.A. Belitsky¹, M.G. Yakubovskaya^{1,2}, O.A. Vlasova¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²RUDN University; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

³Polesky State University; 23 Dneprovskoy Flotilla St., Pinsk 225710, Belarus

Contacts: Olga Aleksandrovna Vlasova olya_vlasov@mail.ru, Marianna Gennadiyevna Yakubovskaya mgyakubovskaya@mail.ru

Introduction. The use of hypomethylating agents in the treatment of acute myeloid leukemia has increased overall patient survival by 12 %. However, alongside their potent antitumor effect, hypomethylating agents negatively impact genome stability due to the transposition of activated LINE1 elements, which contributes to the short duration of remission. Since LINE1 retrotransposition requires the ORF2-encoded reverse transcriptase, homologous to the retroviral enzyme, we proposed combining hypomethylating agents with a non-nucleoside inhibitor of this enzyme to reduce the genotoxic effects of 5-azacytidine.

Aim. To evaluate the effect of efavirenz on 5-azacytidine in cultured acute myeloid leukemia cells regarding: cytotoxic activity, expression of long interspersed nuclear elements (LINE1), the level of genetic instability.

Materials and methods. The study was conducted on THP-1 and KG-1 acute myeloid leukemia cell lines. 5-Azacytidine (hypomethylating agents) and efavirenz (reverse transcriptase inhibitor) were used. Cytotoxicity was assessed via the resazurin assay, apoptosis and necrosis rates were measured by flow cytometry, LINE1 expression was quantified using real-time polymerase chain reaction, and DNA damage was evaluated via the comet assay.

Results. Efavirenz did not affect the cytotoxicity of 5-azacytidine. Immunofluorescence staining of LINE1-encoded ORF1 protein and flow cytometry confirmed that efavirenz did not alter LINE1 expression levels. However, comet assay data indicated that combining 5-azacytidine with efavirenz reduced its genotoxic effects.

Conclusion. Our findings demonstrate, for the first time, the potential of a novel acute myeloid leukemia treatment strategy combining hypomethylating agents with reverse transcriptase inhibitors.

Keywords: acute myeloid leukemia, hypomethylating agent, retroviral reverse transcriptase inhibitor, long interspersed repeats LINE1, 5-azacytidine, efavirenz

For citation: Magomedova K.M., Antonova I.A., Strelkov M.S. et al. Effect of the reverse transcriptase inhibitor efavirenz on 5-azacytidine-induced LINE1 long interspersed repeat expression and genetic instability in acute myeloid leukemia cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(2):89–103. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-89-103>

ВВЕДЕНИЕ

Лечение пожилых пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) и миелодиспластическим синдромом представляет собой одну из наиболее сложных задач в онкогематологии [1, 2]. Эти заболевания системы крови наиболее распространены среди населения старше 60 лет [3]. Приобретенные в течение жизни сопутствующие заболевания приводят к невозможности применения интенсивной химиотерапии и трансплантации костного мозга у данной категории пациентов, что обуславливает низкий уровень их общей выживаемости. Существенный прогресс в лечении этих больных достигнут благодаря применению гипометилирующих препаратов (ГМА), первым среди которых был 5-азациитидин — аналог цитидина [2, 4]. Вследствие пиримидинового метаболизма 5-азациитидин перерабатывается в аналог дезоксицитидинтрифосфата (dCTP) Aza-dCTP, который встраивается в цепь ДНК и ковалентно захватывает самый важный эпигенетический регулятор — ДНК-метилтрансферазу 1 (DNMT1). При этом наблюдается снижение глобального метилирования ДНК, что приводит к активации

эпигенетически репрессированных генов определенных областей генома [5, 6].

Однако, как показали результаты исследований последних лет, применение 5-азациитидина вызывает активацию экспрессии более 2000 точек старта в некодирующей части генома, в том числе экспрессии повторяющихся последовательностей, к которым, в частности, относятся классы мобильных генетических элементов LINE (long interspersed nuclear elements), SINE (short interspersed nuclear elements) и эндогенные ретровирусы [7, 8]. Наиболее изученными и распространенными мобильными генетическими элементами в геномах млекопитающих являются LINE1, активация которых приводит к двум разнонаправленным эффектам. Увеличение экспрессии двунитевых транскриптов LINE1 приводит, во-первых, к активации интерферонового сигналинга 1-го типа и таким образом вносит вклад в противоопухолевый эффект препарата, а во-вторых, к повышению генетической нестабильности из-за транспозиции LINE1 и других транспозонов, что способствует опухолевой прогрессии и, соответственно, развитию рецидива заболевания [9].

В состав LINE1 входят 2 последовательности ORF (open reading frame), кодирующие белки шаперона (ORF1), эндонуклеазы и обратной транскриптазы (OT) (ORF2). Эффект ГМА, обусловленный транспозицией LINE1, опосредован действием функционально активной ORF2, которая гомологична соответствующему ферменту ретровирусов.

К настоящему времени разработаны и успешно применяются в терапии пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), ингибиторы ОТ ретровирусов [10]. Одним из препаратов, одобренных в 1998 г. для использования в клинической практике, является антиретровирусный препарат эфавиренз — нуклеозидный ингибитор ОТ (NNRTI) [11]. Мы предположили, что использование 5-азациитидина в комбинации с эфавирензом позволит снизить генотоксичность терапии без влияния на активацию LINE1.

Цель исследования — оценить влияние эфавиренза на цитотоксическую активность 5-азациитидина в отношении культивируемых клеток ОМЛ, индуцированную 5-азациитидином экспрессию длинных диспергированных повторов LINE1 и уровень генетической нестабильности в клетках ОМЛ, обработанных 5-азациитидином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Использованы 5-азациитидин (Sigma Aldrich (Merck), Индия, A2385-100MG), резазурина натриевая соль («ЛенРеактив», Россия, 163004), ExtractRNA («Евроген», Россия, BC032), ОТ вируса лейкемии мышей (MMLV-RT, «Евроген», Россия, SK022L), случайные гексануклеотидные праймеры Random(dN)₁₀ («Евроген», Россия, SB002), эфавиренз (CaymanChemical, США, 14412), фосфатно-солевой буфер (PBS) (Servicebio, Китай, G4207-500ML), TopVision Low Melting Point Agarose (ThermoFisherScientific, Германия, R0801), Na₂EDTA («ПанЭко», Россия, Эл075), борная кислота («ПанЭко», Россия, Эл070), Tris Base («ПанЭко», Россия, X270), Tris-HCl («ПанЭко», Россия, X280), NaCl («Пушинские лаборатории», Россия, PL-0773), NaOH («Пушинские лаборатории», Россия, PL-0761), SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, США), 3,7 % раствор формальдегида («ХимМед», Россия, CS-T-55012), 0,3 % Triton X-100 (Macklin, Китай, T6328-500mL), Mouse Monoclonal H2A.X phospho S139 antibody (Abcam, Ирландия, cat# ab26350), Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (Abcam, Ирландия, cat# ab150105), DAPI (Sigma Aldrich (Merck), Индия, D9542), Mowiol® 4-88 (Sigma Aldrich (Merck), Индия, 81381).

Клеточные линии. Клеточные линии ОМЛ ТНР-1 и KG-1 получены из коллекции клеток Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Клетки культивировали в питательной среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 150 мг/мл L-глутамина, 50 ЕД/мл

пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) и 10 % (для ТНР-1) и 20 % (для KG-1) эмбриональной бычьей сыворотки («ПанЭко», Россия). Клетки инкубировали при 37 °С и 5 % CO₂. Проверку на отсутствие микоплазмы проводили с помощью профилирования STR.

Измерение жизнеспособности клеток острого миелоидного лейкоза. Клетки линий ОМЛ высевали в 96-луночные планшеты в ранее подобранных количествах (для ТНР-1 — 37,5 тыс. клеток/мл, для KG-1 — 150 тыс. клеток/мл) в 180 мкл среды. Далее их обрабатывали 5-азациитидином и/или эфавирензом общим объемом 20 мкл и инкубировали 72 ч с 5-азациитидином в максимальной конечной концентрации 100 мкМ с пошаговым уменьшением концентрации в 1,5 раза; эфавиренз добавляли в концентрации 50 мкМ как для ТНР-1, так и для KG-1. Жизнеспособность клеток анализировали на основе метаболической активности с добавлением 0,177 мг/мл резазурина за 8–10 ч до окончания времени инкубации. Результаты в виде интенсивности сигнала флуоресценции считывали на микропланшетном флуориметре Fluoroskan FL (Thermo Scientific, США).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Клетки ТНР-1 высевали в количестве 100 тыс. клеток/мл в 24-луночных планшетах и инкубировали в течение 120 ч с ГМА в различных концентрациях. По прошествии 72 ч обновляли питательную среду с добавлением 50 % концентрации ГМА. Тотальную РНК экстрагировали реагентом ExtractRNA согласно протоколу производителя («Евроген», Россия). Общий пул РНК (1 мкг как из необработанных, так и из обработанных противоопухолевыми препаратами клеток) подвергали ОТ с использованием MMLV-RT и случайных гексануклеотидных праймеров в 20 мкл реакционной смеси в соответствии с протоколом производителя («Евроген», Россия). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени проводили по стандартному протоколу с использованием 5 пар праймеров к 4 ампликонам (некодирующим последовательностям LINE1), а также гену *ORF1 LINE1* (табл. 1).

Каждая ПЦР основана на 5 нг ДНК, 1х ПЦР-буфере, 0,3 мМ dNTP, 3 мМ MgCl₂, 0,2 ед. ДНК-полимеразы Syn Taq и 0,2 мкМ прямого и обратного праймеров в объеме реакционной смеси 25 мкл. ПЦР проводили с помощью системы CFX96 Touch™ (Bio-Rad Laboratories, #1855201, Россия) по протоколу: начальный этап денатурации путем нагревания при 95 °С в течение 5 мин, затем 40 циклов по 15 с денатурации (при 95 °С), 20 с при соответствующей температуре (в зависимости от значений T_m используемого праймера) и элонгация — 25 с при 72 °С. Экспрессию интересующего фрагмента LINE1 нормализовали по конститутивно экспрессируемым генам домашнего хозяйства *RPL₀* и *GAPDH*. Последовательности используемых праймеров представлены в табл. 1. Относительный уровень экспрессии рассчитывали для каждого

Таблица 1. Последовательности праймеров, используемых для амплификации фрагментов длинных диспергированных повторов LINE1

Table 1. Sequences of primers used to amplify fragments of long interspersed repeats LINE1

Амплифицируемый фрагмент Amplified fragment	Последовательность праймера Primer sequence	
	прямого (3' → 5') forward (3' → 5')	обратного (3' → 5') reverse (3' → 5')
LINE1 set1	GCCAAGATGGCCGAATAGGA	AAATCACCCGTCTTCTGCGT
LINE1 set2	CGAGATCAAAGTCAAGGCG	CCGGCCGCTTTGTTTACCTA
LINE1 set3	TAAACAAAGCGGCCGGGAA	AGAGGTGGAGCCTACAGAGG
LINE1 set4	AGAGAGCAGTGGTTCTCCCA	CAGTCTGCCCCGTTCTCAGAT
LINE1 set5 (ORF1)	ACCTGAAAGTGACGGGGAGA	CCTGCCTTGCTAGATTGGGG
RPL0	CCTTCTCCTTTGGGCTGGTCATCCA	CAGACACTGGCAACATTGCGGACAC
GAPDH	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

образца методом 2- $\Delta\Delta C_t$. Проводили не менее 5 биологических повторов на каждую точку.

Анализ активации экспрессии LINE1, индуцированной 5-азациитидином и эфавирензом, с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к ORF1 LINE1 и последующей проточной цитометрии. Для анализа активации экспрессии LINE1, индуцированной 5-азациитидином и эфавирензом, клетки ОМЛ высевали в 6-луночные планшеты (10^5 клеток на лунку в 2 мл RPMI). Клетки обрабатывали интересующими соединениями в нетоксичных концентрациях и инкубировали в течение 72 ч. Затем промывали 3 раза PBS и фиксировали в холодном 4 % параформальдегиде в течение 15 мин. После следующих 3 промывок PBS их пермеабелизировали холодным 0,3 % Triton-X100 в течение 7 мин и блокировали бычьим сывороточным альбумином в течение 1 ч. Клетки были иммунофлуоресцентно окрашены антителами к LINE1-ORF1, последующее связывание со вторичными антителами AlexaFluor488 проводили в темноте. Клетки промыты PBS и проанализированы на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, США). Оценивали долю клеток с высокоинтенсивным флуоресцентным сигналом и среднюю интенсивность флуоресценции клеток, нормализованную по отношению к контролю. Полученные данные проанализированы с помощью программного обеспечения Win-List™ 3D (версия 9.0.1, Verity Software House, США, <https://www.vsh.com/products/winlist/index.asp>).

Анализ количества апоптотических и некротических клеток с помощью двойного окрашивания аннексин-FITC/пропидий йодид и последующего анализа на проточном цитометре. Клетки окрашивали аннексином V-FITC и PI для оценки апоптоза методом проточной

цитометрии в соответствии с инструкциями производителя для обнаружения апоптоза FITC Annexin V (Sigma-Aldrich, США). Клетки обрабатывали нетоксичными концентрациями 5-азациитидина и эфавиренза в течение 72 ч. После этого их собирали, дважды промывали ледяным PBS и ресуспендировали в 0,5 мл раствора аннексин/V-FITC/PI в течение 30 мин в темноте в соответствии с протоколом производителя. После окрашивания при комнатной температуре клетки анализировали с помощью проточного цитометра BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, США). Для каждого образца проанализированы 10 000 событий и проведена количественная оценка клеток с высокоинтенсивным флуоресцентным сигналом по FITC и/или PI с использованием программного обеспечения WinList™ 3D (версия 9.0.1, Verity Software House, США, <https://www.vsh.com/products/winlist/index.asp>).

Метод ДНК-комет. Клетки линий ТНР-1 и КГ-1 высевали по 100 тыс. клеток/мл в 6-луночных планшетах и инкубировали в течение 120 ч с 5-азациитидином в диапазоне концентраций от 0,5 до 20 мкМ для ТНР-1 и от 0,12 до 8,5 мкМ для КГ-1 с 20 мкМ эфавирензом или без него. По прошествии 72 ч обновляли питательную среду с добавлением 50 % концентрации 5-азациитидина и эфавиренза. Важными данными, получаемыми при проведении теста ДНК-комет, являются характеристики «хвоста кометы», соответствующие доле поврежденной ДНК. «Хвост кометы» представляет собой фракцию относительно низкомолекулярной ДНК, образовавшейся в результате появления двух- и одноцепочечных разрывов в высокомолекулярной хромосомной ДНК. «Момент хвоста» рассчитывается по формуле:

«Момент хвоста» = % ДНК в «хвосте» × длина «хвоста».

Показателем генотоксического действия является индекс повреждения (ИП), который вычисляли по формуле:

$$\text{ИП} = \frac{\text{«Момент хвоста» в обработанных клетках}}{\text{«Момент хвоста» в контрольных клетках}}.$$

Значение ИП >2 указывает на то, что исследуемое соединение обладает генотоксическими свойствами. Для статистического анализа различий величины «момента хвоста» использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса.

Клеточную суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин. Осадок промывали PBS и повторяли процедуру центрифугирования, далее осадок ресуспендировали в PBS из расчета 10 тыс. клеток/мл. Полученную суспензию смешивали с предварительно нагретой агарозой с низкой температурой плавления в соотношении 1:8 по объему, тщательно перемешивали и наносили 40 мкл суспензии на 20-луночное предметное стекло. После затвердевания стекла погружали в 25 мл холодного лизирующего раствора (10 mM Tris HCl; pH 10; 2,5 M NaCl; 100 mM Na₂EDTA) и инкубировали 90 мин при 4 °C. После окончания инкубации лизирующий раствор аспирировали, слайды заливали 25 мл холодного щелочного раствора (500 mM Na₂EDTA, pH 8; 300 mM NaOH, pH >13) и инкубировали 30 мин при 4 °C. После лизиса слайды промывали TBE (Tris Base, Na₂EDTA, борная кислота), помещали в горизонтальную электрофорезную камеру, заполненную холодным TBE, и проводили электрофорез (1 В/см, 20 мин). Далее стекла промывали в дистиллированной воде 2 раза по 5 мин. Для дегидратации минигелей слайды помещали в 70 % этанол на 5 мин. После сушки на воздухе все образцы окрашивали красителем ДНК SYBR Gold для подсчета. Процент ДНК в «хвосте» подсчитывали с помощью программного обеспечения Comet Scoring Freeware

(Version 2.0.0.0; <http://rexhooover.com/>). Для анализа взято не менее 100 клеток на каждую точку.

Статистическая обработка данных. Эксперименты выполнены минимум в 2 биологических повторах. Средние значения и средние квадратичные отклонения рассчитывали с помощью пакетов программ Microsoft Excel, OriginLab и GraphPad Prism. Сравнение данных экспериментальной и контрольных групп проведено с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорного теста Даннетта. Различия между группами считались значимыми при значении $p < 0,05$.

Основой статистической обработки результатов для определения наличия статистически значимых различий между несколькими группами для одной независимой переменной являются случайность выборок, равенство размера выборки и нормальность распределений использованных выборок. Нормальность распределения данных оценивали с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Статистический анализ проводили с использованием программного решения GraphPad Prism 8.3.0 (GraphPad Software Inc., США). Для теста ДНК-комет значимость различий между контрольными необработанными клетками и клетками, обработанными 5-азациитидином и эфавирензом, определялась с помощью теста ANOVA (непараметрический критерий Краскела–Уоллиса) и апостериорного теста Даннетта.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние эфавиренза на цитотоксическую активность 5-азациитидина в отношении культивируемых клеток острого миелоидного лейкоза. При проведении сравнительной оценки уровней цитотоксичности 5-азациитидина с эфавирензом и без него в отношении клеток линий ОМЛ человека (KG-1 и THP-1) использован резазуриновый тест (рис. 1).

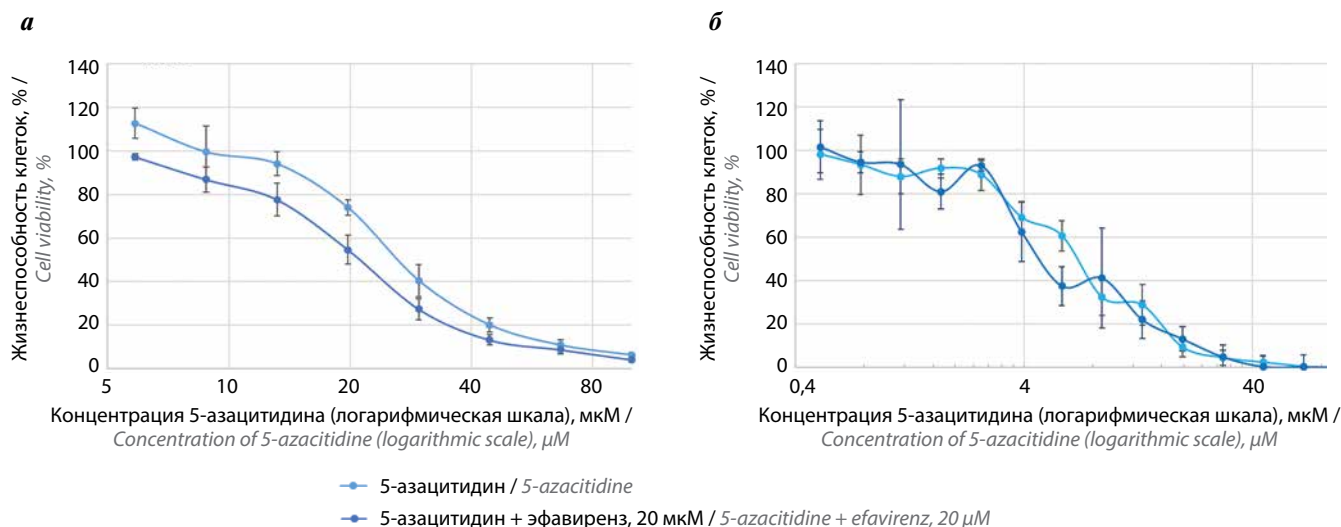


Рис. 1. Зависимость жизнеспособности клеток от концентраций 5-азациитидина на клеточных линиях THP-1 (а) и KG-1 (б) в присутствии и в отсутствие эфавиренза

Fig. 1. The dependence of cell viability on the concentration of 5-azacytidine on THP-1 (a) and KG-1 (b) cell lines in the presence and absence of efavirenz

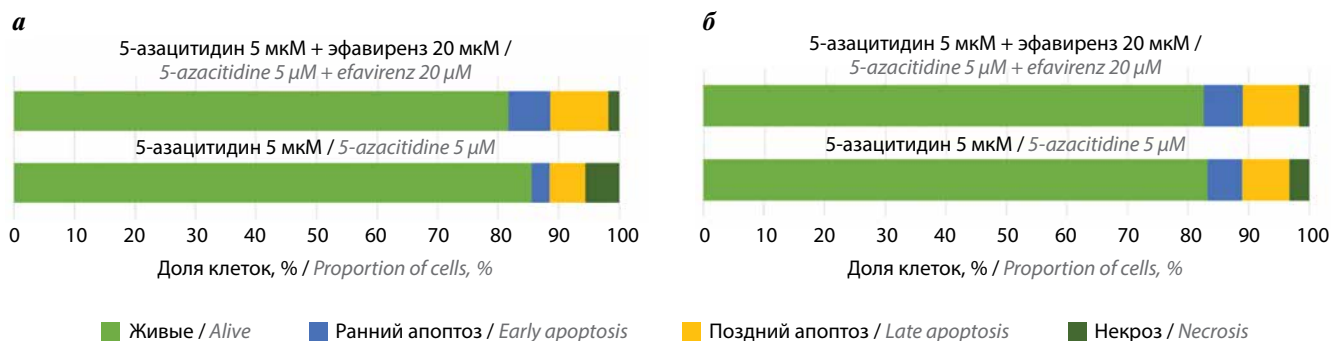


Рис. 2. Распределение популяции клеток на живые, апоптотические и некротические под действием комбинации 5-азацитидина и эфавиренза в нетоксичных концентрациях: а – клеточная линия ТНР-1; б – клеточная линия КГ-1

Fig. 2. Distribution of the cell population into live, apoptotic and necrotic cells under the influence of a combination of 5-azacytidine and efavirenz at non-toxic concentrations: а – THP-1 cell line; б – KG-1 cell line

При этом эфавиренз использовали в нетоксичной для данных клеточных линий концентрации 20 мкМ (данные не представлены). На клеточной линии ТНР-1 добавление эфавиренза несколько снижало жизнеспособность клеток при всех исследуемых концентрациях 5-азацитидина. На клеточной линии КГ-1 экспериментальные кривые по жизнеспособности клеток при воздействии 5-азацитидина в присутствии и в отсутствие эфавиренза неоднократно пересекались. Это указывает на то, что при воздействии эфавиренза жизнеспособность клеток, обработанных 5-азацитидином, не подвергалась значительным изменениям.

На основе полученных экспериментальных кривых для последующего анализа выбраны следующие нетоксичные концентрации 5-азацитидина: 5 мкМ для клеточной линии ТНР-1 и 0,5 мкМ для клеточной линии КГ-1.

Проанализировано влияние нетоксичных концентраций 5-азацитидина на долю жизнеспособных клеток при добавлении эфавиренза в концентрации 20 мкМ с помощью определения доли клеток с маркерами раннего и позднего апоптоза и некроза. В обеих клеточных линиях эфавиренз не оказывал статистически значимого влияния на жизнеспособность опухолевых клеток (рис. 2).

Влияние эфавиренза на индуцированную 5-азацитидином экспрессию LINE1. Для анализа изменения уровня экспрессии ретротранспозонов в клеточных линиях ОМЛ человека использованы 2 альтернативных подхода, один из которых – анализ активации экспрессии длинных диспергированных повторов 5-азацитидином с помощью ПЦР в реальном времени с применением 5 пар праймеров к 4 ампликонам (некодирующим последовательностям LINE1), а также к гену *ORF1 LINE1*.

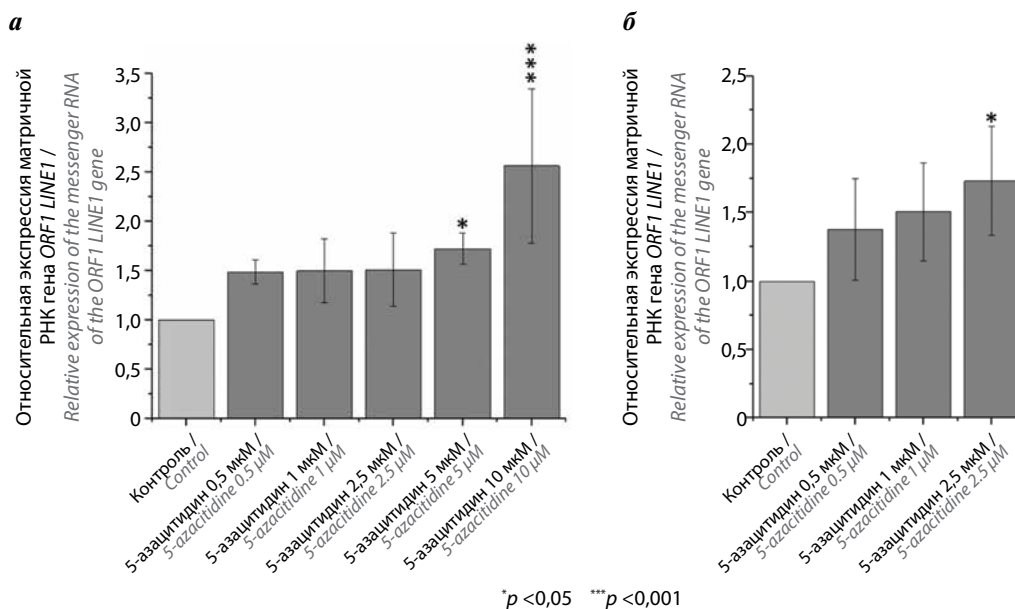


Рис. 3. Относительная экспрессия гена *ORF1 LINE1* на клеточных линиях острого миелоидного лейкоза под действием 5-азацитидина, среднее значение $\pm$ стандартное отклонение: а – клеточная линия ТНР-1; б – клеточная линия КГ-1. Статистическая обработка проведена с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA)

Fig. 3. Relative expression of the *ORF1 LINE1* gene under the influence of 5-azacytidine in acute myeloid leukemia cell lines, mean $\pm$ standard deviation: а – THP-1 cell line; б – KG-1 cell line. Statistical processing was performed using univariate analysis of variance (ANOVA)

Таблица 2. Уровень экспрессии ампликонов *LINE1* при обработке клеток 5-азациитидином в концентрациях 5 мкМ (THP-1) и 0,5 мкМ (KG-1)

Table 2. *LINE1* amplicon expression levels in cells treated with 5-azacytidine at concentrations of 5 μ M (THP-1) and 0.5 μ M (KG-1)

Клеточная линия Cell line	Ампликон <i>LINE1</i> <i>LINE1</i> amplicon				
	1	2	3	4	ORF1
THP-1	—	+	+	+	+
KG-1	—	—	+	+	—

Результаты ПЦР-анализа продемонстрировали повышение уровня экспрессии гена *ORF1 LINE1* транспозона *LINE1* и других ампликонов *LINE1*, что свидетельствует о целесообразности оценки уровня экспрессии белка ORF1 в популяциях обработанных и необработанных клеток, окрашенных антителами к ORF1 *LINE1*, с помощью проточной цитометрии (рис. 3, табл. 2).

Под действием ГМА 5-азациитидина мы наблюдали дозозависимое увеличение средней интенсивности флуоресценции клеток, которая ассоциирована с количеством белка ORF1 *LINE1*, причем для клеточной линии THP-1 при его концентрации 5 мкМ и выше увеличение этого показателя было статистически значимым (рис. 4, а, б). Эфавиренз снижал экспрессию

белка ORF1 *LINE1*, однако различия не были статистически значимы относительно необработанных клеток (рис. 4, в).

Влияние эфавиренза на генотоксический эффект 5-азациитидина в клетках THP-1 и KG-1. Для оценки повреждений ДНК под действием гипометилирующих препаратов на клеточных линиях THP-1 и KG-1 использован метод ДНК-комет.

В контрольных клетках, не подвергавшихся обработке, «момент хвоста» для THP-1 составил $1,14 \pm 0,33$ %, для KG-1 — $1,12 \pm 0,2$ %. В клетках, инкубированных в течение 24 ч с ифосфамидом в дозе 5 мг/мл для THP-1 и 4 мг/мл для KG-1, «момент хвоста» оказался равен $4,31 \pm 1,28$ и $4,02 \pm 0,47$ % соответственно, что под-

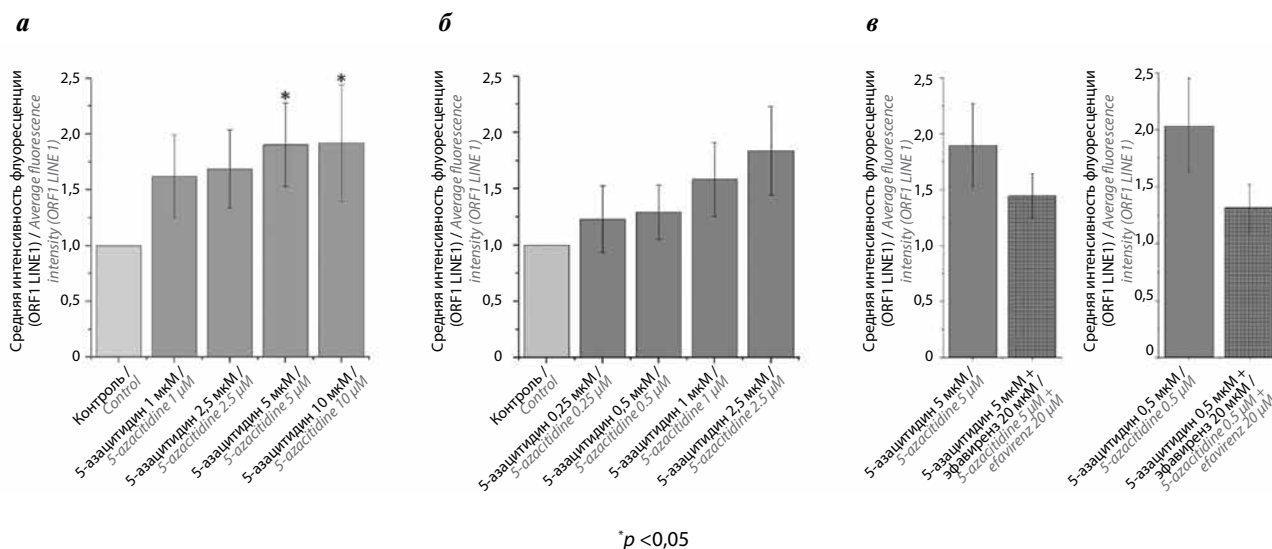


Рис. 4. Влияние гипометилирующего препарата 5-азациитидин на экспрессию белка ORF1 *LINE1* в клетках линии острого миелоидного лейкоза, среднее значение $\pm$ стандартное отклонение: а — клеточная линия THP-1; б — клеточная линия KG-1; в — в присутствии ингибитора обратной транскриптазы вирусов эфавиренза. Статистическая обработка проведена с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA)

Fig. 4. Effect of the hypomethylating drug 5-azacytidine on the expression of the ORF1 *LINE1* protein in acute myeloid leukemia cell lines, mean $\pm$ standard deviation: а — THP-1 cell line; б — KG-1 cell line; в — in the presence of the viral reverse transcriptase inhibitor efavirenz. Statistical processing was performed using univariate analysis of variance (ANOVA)

Таблица 3. Уровень повреждений ДНК клеток ТНР-1 при обработке 5-азациитидином по данным теста ДНК-комет
Table 3. The level of DNA damage in THP-1 cells during treatment with 5-azacytidine according to the DNA comet assay

Группа Group	«Момент хвоста», медиана (Q ₂₅ ; Q ₇₅) “Tail moment”, median (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	Индекс повреждения Damage index
Контроль Control	1,14 ± 0,330 (0,000; 1,714)	—
Ифосфамид 5 мг/мл Ifosfamide 5 mg/ml	4,31 ± 1,281**** (0,06045; 4,295)	3,78
5-азациитидин 20 мкМ 5-azacytidine 20 μM	2,66 ± 0,656**** (0,008144; 2,839)	2,33
5-азациитидин 10 мкМ 5-azacytidine 10 μM	2,46 ± 0,355* (1,500e-005; 3,026)	2,16
5-азациитидин 5 мкМ 5-azacytidine 5 μM	1,89 ± 0,649*** (0,0005815; 2,673)	1,66
5-азациитидин 2 мкМ 5-azacytidine 2 μM	1,25 ± 0,204 (0,000; 1,647)	1,09

* $p \leq 0,05$. *** $p \leq 0,001$. **** $p \leq 0,0001$.

Примечание. Звездочками обозначены статистически значимые различия относительно группы 5-азациитидина. Здесь и в табл. 4–6: Q₂₅ – 25-й квартиль; Q₇₅ – 7-й квартиль.

Note. The asterisks indicate statistically significant differences relative to the 5-azacytidine group. Here and in tables 4–6: Q₂₅ – the 25th quartile; Q₇₅ – the 7th quartile.

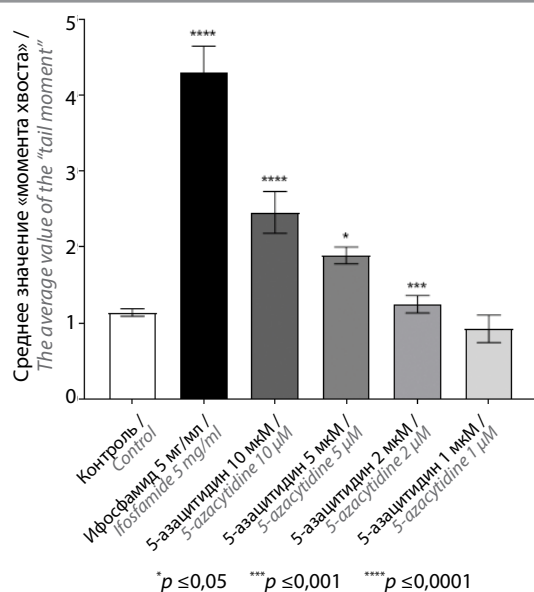


Рис. 5. Повреждения ДНК клеток ТНР-1 при обработке 5-азациитидином в ходе теста ДНК-комет. Нормальность распределения значений определяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Значимость различий между клетками, обработанными 5-азациитидином и не обработанными им, оценивали с использованием теста ANOVA (непараметрический критерий Краскела–Уоллиса) и апостериорного теста Даннетта

Fig. 5. DNA damage in THP-1 cells treated with 5-azacytidine in the DNA comet assay. Normality of distribution of values was determined by the Kolmogorov–Smirnov test. The significance of differences between control untreated cells and cells treated with 5-azacytidine was determined using the ANOVA test (nonparametric Kruskal–Wallis test) and Dunnett’s post hoc test

тверждает генотоксические свойства ифосфамида, проявляемые в клетках человека, и обосновывает его использование в качестве положительного контроля. Для клеток ТНР-1, обработанных 5-азациитидином, показано, что уже при нетоксичной концентрации 5 мкМ происходит существенный рост величины «момента хвоста» относительно необработанных клеток. Доля повреждений ДНК в клетках после инкубации с эфавирензом статистически не отличалась от доли повреждений в группе отрицательного контроля, что свидетельствует об отсутствии повреждений ДНК под действием данного препарата в исследуемых клеточных линиях (табл. 3, рис. 5).

При обработке клеток ТНР-1 нетоксичной концентрацией 5-азациитидина (5 мкМ) добавление эфавиренза вызывает значительное понижение количества повреждений ДНК (в среднем в 2,7 раза) (табл. 4, рис. 6).

Для клеток KG-1, обработанных 5-азациитидином, показано, что уже при нетоксичной концентрации 0,25 мкМ происходит существенный рост величины «момента хвоста» относительно необработанных клеток (табл. 5, рис. 7).

При обработке клеток KG-1 нетоксичной концентрацией 5-азациитидина (0,5 мкМ) эфавиренз вызывал значительное уменьшение количества повреждений ДНК (в среднем в 2 раза) (табл. 6, рис. 8).

Таблица 4. Уровень повреждений ДНК клеток ТНР-1 при обработке 5-азациитидином в комбинации с эфавирензом по данным теста ДНК-комет

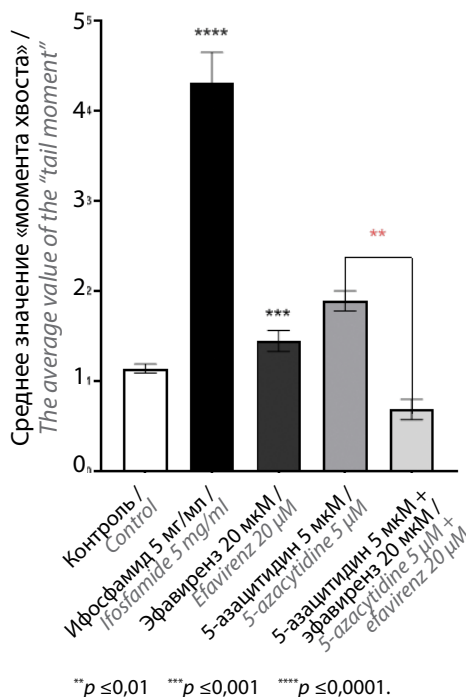
Table 4. The level of DNA damage in THP-1 cells during treatment with 5-azacytidine in combination with efavirenz according to the DNA comet assay

Группа Group	«Момент хвоста», медиана (Q_{25} ; Q_{75}) “Tail moment”, median (Q_{25} ; Q_{75})	Индекс повреждения Damage index
Без обработки (контроль) Without treatment (control)	$1,14 \pm 0,330$ (0,000; 1,714)	—
Ифосфамид 5 мг/мл Ifosfamide 5 mg/ml	$4,31 \pm 1,281^{****}$ (0,06045; 4,295)	3,78
Эфавиренз 50 мкМ Efavirenz 50 μ M	$1,45 \pm 0,498$ (0,002182; 1,909)	1,27
5-азациитидин 5 мкМ 5-azacytidine 5 μ M	$1,89 \pm 0,649^{***}$ (0,0005815; 2,673)	1,66
5-азациитидин 5 мкМ + эфавиренз 20 мкМ 5-azacytidine 5 μ M + efavirenz 20 μ M	$0,69 \pm 0,068^{**}$ (0,00007; 0,8954)	0,60

$^{**}p \leq 0,01$. $^{***}p \leq 0,001$. $^{****}p \leq 0,0001$.

Примечание. Звездочками обозначены статистически значимые различия относительно группы 5-азациитидина (5 мкМ).

Note. The asterisks indicate statistically significant differences relative to the 5-azacytidine group (5 μ M).



$^{**}p \leq 0,01$ $^{***}p \leq 0,001$ $^{****}p \leq 0,0001$.

Рис. 6. Повреждения ДНК клеток ТНР-1 при обработке 5-азациитидином и эфавирензом в монорежиме или в комбинации в ходе теста ДНК-комет. Нормальность распределения значений определяли с помощью критерия Колмогорова—Смирнова. Значимость различий между необработанными клетками и клетками, обработанными 5-азациитидином и эфавирензом, оценивали с использованием теста ANOVA (непараметрический критерий Краскала—Уоллиса) и апостериорного теста Даннетта. Черными звездочками обозначены статистически значимые различия относительно группы контроля, красными — различия между группами 5-азациитидина в комбинации с эфавирензом и 5-азациитидина

Fig. 6. DNA damage in THP-1 cells treated with 5-azacytidine and efavirenz alone or in combination in the DNA comet assay. Normality of distribution of values was determined by the Kolmogorov—Smirnov test. The significance of differences between control untreated cells and cells treated with 5-azacytidine and efavirenz was determined using the ANOVA test (nonparametric Kruskal—Wallis test) and Dunnett's post hoc test. The black asterisks indicate statistically significant differences relative to the control group, the red ones indicate the difference between the 5-azacytidine group in combination with efavirenz relative to the 5-azacytidine group

Таблица 5. Уровень повреждений ДНК клеток KG-1 при обработке 5-азациитидином по данным теста ДНК-комет
Table 5. The level of DNA damage in KG-1 cells during treatment with 5-azacytidine according to the DNA comet assay

Группа Group	«Момент хвоста», медиана (Q ₂₅ ; Q ₇₅) “Tail moment”, median (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	Индекс повреждения Damage index
Контроль Control	1,12 ± 0,197 (0,000; 1,524)	—
Ифосфамид 4 мг/мл Ifosfamide 4 mg/ml	4,02 ± 0,468**** (0,000004; 5,414)	3,59
5-азациитидин 8,5 мкМ 5-azacytidine 8.5 μM	5,43 ± 1,376**** (0,04131; 7,379)	4,85
5-азациитидин 5 мкМ 5-azacytidine 5 μM	3,22 ± 0,904**** (0,003877; 3,952)	2,88
5-азациитидин 2,5 мкМ 5-azacytidine 2.5 μM	2,70 ± 0,714**** (0,002830; 3,917)	2,41
5-азациитидин 1 мкМ 5-azacytidine 1 μM	2,59 ± 0,506**** (3,550e-005; 3,611)	2,31
5-азациитидин 0,5 мкМ 5-azacytidine 0.5 μM	2,08 ± 0,293* (0,000; 2,533)	1,86
5-азациитидин 0,25 мкМ 5-azacytidine 0.25 μM	1,61 ± 0,417* (0,000006; 2,030)	1,44
5-азациитидин 0,12 мкМ 5-azacytidine 0.12 μM	1,26 ± 0,039 (0,000; 1,239)	1,13

* $p \leq 0,05$. **** $p \leq 0,0001$.
Примечание. Звездочками обозначены статистически значимые различия относительно группы 5-азациитидина.
Note. The asterisks indicate statistically significant differences relative to the 5-azacytidine group.

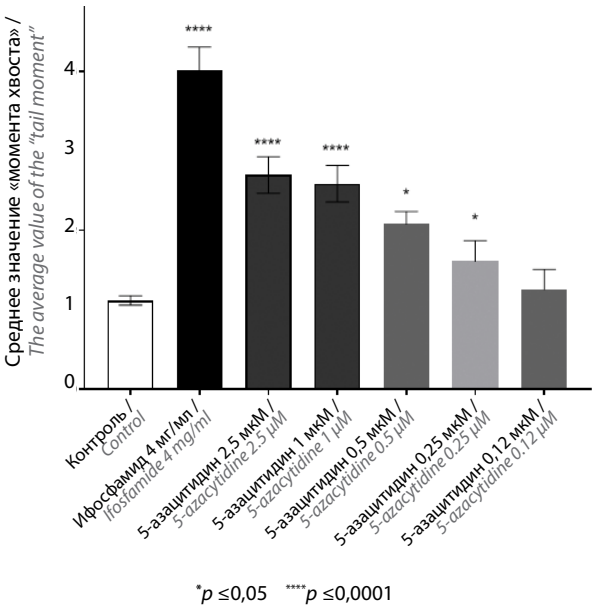


Рис. 7. Повреждения ДНК клеток KG-1 при обработке 5-азациитидином в ходе теста ДНК-комет. Нормальность распределения значений определяли с использованием критерия Колмогорова—Смирнова. Значимость различий между клетками, не обработанными и обработанными 5-азациитидином, оценивали с помощью теста ANOVA (непараметрический критерий Краскела—Уоллиса) и апостериорного теста Даннетта
Fig. 7. DNA damage in KG-1 cells treated with 5-azacytidine in the DNA comet assay. Normality of distribution of values was determined by the Kolmogorov—Smirnov test. The significance of differences between control untreated cells and cells treated with 5-azacytidine was determined using the ANOVA test (nonparametric Kruskal—Wallis test) and Dunnett's post hoc test

Таблица 6. Уровень повреждений ДНК клеток KG-1 при обработке 5-азациитидином в комбинации с эфавирензом по данным теста ДНК-комет

Table 6. The level of DNA damage in KG-1 cells during treatment with 5-azacytidine in combination with efavirenz according to the DNA comet assay

Группа Group	«Момент хвоста», медиана (Q_{25} ; Q_{75}) “Tail moment”, median (Q_{25} ; Q_{75})	Индекс повреждения Damage index
Контроль Control	$1,12 \pm 0,197$ (0,000; 1,524)	—
Ифосфамид 4 мг/мл Ifosfamide 4 mg/ml	$4,02 \pm 0,468^{****}$ (0,000004; 5,414)	3,59
Эфавиренз 50 мкМ Efavirenz 50 μ M	$1,01 \pm 0,0001$ (0,000; 0,7622)	0,90
5-азациитидин 0,5 мкМ 5-azacytidine 0.5 μ M	$2,08 \pm 0,293^*$ (0,000; 2,533)	1,86
5-азациитидин 0,5 мкМ + эфавиренз 20 мкМ 5-azacytidine 0.5 μ M + efavirenz 20 μ M	$1,03 \pm 0,0002^{****}$ (0,000; 0,7717)	0,92

* $p \leq 0,05$. **** $p \leq 0,0001$.

Примечание. Звездочками обозначены статистически значимые различия относительно группы 5-азациитидина (0,5 мкМ).

Note. The asterisks indicate statistically significant differences relative to the 5-azacytidine group (0.5 μ M).

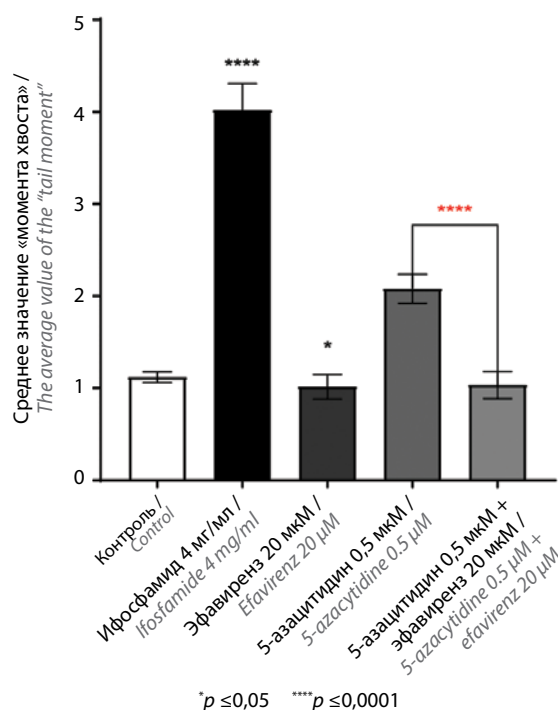


Рис. 8. Повреждения ДНК клеток KG-1 при обработке 5-азациитидином в комбинации с эфавирензом в ходе теста ДНК-комет. Нормальность распределения значений определяли по критерию Колмогорова—Смирнова. Значимость различий между клетками, не обработанными и обработанными 5-азациитидином, оценивали с помощью теста ANOVA (непараметрический критерий Краскела—Уоллиса) и апостериорного теста Даннетта. Черными звездочками обозначены статистически значимые различия относительно группы контроля, красными — различия между группами 5-азациитидина в комбинации с эфавирензом и 5-азациитидина

Fig. 8. DNA damage in KG-1 cells treated with 5-azacytidine in combination with efavirenz in the DNA comet assay. Normality of distribution of values was determined by the Kolmogorov—Smirnov test. The significance of differences between control untreated cells and cells treated with 5-azacytidine was determined using the ANOVA test (nonparametric Kruskal—Wallis test) and Dunnett's post hoc test. The black asterisks indicate statistically significant differences relative to the control group, the red ones indicate the difference between the 5-azacytidine group in combination with efavirenz relative to the 5-azacytidine group

ОБСУЖДЕНИЕ

Прогресс технологий секвенирования ДНК привел к открытию сложного ландшафта генома человека, в котором кодирующие последовательности составляют всего 1,2 % генома, в то время как остальная часть состоит из некодирующей ДНК [12, 13]. В результате стало очевидным, что некодирующая ДНК, долгое время считавшаяся «мусорной» [14], выполняет множество регуляторных функций. Около 45 % некодирующей ДНК состоит из различных семейств ретротранспозонов, среди которых наиболее распространены длинные диспергированные повторы LINE1, занимающие 17–20 % генома человека. В опухолевых клетках при многих злокачественных новообразованиях наблюдаются гипометилирование ДНК и дерепрессия ретротранспозонов LINE1 [15, 16], которые помимо влияния на профиль экспрессии генов сопровождаются массивной соматической ретротранспозицией [17–19]. При aberrантных интеграциях LINE1 может происходить инициация двухцепочечных разрывов ДНК и нехомологичного воссоединения концов (non-homologous end joining, NHEJ), а также удаление целых областей хромосом, что приводит к сложным транслокациям и крупномасштабным перестройкам [20]. Таким образом, одним из последствий активации LINE1 является повышение нестабильности генома опухолевых клеток, способствующее опухолевой прогрессии.

Ретротранспозиция LINE1 реализуется благодаря экспрессии кодируемого ими белка ORF2 LINE1, выполняющего функции эндонуклеазы и ОТ — фермента, обеспечивающего синтез ДНК на матрице РНК [10]. Этот фермент гомологичен ОТ, закодированной в геномах РНК-содержащих вирусов, что открывает возможность использования в онкологии антиретровирусных препаратов, действие которых основано на ингибировании ОТ. Одним из наиболее эффективных ингибиторов ОТ ретровирусов, который в настоящее время используется в терапии почти 30 % ВИЧ-инфицированных пациентов, является эфавиренз [21]. Он относится к препаратам I поколения класса ненуклеозидных ингибиторов ОТ ретровирусов, которые действуют аллостерически, изменяя конформацию фермента [22]. Результаты доклинических исследований противоопухолевых эффектов эфавиренза продемонстрировали, что он оказывает радиосенсибилизирующее действие на клетки ВхРС-3 аденокарциномы поджелудочной железы и ингибирует их колониобразующий потенциал [23]. В клетках недифференцированной карциномы щитовидной железы ARO и FRO, меланомы A-375, аденокарциномы молочной железы MCF7 и карциномы предстательной железы PC3, культивируемых *in vitro*, эфавиренз вызывал снижение пролиферативной активности и индукцию процессов дифференцировки [10]. Кроме того, этот препарат успешно прошел II фазу клинических испытаний по оценке эффективности и безопасности при метастатическом кастрационно-резистентном раке предстательной железы [24].

В то же время возможности применения эфавиренза в комбинации с ГМА до настоящего времени не проанализированы. В нашем исследовании с помощью теста на жизнеспособность клеток по уровню метаболизма резазурина мы продемонстрировали, что данный препарат не изменяет цитотоксическое действие 5-азациитидина на культивируемые *in vitro* клетки линий ОМЛ ТНР-1 и КГ-1. К настоящему моменту опубликовано лишь одно исследование, результаты которого показали, что слаботоксичная концентрация для клеток ТНР-1 составила 44 мкМ [25]. Это согласуется с полученными нами данными о цитотоксичности эфавиренза. В то же время такие результаты свидетельствуют о том, что эфавиренз не должен влиять на противоопухолевый эффект 5-азациитидина. Согласно полученным нами данным этот препарат статистически значимо не влиял на уровень экспрессии LINE1, индуцированной 5-азациитидином. Поскольку повышение уровня экспрессии LINE1 является одним из путей активации интерферонового сигналинга 1-го типа [26], мы рассматриваем этот факт как аргумент в пользу эффективности 5-азациитидина в комбинации с эфавирензом. Согласно результатам нашего исследования при применении такой комбинации препаратов отмечается статистически значимое снижение генотоксичности 5-азациитидина. Таким образом, на культивируемых *in vitro* клетках ОМЛ линий ТНР-1 и КГ-1 мы продемонстрировали перспективность использования ГМА 5-азациитидина в комбинации с ненуклеозидным ингибитором ОТ ретровирусов эфавирензом в качестве препарата, не влияющего на противоопухолевое действие ГМА, но улучшающего отдаленные последствия такого воздействия путем повышения стабильности генома.

В то же время нельзя не отметить потенциальное ограничение возможности применения эфавиренза в клинической практике. При использовании данного препарата в стандартном протоколе лечения ВИЧ-инфицированных пациентов уже через 48 ч возникали гепатотоксические и нейротоксические эффекты, что являлось причиной прекращения антиретровирусной терапии в 1/3 случаев [27–30]. Одним из основных механизмов токсического действия эфавиренза было нарушение функционального состояния митохондрий путем ингибирования комплекса I дыхательной цепи и в результате активации оксидазы, индуцируемой оксидом азота [31–33]. Структурные нарушения митохондрий приводили к высвобождению цитохрома С и индукции митохондриального пути апоптоза [30, 34]. Предполагаемой причиной митохондриальной токсичности эфавиренза является его липофильность, которая обеспечивает накопление в митохондриях данного соединения в значительных количествах [29].

Следует учитывать и побочные эффекты 5-азациитидина. В частности, этот препарат является индуктором апоптоза, сопровождающегося снижением митохондриального мембранного потенциала и высвобождением

цитохрома С, вызывает разобщение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях, а также усиливает пролиферацию и хемирезистентность опухолевых клеток [35–38]. Перечисленные побочные эффекты эфавиренза и 5-азациитидина следует учитывать при дальнейшей разработке схем лечения онкологических заболеваний на основе комбинированного применения данных соединений.

Положительный опыт применения в клинической практике 5-азациитидина или децитабина в комбинации с ингибиторами ОТ ВИЧ, в том числе эфавирензом, описан в публикациях по терапии ВИЧ-инфицированных пациентов с миелодиспластическим синдромом и ОМЛ, что согласуется с результатами нашего исследования [39, 40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно результатам исследования на клетках ОМЛ линий ТНР-1 и KG-1 нуклеозидный ингибитор ОТ

ретровирусов эфавиренз не влияет на индуцированные ГМА 5-азациитидином цитотоксический эффект и активацию LINE1. К настоящему моменту получены данные о том, что ГМА вызывают не только изменение профиля экспрессии генов, но и, активируя экспрессию ретротранспозонов, индуцируют интерфероновый сигналинг 1-го типа, что вносит вклад в их противоопухолевое действие. В то же время активация ретротранспозонов приводит к повышению уровня генетической нестабильности, что способствует прогрессии опухоли.

Полученные нами данные свидетельствуют о возможности снижения генотоксичности 5-азациитидина при его использовании в комбинации с эфавирензом. Это открывает новые возможности для поиска более безопасной и эффективной противоопухолевой терапии ОМЛ и свидетельствует о необходимости дальнейших доклинических и клинических испытаний по изучению комбинирования ГМА с ингибиторами ОТ ретровирусов в лечении ОМЛ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Granatkin M.A., Nikitin E.A., Mikhailov E.S. et al. Combination of azacitidine and venetoclax in first-line therapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: first experience. *Clin Oncohematol* 2022;15(3):282–8. DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-3-282-288
- Докшина И.А., Минаева Н.В., Поздеев Н.М. и др. Азациитидин — препарат выбора при лечении больных миелодиспластическим синдромом. *Гематология и трансфузиология* 2017;62(2):60–4. DOI: 10.18821/0234-5730-2017-62-2-60-64
- Dokshina I.A., Minaeva N.V., Pozdeev N.M. et al. Azacitidine is the preparation of choice in the treatment of myelodysplastic syndromes patients. *Gematologiya i transfusiologiya = Russian Journal of Hematology and Transfusiology* 2017;62(2):60–4. (In Russ.). DOI: 10.18821/0234-5730-2017-62-2-60-64
- Jani C.T., Ahmed A., Singh H. et al. 1990–2019: estimates from the global burden of disease study. *JCO Glob Oncol* 2023;9:e2300229. DOI: 10.1200/JGO.23.00229
- Seymour J.F., Döhner H., Butrym A. et al. Azacitidine improves clinical outcomes in older patients with acute myeloid leukaemia with myelodysplasia-related changes compared with conventional care regimens. *BMC Cancer* 2017;17(1):852. DOI: 10.1186/s12885-017-3803-6
- Christman J. 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 2002;21:5483–95. DOI: 10.1038/sj.onc.1205699
- Gu X., Tohme R., Tomlinson B. et al. Decitabine- and 5-azacytidine resistance emerges from adaptive responses of the pyrimidine metabolism network. *Leukemia* 2021;35(4):1023–36. DOI: 10.1038/s41375-020-1003-x
- Brocks D., Schmidt C.R., Daskalakis M. et al. DNMT and HDAC inhibitors induce cryptic transcription start sites encoded in long terminal repeats. *Nat Genet* 2017;49(7):1052–60. DOI: 10.1038/ng.3889
- Daskalakis M., Brocks D., Sheng Y.H. et al. Reactivation of endogenous retroviral elements via treatment with DNMT- and HDAC-inhibitors. *Cell Cycle* 2018;17(7):811–22. DOI: 10.1080/15384101.2018.1442623
- Chiappinelli K.B., Strissel P.L., Desrichard A. et al. Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses. *Cell* 2015;162(5):974–86. DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.011
- Власова О.А., Антонова И.А., Магомедова Х.М. и др. Потенциальные возможности использования в онкологии ингибиторов обратной транскриптазы вирусов. *Успехи молекулярной онкологии* 2024;11(2):8–28. DOI: 17650/2313-805X-2024-11-2-8-28
- Vlasova O.A., Antonova I.A., Magomedova Kh.M. et al. Potential to use of viral reverse transcriptase inhibitors in oncology. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(2):8–28. (In Russ.). DOI: 17650/2313-805X-2024-11-2-8-28
- Singh A.K., Kumar A., Arora S. et al. Current insights and molecular docking studies of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Chem Biol Drug Des* 2024;103(1):e14372. DOI: 10.1111/cbdd.14372
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409(6822):860–921. DOI: 10.1038/35057062
- Cordaux R., Batzer M.A. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* 2009;10(10):691–703. DOI: 10.1038/nrg2640
- Orgel L.E., Crick F.H. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 1980;284(5757):604–7. DOI: 10.1038/284604a0
- Ardeljan D., Taylor M.S., Ting D.T., Burns K.H. The human long interspersed element-1 retrotransposon: an emerging biomarker of neoplasia. *Clin Chem* 2017;63(4):816–22. DOI: 10.1373/clinchem.2016.257444
- Howard G., Eiges R., Gaudet F. et al. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene* 2008;27(3):404–8. DOI: 10.1038/sj.onc.1210631
- Payer L.M., Burns K.H. Transposable elements in human genetic disease. *Nat Rev Genet* 2019;20(12):760–72. DOI: 10.1038/s41576-019-0165-8
- Scott E.C., Devine S.E. The role of somatic L1 retrotransposition in human cancers. *Viruses* 2017;9(6):131. DOI: 10.3390/v9060131
- Burns K.H. Transposable elements in cancer. *Nat Rev Cancer* 2017;17(7):415–24. DOI: 10.1038/nrc.2017.35
- Rodriguez-Martin B., Alvarez E.G., Baez-Ortega A. et al. Pan-cancer analysis of whole genomes identifies driver rearrangements promoted by LINE-1 retrotransposition. *Nat Genet* 2020;52(3):306–19. DOI: 10.1038/s41588-019-0562-0

21. Торопов С.Э., Рудакова А.В., Захарова Н.Г. и др. Фармакоэкономический анализ первой линии антиретровирусной терапии. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии 2015;7(1):29–39. DOI: 10.22328/2077-9828-2015-7-1-29-39
Toropov S.E., Rudakova A.V., Zakharova N.G. et al. Pharmacoeconomic analysis of first-line antiretroviral therapy. VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders 2015;7(1):29–39. (In Russ.). DOI: 10.22328/2077-9828-2015-7-1-29-39
22. Costa B., Vale N. Efavirenz: history, development and future. Biomolecules 2022;13(1):88. DOI: 10.3390/biom13010088
23. Hecht M., Harrer T., Körber V. et al. Cytotoxic effect of efavirenz in BxPC-3 pancreatic cancer cells is based on oxidative stress and is synergistic with ionizing radiation. Oncol Lett 2018;15(2):1728–36. DOI: 10.3892/ol.2017.7523
24. Houédé N., Pulido M., Mourey L. et al. A phase II trial evaluating the efficacy and safety of efavirenz in metastatic castration-resistant prostate cancer. Oncologist 2014;19(12):1227–8. DOI: 10.1634/theoncologist.2014-0345
25. Heaton B.J., Jensen R.L., Line J. et al. Exposure of human immune cells, to the antiretrovirals efavirenz and lopinavir, leads to lower glucose uptake and altered bioenergetic cell profiles through interactions with SLC2A1. Biomed Pharmacother 2022;150:112999. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.112999
26. Tang H., Yang J., Xu J. et al. The transcription factor PAX5 activates human LINE1 retrotransposons to induce cellular senescence. EMBO Rep 2024;25(8):3263–75. DOI: 10.1038/s44319-024-00176-9
27. Tan Z., Jia X., Ma F. et al. Increased MMAB level in mitochondria as a novel biomarker of hepatotoxicity induced by efavirenz. PLoS One 2017;12(11):e0188366. DOI: 10.1371/journal.pone.0188366
28. Martinez-Arroyo O., Gruevska A., Victor V.M. et al. Mitophagy in human astrocytes treated with the antiretroviral drug efavirenz: lack of evidence or evidence of the lack. Antiviral Res 2019;168:36–50. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.04.015
29. Ganta K.K., Mandal A., Chaubey B. Depolarization of mitochondrial membrane potential is the initial event in non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz induced cytotoxicity. Cell Biol Toxicol 2017;33(1):69–82. DOI: 10.1007/s10565-016-9362-9
30. Apostolova N., Gomez-Sucerquia L.J., Gortat A. et al. Autophagy as a rescue mechanism in efavirenz-induced mitochondrial dysfunction: a lesson from hepatic cells. Autophagy 2011;7(11):1402–4. DOI: 10.4161/auto.7.11.17653
31. Blas-García A., Apostolova N., Ballesteros D. et al. Inhibition of mitochondrial function by efavirenz increases lipid content in hepatic cells. Hepatology 2010;52(1):115–25. DOI: 10.1002/hep.23647
32. Apostolova N., Funes H.A., Blas-García A. et al. Involvement of nitric oxide in the mitochondrial action of efavirenz: a differential effect on neurons and glial cells. J Infect Dis 2015;211(12):1953–8. DOI: 10.1093/infdis/jiu825
33. Imaizumi N., Kwang Lee K., Zhang C., Boelsterli U.A. Mechanisms of cell death pathway activation following drug-induced inhibition of mitochondrial complex I. Redox Biol 2015;4:279–88. DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.005
34. Li M., Sopey A., Paintsil E. Combination of tenofovir and emtricitabine with efavirenz does not moderate inhibitory effect of efavirenz on mitochondrial function and cholesterol biosynthesis in human T lymphoblastoid cell line. Antimicrob Agents Chemother 2018;62(9):e00691–18. DOI: 10.1128/AAC.00691-18
35. Khan R., Schmidt-Mende J., Karimi M. et al. Hypomethylation and apoptosis in 5-azacytidine-treated myeloid cells. Exp Hematol 2008;36(2):149–57. DOI: 10.1016/j.exphem.2007.10.002
36. Kim D.Y., Cheong H.T., Ra C.S. et al. Effect of 5-azacytidine (5-aza) on UCP2 expression in human liver and colon cancer cells. Int J Med Sci 2021;18(10):2176–86. DOI: 10.7150/ijms.56564
37. Derdak Z., Mark N.M., Beldi G. et al. The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells. Cancer Res 2008;68(8):2813–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0053
38. Dalla Pozza E., Fiorini C., Dando I. et al. Role of mitochondrial uncoupling protein 2 in cancer cell resistance to gemcitabine. Biochim Biophys Acta 2012;1823(10):1856–63. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.06.007
39. Boada M., Grille S. Myelodysplastic syndrome in patients living with HIV infection. Hematol Transfus Cell Ther 2023;45(1):119–23. DOI: 10.1016/j.htct.2021.06.006
40. Forghieri F., Nasillo V., Bettelli F. et al. Acute myeloid leukemia in patients living with HIV infection: several questions, fewer answers. Int J Mol Sci 2020;21(3):1081. DOI: 10.3390/ijms21031081

Вклад авторов

Х.М. Магомедова: работа с культурами клеток, анализ цитотоксического действия препаратов, выполнение полимеразной цепной реакции, анализ экспрессии белков с помощью проточной цитометрии, обработка полученных данных, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала;

И.А. Антонова: работа с культурами клеток, проведение теста ДНК-комет, анализ и интерпретация результатов, оформление текста рукописи; М.С. Стрелков, В.А. Нуртдинова: работа с культурами клеток, выполнение полимеразной цепной реакции, анализ и интерпретация результатов; В.Т. Чешевик: обзор литературы по теме статьи, сравнительный анализ эффектов эфавиренза с опубликованными данными, редактирование; К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий: проведение системного анализа, редактирование;

М.Г. Якубовская: разработка концепции исследования, проведение системного анализа, обобщение данных, написание текста статьи, редактирование;

О.А. Власова: разработка концепции и дизайна исследования, обзор литературы по теме статьи, анализ и обобщение полученных данных, написание текста статьи, редактирование, подготовка иллюстративного материала, руководство проведением исследования.

Authors' contributions

Kh.M. Magomedova: working with cell cultures, analyzing the cytotoxic effects of drugs, performing polymerase chain reaction, analyzing protein expression using flow cytometry, processing the data obtained, article writing, preparing illustrative material;

I.A. Antonova: working with cell cultures, conducting a DNA comet test, analyzing and interpreting the results, formatting the text of the manuscript; M.S. Strelkov, V.A. Nurtudinova: working with cell cultures, performing a polymerase chain reaction, analyzing and interpreting the results;

V.T. Cheshchevik: literature review on the topic of the article, comparative analysis of efavirenz effects with published data, editing;

K.I. Kirsanov, G.A. Belitsky: system analysis, editing;

M.G. Yakubovskaya: developing a research concept, conducting a system analysis, summarizing data, article writing, editing;

O.A. Vlasova: development of the research concept and design, review of the literature on the topic of the article, analysis and generalization of the data obtained, article writing, editing, preparation of illustrative material, management of the research.

ORCID авторов / ORCID of authors

Х.М. Магомедова / Kh.M. Magomedova: <https://orcid.org/0009-0004-8514-3859>

И.А. Антонова / I.A. Antonova: <https://orcid.org/0009-0004-3482-8954>

М.С. Стрелков / M.S. Strelkov: <https://orcid.org/0009-0007-4778-0584>

В.Т. Чешевик / V.T. Cheshchevik: <https://orcid.org/0000-0002-1457-8570>

К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>

Г.А. Белицкий / G.A. Belitsky: <https://orcid.org/0000-0002-3167-7204>

М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>

О.А. Власова / O.A. Vlasova: <https://orcid.org/0000-0002-1498-849X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00276).

Funding. The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 23-25-00276).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-104-111>

Динамика субпопуляций циркулирующих нейтрофилов CD15⁺CD66b⁺ и CD62L⁺CD63⁺ у пациентов с доброкачественными новообразованиями почки и с прогрессированием рака почки

И.Р. Мягдиева¹, Т.В. Абакумова¹, Д.Р. Долгова¹, О.Ю. Горшков², Т.П. Генинг¹, Р.Ш. Зайнеева¹, С.А. Тимофеева¹¹ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»; Россия, 432017 Ульяновск, ул. Льва Толстого, 42;²ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер»; Россия, 432017 Ульяновск, ул. 12 Сентября, 90**Контакты:** Ильясея Ринатовна Мягдиева ilseya2015@yandex.ru

Введение. В связи с неоднозначной ролью нейтрофилов в канцерогенезе актуальным является изучение их фенотипической трансформации и субпопуляционного состава, определяющего проопухолевый (CD15⁺CD66b⁺) или противоопухолевый (CD62L⁺CD63⁺) потенциал.

Цель исследования – оценка динамики субпопуляций циркулирующих нейтрофилов CD15⁺CD66b⁺, CD62L⁺CD63⁺ у пациентов с доброкачественными новообразованиями почки и у больных с прогрессированием рака почки.

Материалы и методы. Объектом исследования явились циркулирующие нейтрофилы пациентов с доброкачественными новообразованиями почки и больных раком почки. Количество нейтрофилов монопопуляций CD15⁺, CD66b⁺, CD62L⁺, CD63⁺, CD95⁺ и субпопуляций CD15⁺CD66b⁺, CD62L⁺CD63⁺ оценивали с помощью проточной цитометрии (BioSino, Китай). Статистическую обработку проводили с использованием программ Statistica 13 и Jamovi 2.3.28.

Результаты. Выявлено значимое повышение количества монопопуляций нейтрофилов CD15⁺, CD62L⁺ и CD66b⁺ у пациентов с доброкачественными новообразованиями почки и у больных раком почки, а также количества CD15⁺CD66b⁺-нейтрофилов у пациентов с доброкачественными опухолями почки и у больных раком почки I–II стадии по сравнению с контролем. Доля CD62L⁺CD63⁺-нейтрофилов у больных с доброкачественными новообразованиями была в 3 раза выше, чем у больных раком почки I–II стадии, и в 2 раза выше, чем у больных распространенным раком почки. В регрессионной модели Кокса изменение количества CD15⁺CD66b⁺- и CD62L⁺CD63⁺-нейтрофилов на фоне увеличения количества лейкоцитов служит прогностическим маркером рака почки для пациентов старше 68 лет.

Заключение. Количество циркулирующих нейтрофилов с проопухолевым фенотипом CD15⁺CD66b⁺ при доброкачественных новообразованиях почки выше по сравнению с контролем и сохраняется на этом уровне на всех стадиях канцерогенеза. Количество циркулирующих нейтрофилов противоопухолевого фенотипа CD62L⁺CD63⁺ значимо возрастает при доброкачественных новообразованиях почки и снижается на всех стадиях канцерогенеза. Оценка фенотипа циркулирующих нейтрофилов позволяет определить риск возникновения новообразований почки.

Ключевые слова: CD15⁺CD66b⁺-нейтрофилы, CD62L⁺CD63⁺-нейтрофилы, рак почки, доброкачественное новообразование почки

Для цитирования: Мягдиева И.Р., Абакумова Т.В., Долгова Д.Р. и др. Динамика субпопуляций циркулирующих нейтрофилов CD15⁺CD66b⁺ и CD62L⁺CD63⁺ у пациентов с доброкачественными новообразованиями почки и с прогрессированием рака почки. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(2):104–11.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-104-111>

Dynamics of subpopulations of CD15⁺CD66b⁺ and CD62L⁺CD63⁺ circulating neutrophils in patients with benign neoplasms and progression of kidney cancer

I.R. Myagdieva¹, T.V. Abakumova¹, D.R. Dolgova¹, O. Yu. Gorshkov², T.P. Gening¹, R.Sh. Zaineeva¹, S.A. Timofeeva¹¹Ulyanovsk State University; 42 L'va Tolstogo St., Ulyanovsk 432017, Russia;²Regional Clinical Oncology Dispensary; 90 12th September St., Ulyanovsk 432017, Russia

Contacts: Ilseya Rinatovna Myagdieva ilseya2015@yandex.ru

Introduction. Due to the ambiguous role of neutrophils in carcinogenesis, it is relevant to study their phenotypic transformation and subpopulation composition that determines protumor (CD15⁺CD66b⁺) or antitumor (CD62L⁺CD63⁺) potential.

Aim. To assess the dynamics of CD15⁺CD66b⁺ and CD62L⁺CD63⁺ circulating neutrophil subpopulations in patients with benign neoplasms and during the progression of kidney cancer.

Materials and methods. The study focused on circulating neutrophils from patients with benign neoplasms and kidney cancer. The phenotype of monopopulations (CD15⁺, CD66b⁺, CD62L⁺, CD63⁺, CD95⁺) and subpopulations (CD15⁺CD66b⁺, CD62L⁺CD63⁺) of neutrophils was assessed using flow cytometry (BioSino, China). Statistical analysis was performed using Statistica 13 and Jamovi 2.3.28.

Results. A significant increase in the number of CD15⁺, CD62L⁺, and CD66b⁺ neutrophil monopopulations, as well as in the number of CD15⁺CD66b⁺ neutrophils, was observed in the groups of patients with benign kidney tumors and kidney cancer compared to the control group. In patients with benign renal tumors, the percentage of CD62L⁺CD63⁺ neutrophils was three times higher than in patients with stage I–II kidney cancer, and twice as high as in those with advanced kidney cancer. According to the Cox regression model, changes in the numbers of CD15⁺CD66b⁺ and CD62L⁺CD63⁺ neutrophils, alongside an increase in leukocyte count, serve as prognostic markers of kidney cancer in patients over 68 years of age.

Conclusion. The number of circulating neutrophils with a protumor phenotype (CD15⁺CD66b⁺) increases even at the stage of benign kidney neoplasms compared to controls and remains elevated throughout all stages of carcinogenesis. Meanwhile, the number of circulating neutrophils with an antitumor phenotype (CD62L⁺CD63⁺) significantly increases in benign renal neoplasms but decreases during cancer progression. Assessment of the circulating neutrophil phenotype may help predict the risk of kidney neoplasms.

Keywords: CD15⁺CD66b⁺ neutrophils, CD62L⁺CD63⁺ neutrophils, kidney cancer, benign kidney tumor

For citation: Myagdieva I.R., Abakumova T.V., Dolgova D.R. et al. Dynamics of subpopulations of CD15⁺CD66b⁺ and CD62L⁺CD63⁺ circulating neutrophils in patients with benign neoplasms and progression of kidney cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(2):104–11. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-104-111>

ВВЕДЕНИЕ

Рак почки (РП) составляет около 3 % всех злокачественных новообразований и 97 % всех опухолей почки в мире [1]. В последнее десятилетие отмечено появление новых иммунологических подходов к лечению данной патологии. Иммуноterapia основана на подавлении иммунной супрессии и усилении иммунологического надзора путем ингибирования контрольных иммунных точек [2, 3].

Применение иммунотерапевтического метода для комбинированного лечения РП требует детального изучения иммунопатогенеза данной патологии [4], поскольку эффективность иммунотерапии зависит от функционального состояния циркулирующих в крови и инфильтрирующих опухоль иммунных клеток [5]. Нейтрофилы являются 1-й линией защиты врожденной иммунной системы и обладают способностью регулировать адаптивный иммунный ответ. В последнее время растет количество исследований фенотипов и функциональных состояний нейтрофилов, а также их роли в развитии РП [6]. Нейтрофилы могут иметь как противоопухолевое воздействие, проявляя цитотоксические свойства против опухоли, так и проопухолевое влияние, способствуя метастазированию опухолевых клеток [7–9]. Известно, что нейтрофилы изменяют свой фенотип в процессах созревания и активации [10]. При этом трансформация субпопуляций нейтрофилов может происходить под влиянием

цитокинов и хемокинов, продуцируемых как самой опухолью, так и иммунными клетками [11].

Функциональное состояние и фенотип нейтрофилов определяются экспрессией различных рецепторов, которая изменяется в зависимости от типа опухоли и стадии канцерогенеза [12, 13]. Рецепторы CD15 и CD62L участвуют в адгезии и миграции нейтрофилов в очаг воспаления, а CD66b и CD63 — в их созревании, активации и дегрануляции [14]. CD62L — рецептор адгезии, обеспечивающий роллинг и перемещение нейтрофилов в опухолевое микроокружение. Согласно результатам исследований, снижение экспрессии CD62L на нейтрофилах способствует метастазированию при раке молочной железы и меланоме [15, 16]. Рецептор CD63 играет роль белков-посредников при передаче сигналов и выполняет важную регуляторную функцию, влияя на развитие нейтрофильных гранулоцитов, их активацию, рост и подвижность [16]. CD62L⁺CD63⁺-нейтрофилы представляют собой активированные, зрелые нейтрофилы, способные к миграции в опухолевый очаг для выполнения противоопухолевой функции [17]. Также отмечено увеличение количества данной субпопуляции нейтрофилов при колоректальном раке [17].

По данным ранее проведенных исследований, циркулирующие в крови нейтрофилы у пациентов с РП характеризуются пониженной поверхностной экспрессией маркеров созревания CD66b и CD63,

что может объясняться усилением гемопоэза в костном мозге [18].

По данным исследования С. Blanco-Camarillo и соавт., CD15⁺CD66b⁺-нейтрофилы представляют собой субпопуляцию нейтрофилов низкой плотности, являющихся зрелыми клетками с повышенными продукцией активных форм кислорода и фагоцитарной способностью [19, 20]. Такие нейтрофилы проявляют иммуносупрессивные свойства у пациентов с раком яичников и немелкоклеточным раком легкого [21, 22].

Несмотря на большой интерес к особенностям функционирования нейтрофилов при канцерогенезе и значительное количество исследований по этой теме, малоизученным остается вопрос о трансформации нейтрофилов различных субпопуляций в зависимости от типа опухоли, ее «биологического портрета» и стадии развития.

Цель исследования — оценка динамики субпопуляций циркулирующих нейтрофилов CD15⁺CD66b⁺ и CD62L⁺CD63⁺ у пациентов с доброкачественными новообразованиями (ДНО) почки и у больных с прогрессированием РП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явились циркулирующие нейтрофилы пациентов с РП. Критерием включения в исследование был гистологически подтвержденный светлоклеточный РП (табл. 1). Сформированы 2 группы сравнения. В 1-ю группу вошли условно здоровые доноры без онкологической патологии в анамнезе, сопоставимые по возрасту с пациентами экспериментальной группы, во 2-ю — пациенты с ДНО почки (онкоцитомой, ангиолипомой, кистой почки). Критериями исключения из исследования были несветло-

Таблица 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Table 1. Characteristics of patients included in the study

Показатель Parameter	Значение Value	Показатель Parameter	Значение Value
Рак почки (n = 84) Kidney cancer (n = 84)		Абсолютное число нейтрофилов, ×10 ⁹ /л, медиана (Q ₁ –Q ₃) Absolute neutrophil count, ×10 ⁹ /l, median (Q ₁ –Q ₃)	
Возраст, медиана (Q ₁ –Q ₃), лет Age, median (Q ₁ –Q ₃), years	66 (58–70)	2,58 (2,10–2,68)	
Абсолютное число лейкоцитов, ×10 ⁹ /л, медиана (Q ₁ –Q ₃) Absolute leukocyte count ×10 ⁹ /l, median (Q ₁ –Q ₃)	7,02 (5,80–8,31)	Нейтрофильно-лимфоцитарный индекс, медиана (Q ₁ –Q ₃) Neutrophil to lymphocyte ratio, median (Q ₁ –Q ₃)	1,19 (1,18–1,68)
Абсолютное число нейтрофилов, ×10 ⁹ /л, медиана (Q ₁ –Q ₃) Absolute neutrophil count, ×10 ⁹ /l, median (Q ₁ –Q ₃)	3,46 (2,70–4,90)	Пол: Sex:	
Нейтрофильно-лимфоцитарный индекс, медиана (Q ₁ –Q ₃) Neutrophil to lymphocyte ratio, median (Q ₁ –Q ₃)	1,33 (1,01–2,19)	мужской male	10
Пол: Sex:		женский female	15
мужской male	46	Группа контроля (n = 20) Control group (n = 20)	
женский female	38	Возраст, медиана (Q ₁ –Q ₃), лет Age, median (Q ₁ –Q ₃), years	54 (52–66)
Гистологический тип опухоли: Histological type of tumor:	74	Абсолютное число лейкоцитов, ×10 ⁹ /л, медиана (Q ₁ –Q ₃) Absolute leukocyte count, ×10 ⁹ /l, median (Q ₁ –Q ₃)	6,10 (5,28–6,88)
светлоклеточный рак почки clear cell renal cell carcinoma		Абсолютное число нейтрофилов, ×10 ⁹ /л, медиана (Q ₁ –Q ₃) Absolute neutrophil count, ×10 ⁹ /l, median (Q ₁ –Q ₃)	3,30 (2,82–3,97)
Стадия заболевания: Disease stage:		Нейтрофильно-лимфоцитарный индекс, медиана (Q ₁ –Q ₃) Neutrophil to lymphocyte ratio, median (Q ₁ –Q ₃)	1,73 (1,23–1,88)
I–II	44	Пол: Sex:	
III–IV	30	мужской male	8
Доброкачественные опухоли почки (n = 25) Benign kidney tumors (n = 25)		женский female	14
Возраст, медиана (Q ₁ –Q ₃), лет Age, median (Q ₁ –Q ₃), years	68 (56–75)		
Абсолютное число лейкоцитов, ×10 ⁹ /л, медиана (Q ₁ –Q ₃) Absolute leukocyte count, ×10 ⁹ /l, median (Q ₁ –Q ₃)	4,60 (4,30 – 5,65)		

Примечание. Q₁ – 1-й квартиль; Q₃ – 3-й квартиль.
Note. Q₁ – 1st quartile; Q₃ – 3rd quartile.

клеточный РП, опухоли иной локализации и любое противоопухолевое лечение до забора крови.

Всем пациентам, участвующим в исследовании, проведено хирургическое лечение (нефрэктомия).

Выделение нейтрофилов. Нейтрофилы выделяли из венозной крови на двойном градиенте плотности стерильных растворов фиколла-верографина и доводили до концентрации 5×10^6 клеток/мл. Чистота фракции нейтрофилов составила 92–94 %, жизнеспособность нейтрофилов в тесте с 0,5 % трипановым синим – 95 %.

Проточная цитометрия. Исследование фенотипа выделенных нейтрофилов проводили методом проточной цитометрии (проточный цитометр BioSino, Китай) с использованием моноклональных антител: CD15, меченного фикоэритрином-цианином 5 (PC5) (Sony Biotechnology, США), CD66b, CD62L, CD95, меченных флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) (Elabscience, КНР), и CD63, меченного фикоэритрином (PE) (Atagenix, КНР). К клеткам добавляли 5 мкл тестируемого моноклонального антитела и инкубировали 15–20 мин при 20 °C согласно протоколу производителя. После инкубации клетки трехкратно отмывали

раствором Хенкса. Методом последовательного гейтирования определяли монопопуляции нейтрофилов CD15, CD66b, CD63, CD62L, CD95 и субпопуляции с фенотипами CD66b⁺CD15⁺ и CD62L⁺CD63⁺. Для корректного анализа образца использовали отрицательный контроль (неокрашенные клетки).

Статистический анализ. Совокупности количественных показателей, распределение которых отличалось от нормального, описывали с помощью значений медианы (Me) и нижнего (Q_1) и верхнего (Q_3) квартилей. Статистическую обработку проводили с использованием программ Statistica 13 и Jamovi 2.3.28. Значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Для оценки ассоциации исследуемых показателей со степенью дифференцировки использовали мультивариантную регрессионную модель Кокса и ROC-анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования обнаружены значимые изменения абсолютного количества нейтрофилов и лейкоцитов в крови пациентов исследуемых групп (табл. 2).

Таблица 2. Изменение абсолютного количества лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов и нейтрофильно-лимфоцитарного индекса в исследуемых группах, медиана (Q_1 – Q_3)

Table 2. Changes in the absolute number of leukocytes, lymphocytes, neutrophils and the neutrophil-lymphocyte ratio in the study groups, median (Q_1 – Q_3)

Показатель Parameter	Группа контроля (n = 20) Control group (n = 20)	Доброкачественные опухоли почки (n = 25) Benign kidney tumors (n = 25)	Рак почки I–II стадии (n = 44) Kidney cancer stage I–II (n = 44)	Рак почки III–IV стадии (n = 30) Kidney cancer stage III–IV (n = 30)
Абсолютное число лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$ Absolute leukocyte count, $\times 10^9/\text{l}$	6,10 (5,28–6,88)	4,60 (4,30–5,65)* $p_1 = 0,001$	5,97 (5,67–7,75)* $p_2 = 0,002$	8,07 (6,26–8,50)* $p_1 = 0,003$ $p_2 = 0,001$ $p_3 = 0,011$
Абсолютное число нейтрофилов, $\times 10^9/\text{л}$ Absolute neutrophil count, $\times 10^9/\text{l}$	3,30 (2,82–3,97)	2,58 (2,10–2,68)* $p_1 = 0,001$	3,10 (2,61–4,14)* $p_2 = 0,004$	4,04 (3,19–4,80)* $p_3 = 0,030$
Абсолютное число лимфоцитов, $\times 10^9/\text{л}$ Absolute lymphocyte count, $\times 10^9/\text{l}$	1,90 (1,85–2,35)	1,7 (1,60–2,24)	2,30 (1,64–2,51)	2,32 (2,05–3,20)* $p_1 = 0,024$
Нейтрофильно-лимфоцитарный индекс, $\times 10^9/\text{л}$ Neutrophil-lymphocyte ratio, $\times 10^9/\text{l}$	1,73 (1,23–1,88)	1,19 (1,18–1,68)* $p_1 = 0,030$	1,36 (1,01–2,19)	1,69 (1,04–2,04)* $p_2 = 0,015$

*Различия статистически значимы (U-критерий Манна–Уитни), $p < 0,05$.

Примечание. Здесь и в табл. 3: p_1 – значимость различий показателей относительно группы контроля; p_2 – значимость различий показателей относительно группы доброкачественных опухолей почки; p_3 – значимость различий показателей относительно группы рака почки I–II стадии. Q_1 – 1-й квартиль; Q_3 – 3-й квартиль.

*The differences are statistically significant (Mann–Whitney U-test), $p < 0.05$.

Note. Here and in table 3: p_1 – significance of differences in indicators relative to the control group; p_2 – significance of differences in indicators relative to the group of benign kidney tumors; p_3 – significance of differences in indicators relative to the group of kidney cancer stages I–II. Q_1 – 1st quartile; Q_3 – 3rd quartile.

Таблица 3. Изменение экспрессии поверхностных рецепторов циркулирующих нейтрофилов при доброкачественных опухолях почки и раке почки различных стадий, медиана (Q_1 – Q_3)Table 3. Changes in the expression of surface receptors of circulating neutrophils in benign kidney tumors and at different stages of kidney cancer, median (Q_1 – Q_3)

Показатель Parameter	Группа контроля (n = 20) Control group (n = 20)	Доброкачественные опухоли почки (n = 25) Benign kidney tumors (n = 25)	Рак почки I–II стадии (n = 44) Kidney cancer stage I–II (n = 44)	Рак почки III–IV стадии (n = 30) Kidney cancer stage III–IV (n = 30)
CD15 ⁺ , %; 10 ⁹ /л CD15 ⁺ , %; 10 ⁹ /л	73 (61–80); 2,4 (2,0–2,6)	95 (64–95)*; 2,5 (1,9–2,6); $p_1 = 0,003$	77 (70–94)*; 2,7 (2,4–3,3); $p_1 = 0,025$	74 (52–95)*; 2,6 (1,8–3,3); $p_2 = 0,05$
CD66b ⁺ , %; 10 ⁹ /л CD66b ⁺ , %; 10 ⁹ /л	67 (58–77); 2,3 (2,2–2,8)	66 (60–68); 2,2 (2,1–2,5)	76 (63–87)*; 2,6 (2,2–3,0); $p_2 = 0,001$	70 (60–79)*; 2,4 (2,1–2,7); $p_2 = 0,001$
CD62L ⁺ , %; 10 ⁹ /л CD62L ⁺ , %; 10 ⁹ /л	3 (3–10); 0,1 (0,1–0,3)	27 (5–91)*; 0,7 (0,1–1,9); $p_1 = 0,001$	9 (7–19)*; 0,3 (0,3–0,6); $p_1 = 0,003$	12 (8–20)*; 0,4 (0,3–0,7); $p_1 = 0,001$; $p_2 = 0,001$
CD63 ⁺ , %; 10 ⁹ /л CD63 ⁺ , %; 10 ⁹ /л	82 (78–93); 2,7 (2,6–3,1)	78 (67–98); 2,0 (1,4–2,6)	82 (61–95); 2,8 (2,1–3,3)	76 (29–90); 2,6 (1,0–3,0)
CD95 ⁺ , %; 10 ⁹ /л CD95 ⁺ , %; 10 ⁹ /л	0,3 (0,2–0,8); 0,01 (0,01–0,03)	0,5 (0,3–2,0)*; 0,14 (0,07–0,53); $p_1 = 0,003$	0,7 (0,37–1,1)*; 0,02 (0,01–0,04); $p_1 = 0,002$	0,8 (0,4–1,0)*; 0,02 (0,01–0,04); $p_1 = 0,001$
CD15 ⁺ CD66b ⁺ , %; 10 ⁹ /л CD15 ⁺ CD66b ⁺ , %; 10 ⁹ /л	55 (48–66); 1,8 (1,6–2,2)	81 (65–90)*; 2,2 (1,4–2,4); $p_1 = 0,001$	67 (60–82)*; 2,3 (2,1–2,8); $p_1 = 0,016$; $p_2 = 0,050$	60 (51–78); 2,1 (1,7–2,7)
CD62L ⁺ CD63 ⁺ , %; 10 ⁹ /л CD62L ⁺ CD63 ⁺ , %; 10 ⁹ /л	5 (2–12); 0,2 (0,1–0,4)	27 (5–91)*; 0,7 (0,1–2,4); $p_1 = 0,001$	9 (6–18)*; 0,3 (0,2–0,6); $p_1 = 0,002$; $p_2 = 0,008$	13 (7–48)*; 0,4 (0,2–1,7); $p_1 = 0,001$; $p_2 = 0,003$

*Различия статистически значимы (U-критерий Манна–Уитни), $p < 0,05$.*The differences are statistically significant (Mann–Whitney U-test), $p < 0.05$.

При этом общее количество лейкоцитов и абсолютное количество нейтрофилов в крови значимо снижалось в группе пациентов с ДНО почки относительно контрольной группы, но возрастало при прогрессировании РП. Отмечено увеличение нейтрофильно-лимфоцитарного индекса в группе РП III–IV стадии относительно группы ДНО почки.

Анализ фенотипа циркулирующих нейтрофилов показал значимое увеличение доли CD15⁺-нейтрофилов в группе ДНО почки и РП I–II стадии относительно контрольной группы (табл. 3). Количество CD66b⁺-нейтрофилов в группах РП I–II и III–IV стадий было выше, чем в группе ДНО почки. Также обнаружено увеличение количества CD62L⁺-нейтрофилов в группах ДНО и РП относительно группы контроля. Однако этот показатель был значимо ниже у пациентов с РП III–IV стадии по сравнению с пациентами с ДНО почки. В группах больных РП и с ДНО почки количество CD95⁺-нейтрофилов оказалось значимо выше, чем в группе контроля.

Результаты анализа субпопуляционного состава нейтрофилов в исследуемых группах показали повышение количества CD15⁺CD66b⁺-нейтрофилов в группах РП I–II стадии и ДНО почки относительно группы контроля. Количество CD62L⁺CD63⁺-нейтрофилов значимо повышалось во всех исследуемых группах по сравнению с группой контроля. Доля нейтрофилов данной субпопуляции у пациентов с ДНО почки была в 3 раза больше, чем в группе пациентов с РП I–II стадии, и в 2 раза выше, чем у больных РП III–IV стадии. При этом количество CD63⁺-нейтрофилов значимо не различалось во всех исследуемых группах.

В ходе унивариантного анализа логистической регрессии для дифференциальной диагностики ДНО почки и РП статистическую значимость продемонстрировали количество CD15⁺CD66b⁺- (отношение шансов (ОШ) 0,1813; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,036–1,387; $p = 0,015$) и CD62L⁺CD63⁺-нейтрофилов (ОШ 0,050; 95 % ДИ 1,014–1,089; $p = 0,006$), абсолютное количество лейкоцитов (ОШ –0,9178;

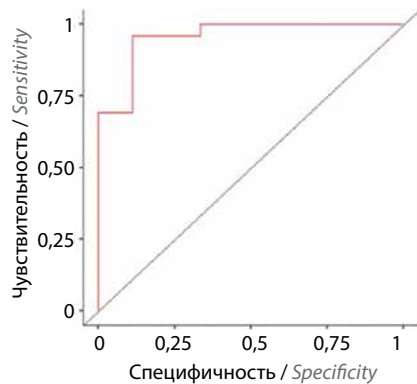


Рис. 1. ROC-кривая для регрессионной модели дифференциальной диагностики рака почки и доброкачественных опухолей почки с учетом субпопуляционного состава циркулирующих нейтрофилов, количества лейкоцитов и возраста пациентов

Fig. 1. ROC curve for the regression model of differential diagnosis of kidney cancer and benign kidney tumors taking into account the subpopulation composition of circulating neutrophils, number of leukocytes, and age of patients

95 % ДИ 0,168–0,950; $p = 0,038$) и возраст пациентов старше 68 лет (ОШ 2,9451; 95 % ДИ 1,240–291,459; $p = 0,034$). Площадь под ROC-кривой (AUC) модели составила 0,897; РП мог быть диагностирован с вероятностью 80 % (специфичность 0,846, чувствительность 0,667) (рис. 1).

Риск возникновения РП возрастает при понижении количества нейтрофилов субпопуляций $CD15^+CD66b^+$ и $CD62L^+CD63^+$, а также при повышении количества лейкоцитов, возрасте пациентов старше 68 лет ($R^2 = 0,389$; χ^2 -критерий = 31,0; $p = 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам исследований, применение иммунотерапии при светлоклеточном РП обеспечивает более высокие показатели продолжительности жизни пациентов по сравнению с таргетной терапией [23, 24]. При этом иммунное микроокружение опухоли у пациентов с РП меняется по мере прогрессирования заболевания [25]. Нейтрофилы составляют значительную часть опухолевого инфильтрата, а большое количество нейтрофилов в тканях опухоли ассоциировано с плохим прогнозом при РП, меланоме кожи, немелкоклеточном раке легкого, глиоме и раке желудка [25]. Результаты исследований, направленных на изучение роли нейтрофилов в развитии РП, показали способность нейтрофилов проявлять как про-, так и противоопухолевые свойства [6, 26, 27].

Известно, что адгезия нейтрофилов опосредована активацией рецепторов $CD15$ при его взаимодействии с рецепторами $CD66b$ [18]. Мы выявили значимое повышение количества $CD15^+$ -нейтрофилов у пациентов с ДНО почки и РП I–II стадии относительно группы контроля и $CD66b^+$ -нейтрофилов у пациентов с РП всех стадий относительно больных с ДНО почки. Это может говорить об увеличении активированных, зрелых, способных к дегрануляции и адгезии циркулиру-

ющих нейтрофилов у пациентов исследуемых групп, что согласуется с результатами исследований, посвященных другим типам рака [28].

Нейтрофилы, готовые к апоптозу, экспрессируют на поверхности рецептор клеточной гибели $CD95$ [29]. Исходя из полученных нами данных, эта способность возрастает в группах РП и ДНО почки. Результаты проведенных ранее исследований показали, что повышенный уровень лиганда $CD95$ в сыворотке крови пациентов с РП связан с иммунным ответом и использовался как маркер прогрессирования [30, 31].

Согласно данным, полученным М. J. Dominguez-Luis и соавт., активация рецептора $CD62L$ происходит уже на начальных этапах воспаления [32], что объясняет увеличение его экспрессии на ранних стадиях РП и ее снижение на распространенных стадиях РП. Нейтрофильно-лимфоцитарный индекс может быть использован в качестве прогностического маркера при различных типах рака, в том числе при РП [33, 34]. В ходе нашего исследования выявлено увеличение значения этого индекса при прогрессировании РП.

Известно, что нейтрофилы, экспрессирующие $CD15^+CD66b^+$, склонны проявлять иммуносупрессивные свойства [35], а повышение количества $CD15^+CD66b^+$ -нейтрофилов в группах РП I–II стадии и ДНО почки относительно группы контроля дает возможность предположить их проопухолевую роль.

Согласно полученным нами данным, количество $CD62L^+CD63^+$ -нейтрофилов значимо повышалось во всех исследуемых группах относительно группы контроля. По результатам исследования X. Lai и соавт., снижение экспрессии $CD63$ на нейтрофилах ассоциировалось с уменьшением внутриклеточной нейтрофильной эластазы и их цитотоксических свойств. Однако количество $CD63^+$ -нейтрофилов оставалось на одном уровне во всех исследуемых группах, что может говорить о сохранении их противоопухолевых свойств при прогрессировании РП [36].

В ходе унивариантного анализа логистической регрессии для дифференциальной диагностики между ДНО почки и РП выявлено, что риск возникновения РП возрастал при снижении количества нейтрофилов субпопуляций $CD15^+CD66b^+$, $CD62L^+CD63^+$, повышении количества лейкоцитов и возрасте пациентов старше 68 лет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Количество циркулирующих нейтрофилов с проопухолевым фенотипом $CD15^+CD66b^+$ повышается уже при ДНО почки по сравнению с группой контроля и сохраняется на этом уровне на всех стадиях канцерогенеза. Количество циркулирующих нейтрофилов противоопухолевого фенотипа $CD62L^+CD63^+$ значительно возрастает при ДНО почки и снижается в динамике канцерогенеза. Оценка фенотипа циркулирующих нейтрофилов позволяет предположить риск возникновения новообразований почки.

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

- Li P., Znaor A., Holcatova I. et al. Regional geographic variations in kidney cancer incidence rates in European countries. *Eur Urol* 2015;67(6):1134–41. DOI: 10.1016/j.eururo.2014.11.001
- Motzer R.J., Jonasch E., Agarwal N. et al. Kidney cancer, version 3.2022, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Cancer Netw* 2022;20:71–90. DOI: 10.6004/jnccn.2022.0001
- Коротаева А.А., Апанович Н.В., Брага Э.А. и др. Современные достижения в иммунотерапии рака почки. *Онкоурология* 2019;15(4):30–8. DOI: 10.17650/1726-9776-2019-15-4-30-38
Korotaeva A.A., Apanovich N.V., Braga E.A. et al. Current advances in kidney cancer immunotherapy. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2019;15(4):30–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2019-15-4-30-38
- De Palma M., Biziato D., Petrova T. V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2017;17(8):457–74. DOI: 10.1038/nrc.2017.51
- Anker J., Miller J., Taylor N. et al. From bench to bedside: how the tumor microenvironment is impacting the future of immunotherapy for renal cell carcinoma. *Cells* 2021;10(11):3231. DOI: 10.3390/cells10113231
- Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В. и др. Взаимосвязь фенотипа и метаболизма нейтрофилов крови у больных раком почки. *Медицинская иммунология* 2020;22(5):887–96. DOI: 10.15789/1563-0625-IAM-2037
Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V. et al. The relationship between the phenotype and metabolism of blood neutrophils in patients with kidney cancer. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology* 2020;22(5):887–96. (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-IAM-2037
- Данилова А.Б., Балдуева И.А. Нейтрофилы как компонент опухолевого микроокружения. *Вопросы онкологии* 2016;62(1):35–44. Danilova A.B., Baldueva I.A. Neutrophils as a component of the tumor microenvironment. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2016;62(1):35–44. (In Russ.).
- Mishalian I., Granot Z., Fridlender Z.G. The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiology* 2017;222(1):82–8. DOI: 10.1016/j.imbio.2016.02.001
- Silvestre-Roig C., Fridlender Z.G., Glogauer M., Scapini P. Neutrophil diversity in health and disease. *Trends Immunol* 2019;40(7):565–83. DOI: 10.1016/j.it.2019.04.012
- Evrard M., Kwok I.W.H., Chong S.Z. et al. Developmental analysis of bone marrow neutrophils reveals populations specialized in expansion, trafficking, and effector functions. *Immunity* 2018; 48(2):364–79. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.02.002
- Lecot P., Sarabi M., Pereira Abrantes M. et al. Neutrophil heterogeneity in cancer: from biology to therapies. *Front Immunol* 2019;10:2155. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02155
- Савченко А.А., Здитовский Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилюминесцентная и энзиматическая активность нейтрофильных гранулоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от исхода заболевания. *Вестник РАМН* 2014;5(6):23–8. Savchenko A.A., Zdzitovskiy D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Chemiluminescent and enzyme activity of neutrophils in patients with widepread purulent peritonitis depending on the outcome of disease. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences* 2014;5(6):23–8. (In Russ.).
- Lin A., Lore K. Granulocytes: new members of the antigen-presenting cell family. *Front Immunol* 2017;11:1781. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01781
- Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В. и др. Неоднозначное влияние рекомбинантного интерферона $\alpha 2B$ на нетрансформированный и трансформированный фенотип функционально значимых субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов в эксперименте *in vitro*. *Иммунология* 2020;41(2):124–34. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-124-134
Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V. et al. Contradictory effect of recombinant interferon $\alpha 2b$ on the non-transformed and transformed phenotypes of functionally significant subpopulations of neutrophilic granulocytes *in vitro*. *Immunologiya = Immunology* 2020; 41(2):124–34. (In Russ.). DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-124-134
- Wang Z., Yang C., Li L. et al. CD62L^{dim} neutrophils specifically migrate to the lung and participate in the formation of the pre-metastatic niche of breast cancer. *Front Oncol* 2020;10:540484. DOI: 10.3389/fonc.2020.540484
- Peng Z., Liu C., Victor A.R. et al. Tumors exploit CXCR4hiCD62Llo aged neutrophils to facilitate metastatic spread. *Oncoimmunology* 2021;10(1):1870811. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1870811
- Чудилова Г.А., Нестерова И.В., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В. Особенности влияния *in vitro* регуляторных цитокинов на фенотип субпопуляций CD62L+CD63–, CD62L+CD63+ и микробицидную активность нейтрофильных гранулоцитов пациентов с колоректальным раком. *Вестник Российского университета дружбы народов* 2020;24(4):304–14. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-304-314
Chudilova G.A., Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Lomtadize L.V. Regulatory cytokine effects *in vitro* on the phenotype of subpopulations CD62L+CD63–, CD62L+CD63+ and microbicidal activity of neutrophilic granulocytes in patients with colorectal cancer. *Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov = RUDN Journal of Medicine* 2020;24(4):304–14. (In Russ.). DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-304-314
- Wang Z., Yang C., Li L. et al. CD62L^{dim} neutrophils specifically migrate to the lung and participate in the formation of the pre-metastatic niche of breast cancer. *Front Oncol* 2020;10:540484. DOI: 10.3389/fonc.2020.540484
- Rice C.M., Davies L.C., Subleski J.J. et al. Tumour-elicited neutrophils engage mitochondrial metabolism to circumvent nutrient limitations and maintain immune suppression. *Nat Commun* 2018;9(1):5099. DOI: 10.1038/s41467-018-07505-2
- Blanco-Camarillo C., Aleman O.R., Rosales C. Low-density neutrophils in healthy individuals display a mature primed phenotype. *Front Immunol* 2021;12:672520. DOI: 10.3389/fimmu.2021.672520
- Zhang J., Xu X., Shi M. et al. CD13^{hi} neutrophil-like myeloid-derived suppressor cells exert immune suppression through Arginase 1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncoimmunology* 2017;6(2):e1258504. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1258504
- Vanhaver C., Aboubakar Nana F., Delhez N. et al. Immunosuppressive low-density neutrophils in the blood of cancer patients display a mature phenotype. *Life Sci Alliance* 2023;7(1):e202302332. DOI: 10.26508/lsa.202302332
- Albiges L., Tannir N.M., Burotto M. et al. Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib for first-line treatment of advanced renal cell carcinoma: extended 4-year follow-up of the phase III CheckMate 214 trial. *ESMO Open* 2020;5(6):e001079. DOI: 10.1136/esmoopen-2020-001079
- Tannir N.M., Signoretti S., Choueiri T.K. et al. Efficacy and safety of nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in first-line treatment of patients with advanced sarcomatoid renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2021;27(1):78–86. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2063
- Dumitru C.A., Lang S., Brandau S. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: mechanisms and consequences for tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2013;23(3):141–8. DOI: 10.1016/j.semcancer.2013.02.005

26. Rosellini M., Marchetti A., Mollica V. et al. Prognostic and predictive biomarkers for immunotherapy in advanced renal cell carcinoma. *Nat Rev Urol* 2023;20(3):133–57. DOI: 10.1038/s41585-022-00676-0
27. Kraus R.F., Gruber M.A. Neutrophils-from bone marrow to first-line defense of the innate immune system. *Front Immunol* 2021;12:1–35. DOI: 10.3389/fimmu.2021.767175
28. Kanamaru R., Ohzawa H., Miyato H. et al. Low density neutrophils (LDN) in postoperative abdominal cavity assist the peritoneal recurrence through the production of neutrophil extracellular traps (NETs). *Sci Rep* 2018;8(1):632. DOI: 10.1038/s41598-017-19091-2
29. Risso V., Lafont E., LeGallo M. Therapeutic approaches targeting CD95L/CD95 signaling in cancer and autoimmune diseases. *Cell Death Dis* 2022;13(3):248. DOI: 10.1038/s41419-022-04688-x
30. Macher-Goeppinger S., Bermejo J.L., Wagener N. et al. Expression and prognostic relevance of the death receptor CD95 (Fas/APO1) in renal cell carcinomas. *Cancer Lett* 2011;301(2):203–11. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.12.005
31. Nonomura N., Nishimura K., Ono Y. et al. Soluble Fas in serum from patients with renal cell carcinoma. *Urology* 2000;55(1):151–5. DOI: 10.1016/s0090-4295(99)00379-9
32. Dominguez-Luis M.J., Maria Jesus E., Herrera-García A. et al. L-selectin expression is regulated by CXCL8-induced reactive oxygen species produced during human neutrophil rolling. *Eur J Immunol* 2019;49(3):386–97. DOI: 10.1002/eji.201847710
33. Chandrasekaran D., Sundaram S., Maheshkumar K. et al. Preoperative neutrophil-lymphocyte ratio/platelet-lymphocyte ratio: a potential and economical marker for renal cell carcinoma. *J Cancer Res Ther* 2022;18(6):1635–9. DOI: 10.4103/jcrt.JCRT_482_20
34. Sejima T., Iwamoto H., Morizane S. The significant immunological characteristics of peripheral blood neutrophil-to-lymphocyte ratio and Fas ligand expression incidence in nephrectomized tumor in late recurrence from renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2013;31(7):1343–9. DOI: 10.1016/j.urolonc.2011.09.008
35. Потанев М.П., Гушина Л.М., Мороз Л.А. Фенотипическая и функциональная гетерогенность субпопуляций нейтрофилов в норме и при патологии. *Иммунология* 2019;40 (5):84–96. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15009
- Potapnev M.P., Gushina L.M., Moroz L.A. Phenotypic and functional heterogeneity of neutrophil subpopulations in normal and pathological conditions. *Immunologiya = Immunology* 2019; 40 (5):84–96. (In Russ.). DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15009
36. Lai X., Gu Q., Zhou X. et al. Decreased expression of CD63 tetraspanin protein predicts elevated malignant potential in human esophageal cancer. *Oncol Lett* 2017;13(6):4245–51. DOI: 10.3892/ol.2017.6023

Вклад авторов

И.Р. Мягдиева: пробоподготовка биоматериала, выполнение проточной цитометрии, поиск литературы по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста статьи;

Т.В. Абакумова: разработка концепции и дизайна исследования, написание текста статьи, научное руководство исследованием;

Д.Р. Долгова: подбор моноклональных антител, написание раздела «Материалы и методы», выполнение проточной цитометрии;

О.Ю. Горшков: подбор групп пациентов, сбор клинических данных;

Т.П. Генинг: написание текста статьи, редактирование;

Р.Ш. Зайнеева: поиск литературы по теме статьи, анализ полученных данных;

С.А. Тимофеева: пробоподготовка биоматериала.

Authors' contributions

I.R. Myagdieva: sample preparation of biomaterial, performing flow cytometry, searching literature on the topic of the article, analyzing the data obtained, article writing;

T.V. Abakumova: developing the concept and design of the study, article writing, scientific guidance of the study;

D.R. Dolgova: selection of monoclonal antibodies, writing the section “Materials and methods”, performing flow cytometry;

O.Yu. Gorshkov: selection of patient groups, collection of clinical data;

T.P. Gening: article writing, editing;

R.Sh. Zayneeva: literature search on the topic of the article, analysis of the data obtained;

S.A. Timofeeva: sample preparation of biomaterial.

ORCID авторов/ ORCID of authors

И.Р. Мягдиева / I.R. Myagdieva: <https://orcid.org/0000-0002-3908-0840>

Т.В. Абакумова / T.V. Abakumova: <https://orcid.org/0000-0001-7559-5246>

Д.Р. Долгова / D.R. Dolgova: <https://orcid.org/0000-0001-5475-7031>

О.Ю. Горшков / O.Yu. Gorshkov: <https://orcid.org/0009-0000-8641-2580>

Т.П. Генинг / T.P. Gening: <https://orcid.org/0000-0002-5117-1382>

Р.Ш. Зайнеева / R.Sh. Zayneeva: <https://orcid.org/0000-0002-7784-2404>

С.А. Тимофеева / S.A. Timofeeva: <https://orcid.org/0009-0003-5315-410X>

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 conducted without sponsorship.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Института медицины, экологии и физической культуры ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (протокол № 1 от 15.01.2020).

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 Ulyanovsk State University (protocol No. 1 dated 15.01.2020).

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

Статья поступила: 30.10.2024. **Принята к публикации:** 28.04.2025. **Опубликована онлайн:** 23.06.2025.

Article submitted: 30.10.2024. **Accepted for publication:** 28.04.2025. **Published online:** 23.06.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-112-121>

Потенциальная противоопухолевая активность нового алкалоида растительного происхождения, выделенного из *Petasites hybridus* (L.), *in silico* и *in vitro*

Е.Ю. Златник¹, С.Ю. Филиппова¹, Я.С. Енин¹, Т.В. Чембарова¹, Ф.Ф. Амирджанов², О.Н. Буров², А.Д. Загребаев², К.А. Онасенко², Ю.В. Дзигунова²

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

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

Контакты: Елена Юрьевна Златник elena-zlatnik@mail.ru

Введение. В основе некоторых цитостатиков лежат продукты растительного происхождения. Разработка новых противоопухолевых средств на основе метаболитов растений является перспективным и актуальным направлением в онкологии. Ранее путем экстракции из корневищ белокопытника гибридного (*Petasites hybridus* (L.)) мы получили соединение, которое расшифровано и идентифицировано как индольный алкалоид P1, близкий по строению к коринану.

Цель исследования – определение возможности связывания алкалоида, выделенного из *Petasites hybridus* (L.), с молекулярными мишенями, обуславливающими канцерогенез и опухолевый рост, оценка его действия на состояние культур опухолевых и нормальных клеток.

Материалы и методы. Исследование проведено *in silico* методом молекулярного докинга и *in vitro* культуральными методами. Молекулярный докинг алкалоида P1 с рецепторами эпидермального фактора роста (EGFR), тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), MET, MRP2 и NOX4 выполнен с использованием программного обеспечения AutoDock Vina 4.0. Сетка области докинга построена в программе AutoDockTools 1.5.7. Культуральные исследования проводили на культуре опухолевых высокоэкспрессирующих EGFR (H1299) и неопухолевых (нормальные фибробласты легкого) клеток человека. Клетки культивировали с различными концентрациями алкалоида, их жизнеспособность оценивали с помощью ХТТ-теста и метода прямого подсчета живых и погибших клеток.

Результаты. Максимальный показатель энергии связывания P1 с молекулярными мишенями получен для MET (–8,6 ккал/моль), минимальный – для NOX4 (–5,9 ккал/моль). Энергия связывания P1 с EGFR составила –6,4; с PDGFR –7,2; с MRP2 –6,3 ккал/моль. Связывание P1 происходило с аминокислотными остатками активных центров большинства исследованных рецепторов.

Алкалоид P1 способен подавлять рост культуры аденокарциномы легкого H1299 в широком диапазоне концентраций более активно, чем в культуре нормальных фибробластов легкого: концентрация полумаксимального ингибирования P1 составила 127,24 и 256,29 мкмоль/л соответственно. Максимальные различия количества погибших клеток линии H1299 по сравнению с фибробластами наблюдались при концентрациях алкалоида 21,7–87 мкмоль/л, однако, несмотря на признаки нарушения митоза в виде наличия крупноядерных и многоядерных клеток культуры H1299 при действии алкалоида, митотический индекс не менялся.

Заключение. Алкалоид, выделенный из белокопытника гибридного, способен связываться с мишенями, опосредующими опухолевый рост, повреждает клетки культуры аденокарциномы легкого H1299. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования его возможного противоопухолевого действия на моделях *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: алкалоид растительного происхождения, *Petasites hybridus* (L.), молекулярный докинг, рецептор, культура опухолевых клеток, опухолевый рост

Для цитирования: Златник Е.Ю., Филиппова С.Ю., Енин Я.С. и др. Потенциальная противоопухолевая активность нового алкалоида растительного происхождения, выделенного из *Petasites hybridus* (L.), *in silico* и *in vitro*. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(2):112–21.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-112-121>

Potential antitumor activity of a new plant-derived alkaloid isolated from *Petasites hybridus* (L.), *in silico* and *in vitro*

E.Yu. Zlatnik¹, S.Yu. Filippova¹, Ya.S. Enin¹, T.V. Chembarova¹, F.F. Amirdzhanov², O.N. Burov², A.D. Zagrebaev², K.A. Onasenkov², Yu.V. Dziganova²

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

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

Contacts: Elena Yurievna Zlatnik elena-zlatnik@mail.ru

Introduction. Some cytostatic drugs are based on the compounds of plant origin. Development of the new plant metabolites-derived antitumor drugs is an actual and perspective trend in oncology. Recently we isolated a compound from the rhizome of *Petasites hybridus* (L.) and identified it as a corynan-like indole alkaloid P1.

Aim. To identify of the possibility of the *Petasites hybridus* (L.)-derived alkaloid to bind with molecular targets mediating carcinogenesis and tumor growth and the assessment of its effect on tumor and normal cell cultures.

Materials and methods. The research was performed *in silico* by molecular docking and *in vitro* by cultural methods. Molecular docking of alkaloid P1 with receptors of epidermal growth factor (EGFR), platelet growth factor (PDGFR), MET, MRP2 and NOX4 was carried out using software AutoDock Vina 4.0. The docking area grid was built in AutoDockTools 1.5.7. Cultural experiments were performed on tumor cell line highly expressing EGFR (H1299) and normal lung fibroblasts. Cells were cultured with various concentrations of the alkaloid, their viability was assessed in XTT-test and by direct count of alive and dead cells.

Results. Maximal binding energy of alkaloid P1 with molecular targets was noted for MET (–8,6 kcal/M), minimal – for NOX4 (–5,9 kcal/M). Binding energy of alkaloid P1 with EGFR was –6,4; with PDGFR –7,2; with MRP2 –6,3 kcal/M. Binding of alkaloid P1 occurred with the amino acid residues of the active centers of the majority of the studied receptors. Alkaloid showed the ability to inhibit the growth of H1299 cell line (lung adenocarcinoma) in the wide range of concentrations more actively than of normal fibroblasts: half-maximal inhibitory concentration for P1 was 127,24 and 256,29 μM/l respectively. Maximal difference of the dead cells amount between H1299 line and fibroblasts was observed in alkaloid concentrations 21,7–87 μM/l, but, in spite of some signs of mitotic failure (multinucleate and giantnucleate H1299 cells) mitotic index did not change.

Conclusion. Alkaloid isolated from the rhizome of *Petasites hybridus* (L.) is able to bind with the targets mediating tumor growth and impairs lung adenocarcinoma H1299 cells. Further research is necessary for detailed study of its` antitumor effect in *in vitro* and *in vivo* models.

Keywords: plant-derived alkaloid, *Petasites hybridus* (L.), molecular docking, receptors, tumor cell line, tumor growth

For citation: Zlatnik E.Yu., Filippova S.Yu., Enin Ya.S. et al. Potential antitumor activity of a new plant-derived alkaloid isolated from *Petasites hybridus* (L.), *in silico* and *in vitro*. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(2):112–21. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-112-121>

ВВЕДЕНИЕ

Растения являются источником различных биологически и фармакологически активных соединений, на основе которых уже созданы многочисленные лекарственные средства и продолжают разрабатываться новые, включая перспективные для лечения злокачественных опухолей. В онкологии применяется ряд химиопрепаратов, полученных из растений: актиномицин D, антрациклины (доксорубин, эпирубин, даунорубин), ингибиторы митоза (митомин C, блеомицин, колхицин, колхамин, винкристин, винбластин, таксол), ингибиторы топоизомеразы (камптотецин) [1, 2]. Показано, что противоопухолевая активность метаболитов растений (алкалоидов, полифенольных соединений) реализуется через взаимодействие с молекулярными мишенями, включая рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и его сигнальные пути, считающиеся ключевыми в регуляции роста клеток, канцерогенеза и опухолевой прогрессии.

Нередко развитие резистентности опухолей к ингибиторам EGFR [3] побуждает к поиску новых соединений, способных воздействовать на этот рецептор. Такая активность предсказана *in silico* и выявлена *in vitro* у некоторых компонентов растений, например у берберина и производных куркумы [4], хотя их широкое применение ограничено низкой биодоступностью [5].

Ранее путем экстракции из корневищ белокопытника гибридного (*Petasites hybridus* (L.)) мы получили соединение, которое расшифровано и идентифицировано с помощью библиотек NIST 2011, содержащих данные по алкалоидам и биологически активным соединениям. Его структурная формула, представленная на рис. 1, а, подтверждена методом ядерного магнитного резонанса на атомах водорода [6]. Полученное соединение оказалось индольным алкалоидом, близким (но не тождественным по строению) к коринану (PubChem CID 6857493), и получило рабочее название P1.

Поскольку для растительных алкалоидов описана способность модулировать активность рецепторов и кодирующих их генов, обеспечивающих пролиферацию, инвазию и химиорезистентность опухолевых клеток [7], и указывается на множественность таких мишеней [8], представляется важным изучить связывание выделенного соединения с соответствующими рецепторами, тем более что оно относится к индольным алкалоидам, некоторые из которых обладают противоопухолевой активностью [9].

Цель исследования — определение возможности связывания алкалоида, выделенного из *Petasites hybridus* (L.), с молекулярными мишенями, обуславливающими канцерогенез и опухолевый рост, оценка его действия на состояние культур опухолевых и нормальных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярные методы

Исследование проведено *in silico* методом молекулярного докинга исследуемого алкалоида с 5 рецепторами — EGFR (AlphaFoldDB), рецептором тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) (AlphaFoldDB P00533), MET (AlphaFoldDB P08581), MRP2 (PDB ID 8IZR) и NOX4 (AlphaFoldDB Q9NPH5), который выполнен с использованием программного обеспечения AutoDock Vina 4.0. Структуры PDB импортированы в Discovery Studio Visualizer 4.0, после чего из них были удалены молекулы воды, посторонние лиганды и гетероатомы. Структуры AlphaFoldDB уже были очищены. Они оптимизированы перед докингом с использованием Chimera 1.6.2. Полученные файлы формата .pdb проверены с помощью сервера PROCHECK (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>) и выровнены с исходной структурой, чтобы исключить визуальные аномалии в структуре. Эти оптимизированные файлы использованы для подготовки сетки в AutoDockTools 1.5.7. Связывающий сайт каждого рецептора был определен по данным литературы, сетки подготовлены соответствующим образом, в результате чего файлы сохранены в формате .pdbqt.

В качестве лиганда использован алкалоид P1, формула которого представлена на рис. 1, а. Файл с его структурой конвертирован в формат .pdb с использованием молекулярного редактора Chem3D 16.0. Лиганд дополнительно импортирован в AutoDockTools 1.5.7, и к нему добавлены атомы водорода. Затем лиганд сохранен в формате .pdbqt. Докинг выполнен через командную строку Linux Ubuntu с расстоянием между точками сетки 0.375 Å и значением экзактивности 8. Выходные данные проанализированы с помощью визуализатора Discovery Studio Visualizer 4.0.

Культуральные методы

В работе использовали постоянную культуру клеток аденокарциномы легкого человека H1299 и первичную культуру нормальных фибробластов легкого

человека (НФЛЧ). Культуру H1299 выращивали при 37 °C и 5 % CO₂ в полной питательной среде (ППС) RPMI1640 (Gibco, США) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), 1 % глутамина (Gibco, США), 1 % NEAA (Gibco, США) и 1 % гентамицина.

Нормальные фибробласты, взятые в качестве неопухолевой (контрольной) культуры, получены из неизмененной ткани легкого, удаленной при лобэктомии, проведенной по поводу лечения рака легкого в отделении торакальной хирургии Национального медицинского исследовательского центра онкологии (г. Ростов-на-Дону). После получения операционного образца его подвергали ферментации в растворе коллагеназы 1-го типа (300 ед/мл) («ПанЭко», Россия) в среде DMEM (глюкоза 25 ммоль/л) (Servicebio, Китай) в течение 1 ч при 37 °C. Полученную клеточную суспензию дважды отмывали в среде DMEM (глюкоза 25 ммоль/л) (Servicebio, Китай) и высаживали на культуральный флакон в полной питательной среде DMEM (глюкоза 25 ммоль/л) (Servicebio, Китай) с добавлением 20 % FBS (Hyclone, США), 1 % гентамицина («Биолот», Россия), 1 % глутамина («Биолот», Россия) и инкубировали при 37 °C и 5 % CO₂. На момент исследования клетки находились на 5-м пассаже.

Определение жизнеспособности. Клетки культур аденокарциномы легкого H1299 и НФЛЧ высаживали на 96-луночный планшет в количестве 5×10^3 клеток на лунку в 100 мкл в соответствующую культуру ППС. После адгезии клеток ко дну планшета среду культивирования заменяли на ППС без содержания фенолового красного с добавлением исследуемого алкалоида в серии двукратных разведений в диапазоне концентраций от 2,72 до 348 мкмоль/л. В контрольные лунки вносили ППС без содержания тестируемого соединения. Планшеты культивировали при 37 °C и 5 % CO₂ в течение 72 ч. По окончании культивирования проводили ХТТ-тест по общепринятой методике [10]. Для учета показаний оптической плотности при 450 нм использовали планшетный ридер Infinite® M Nano Plus (Tecan, Швейцария). Жизнеспособность клеток определяли как отношение оптической плотности в опытных лунках к оптической плотности в контрольных лунках, выраженное в процентах. Опыт повторяли 3 раза. Построение кривых доза — ответ и определение показателя концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) проводили с помощью онлайн-инструмента IC₅₀ Calculator (Quest Graph™ IC50 Calculator, AAT Bioquest, Inc., 13 Feb. 2025, <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>).

Прямое определение содержания мертвых клеток в культуре. Культуры H1299 и НФЛЧ высаживали по 5×10^5 клеток на флаконы T25 (Nest, КНР) в соответствующей ППС. Далее в среду вносили тестируемое соединение в серии двукратных разведений (от 10,88 до 174 мкмоль/л). В контрольных пробах оставляли ППС без добавления исследуемого алкалоида. Клетки

культивировали при 37 °C и 5 % CO₂ в течение 72 ч, затем снимали со дна флакона по стандартной методике с использованием 0,25 % раствора трипсина-версена 1:1 («БиолоТ», Россия) и определяли количество живых и мертвых клеток на счетчике EVE (NanoEntek, Южная Корея) с окрашиванием клеток 0,4 % раствором трипанового синего («БиолоТ», Россия). Всего выполнено 5 повторов для каждого варианта опыта.

Определение митотического индекса. Клетки исследуемых культур высаживали по 50 тыс. клеток на лунку 24-луночного планшета в соответствующей культуре ППС. После адгезии клеток ко дну планшета среду культивирования заменяли на ППС с добавлением 348 и 21,7 мкмоль/л тестируемого алкалоида, после чего культивировали в течение 72 ч. По окончании эксперимента клетки фиксировали в 4 % растворе параформа и окрашивали Hoechst 33342 (Life Technologies, США). Визуализацию клеток осуществляли на имиджере Lionheart FX (BioTek, США) и определяли количество клеток на разных стадиях клеточного цикла с использованием встроенного программного обеспечения. Всего отсмотрено 30 полей зрения для каждого варианта опыта. Митотический индекс подсчитывали как долю делющихся клеток от общего числа клеток.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных и построение графиков проводили с помощью программного обеспечения MS Excel. Результаты

оценки жизнеспособности клеток представлены в виде процентов от показателей контрольных проб. Поскольку по критерию Шапиро–Уилка распределение показателей было нормальным, их выражали в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение. Достоверность разницы между средними значениями оценивали с применением *t*-критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При изучении энергии связывания алкалоида P1 с молекулярными мишенями максимальный показатель получен для связывания с MET (–8,6 ккал/моль), минимальный – с NOX4 (–5,9 ккал/моль). Энергия связывания коринана с EGFR составила –6,4; с PDGFR –7,2; с MRP2 –6,3 ккал/моль.

В табл. 1 и на рис. 1, 2 представлены количество и характеристика связей лиганда (исследованного алкалоида) с рецепторами, вовлеченными в канцерогенез и опухолевый рост, а также остатков аминокислот, участвующих в формировании этих связей.

Согласно полученным данным исследуемый алкалоид P1 образует комплекс с EGFR, связываясь с аминокислотным остатком активного центра Фен723 (см. рис. 1, б). В образовании комплекса 1 обычная водородная связь обеспечивалась Глут762, 3 π -алкильных связи – Фен723, Лей747 и Ала755; силами Ван-дер-Ваальса связывались

Таблица 1. Типы связей исследованного алкалоида с рецепторами, вовлеченными в канцерогенез и опухолевый рост, и аминокислотные остатки, участвующие в его связывании с рецепторами

Table 1. Types of bonds between the studied alkaloid and receptors mediating carcinogenesis and tumor growth, and amino acid residues participating in its binding with the receptors

Мишень (рецептор) Target (receptor)	Аминокислотные остатки Amino acid residues	Взаимодействия Interactions
EGFR	Глут762 Glu762	Обычная водородная связь Normal hydrogen bond
	Фен723, Лей747, Ала755 Phe723, Leu747, Ala755	π -алкильные связи π -alkyl bonds
	Глут749, Глут758, Иле759, Гли857, Тир869 Glu749, Glu758, Ile759, Gly857, Tyr869	Силы Ван-дер-Ваальса Van der Waals forces
PDGFR	Фен845 Phe845	π - π -стэкинг π - π -stacking
	Лей606, Вал614, Ала848 Leu606, Val614, Ala848	π -алкильные связи π -alkyl bonds
	Асп850, Арг849, Гли607, Сер608, Тир771, Асп688, Гли687, Лей833 Asp850, Arg849, Gly607, Ser608, Tyr771, Asp688, Gly687, Leu833	Силы Ван-дер-Ваальса Van der Waals forces
MET	Мет1211, Иле1084, Вал1092, Лиз1110, Ала1108, Лей1157 Met1211, Ile1084, Val1092, Lys1110, Ala1108, Leu1157	Алкильные связи Alkyl bonds
	Арг1208 Arg1208	π -алкильная связь π -alkyl bond
	Мет1160, Арг1004, Гли1085, Тир1003, Асп1002, Асп1164, Асп1222 Met1160, Arg1004, Gly1085, Tyr1003, Asp1002, Asp1164, Asp1222	Силы Ван-дер-Ваальса Van der Waals forces

Окончание табл. 1
End of table 1

Мишень (рецептор) Target (receptor)	Аминокислотные остатки Amino acid residues	Взаимодействия Interactions
MRP2	Тир703, Три646 Tyr703, Trp646	π-π-стэкинг π-π-stacking
	Глн706 и Асп785 Gln706 and Asp785	Углерод-водородные связи Carbon-hydrogen bonds
	Сер678, Глн707, Сер682, Лей685, Глу687, Про1171 Ser678, Gln707, Ser682, Leu685, Glu687, Pro1171	Силы Ван-дер-Ваальса Van der Waals forces
NOX4	Вал267, Лей239, Иле227 Val267, Leu239, Ile227	Алкильные связи Alkyl bonds
	Лиз265 Lys265	π-алкильная связь π-alkyl bond
	Фен243 Phe243	π-σ-связь π-σ-bond
	Тре232, Про240 Thr232, Pro240	Силы Ван-дер-Ваальса Van der Waals forces

Примечание. EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; PDGFR – рецептор тромбоцитарного фактора роста.
Note. EGFR – epidermal growth factor receptor; PDGFR – platelet growth factor receptor.

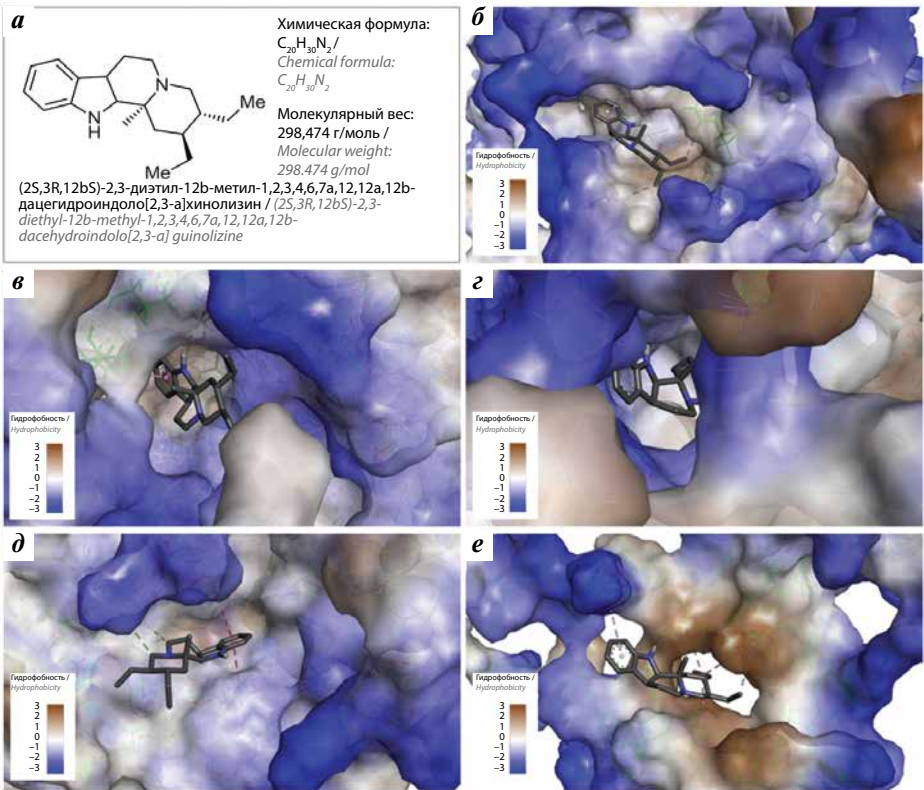


Рис. 1. Трехмерное изображение комплексов алкалоида P1 с молекулярными мишенями. Структурные формулы алкалоида P1 (а), P1–EGFR (б), P1–PDGFR (в), P1–MET (г), P1–MRP2 (д) и P1–NOX4 (е). Гидрофобная поверхность рецептора отмечена коричневым цветом, гидрофильная – синим. Пунктирными линиями обозначены связи между лигандом и рецептором
Fig. 1. Three-dimensional image illustrating complexes of alkaloid P1 with molecular targets. Structural formulas of alkaloid P1 (a), P1–EGFR (б), P1–PDGFR (в), P1–MET (г), P1–MRP2 (д) and P1–NOX4 (е). The hydrophobic surface of the receptor is shown in brown, and the hydrophilic surface is shown in blue. The dotted lines indicate the bonds between the ligand and the receptor

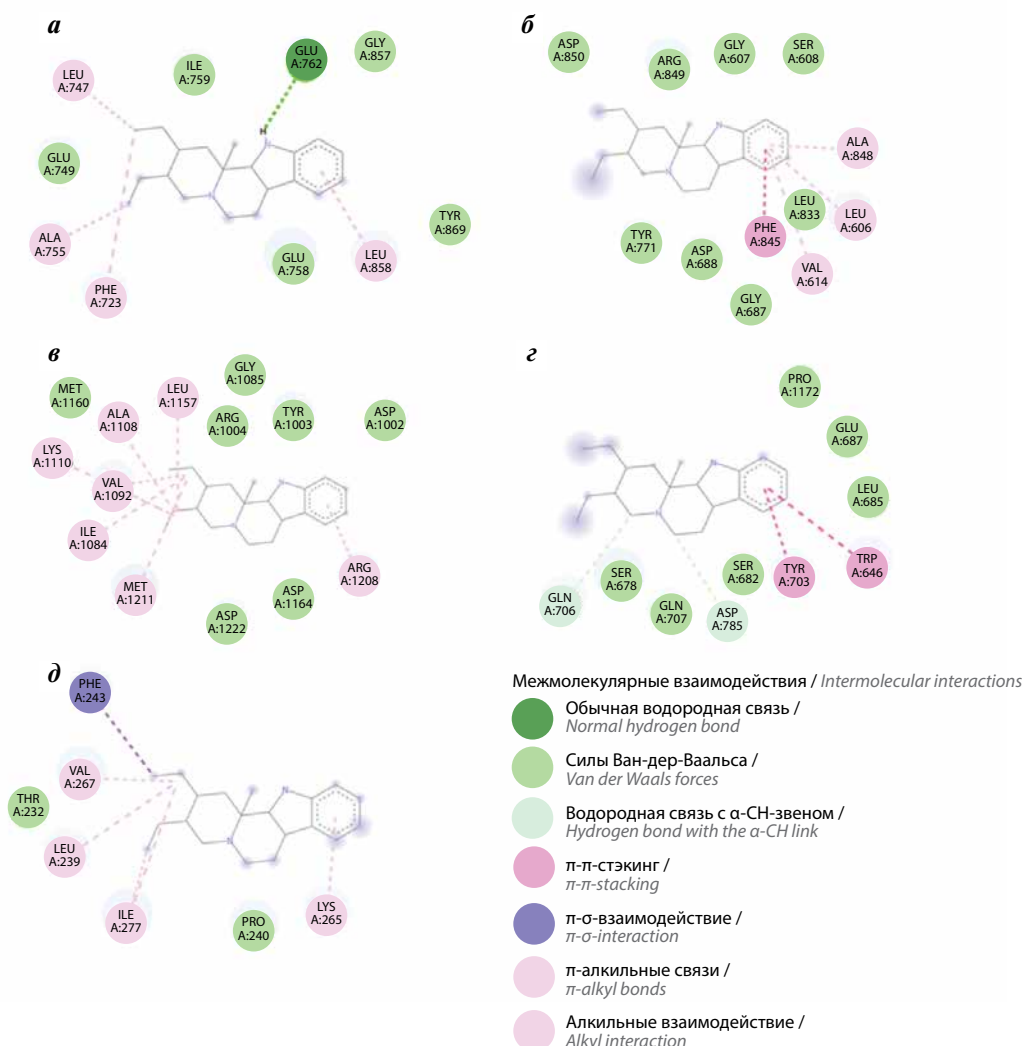


Рис. 2. Взаимодействия в комплексах P1–EGFR (а), P1–PDGFR (б), P1–MET (в), P1–MRP2 (г) и P1–NOX4 (д). D2-диаграммы. Пунктирными линиями обозначены связи между лигандом и рецептором

Fig. 2. Interactions in the complexes P1–EGFR (a), P1–PDGFR (б), P1–MET (в), P1–MRP2 (г) and P1–NOX4 (д). 2D diagrams. The dotted lines indicate the bonds between the ligand and the receptor

Глу749, Глу758, Иле759, Гли857 и Тир869 (см. рис. 2, а). Исследуемое соединение связывалось с остатками аминокислот активного центра PDGFR Лей606, Гли607, Сер608, Гли609 и Вал616 (см. рис. 2, б). Предсказаны типы связей в комплексе P1–PDGFR: π - π -стэкинг с Фен845; 3 π -алкильных связи с Лей606, Вал614 и Ала848; Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия с Асп850, Арг849, Гли607, Сер608, Тир771, Асп688, Гли687 и Лей833 (см. рис. 2, б). Наиболее прочно алкалоид P1 связывался с активным центром MET (см. рис. 1, г), образуя 6 алкильных связей с Мет1211, Иле1084, Вал1092, Лиз1110, Ала1108 и Лей1157, 1 π -алкильную связь с Арг1208, а также силами Ван-дер-Ваальса — с Мет1160, Арг1004, Гли1085, Тир1003, Асп1002, Асп1164 и Асп1222 (см. рис. 2, в). На поверхности помпы MRP2 исследуемый лиганд связался с остатками Вал637, Сер678 и Лиз677, формирующими активный центр белка-рецептора (см. рис. 1, д). Для комплекса P1–MRP2 предсказаны следующие связи: π - π -стэкинг с Тир703 и Три646; углерод-

водородные связи с Гли706 и Асп785, взаимодействия Ван-дер-Ваальса с Сер678, Гли707, Сер682, Лей685, Глу687 и Про1171 (см. рис. 2, г). Связывание алкалоида с NOX4 было рассчитано в области, необходимой для каталитической активности генерации H_2O_2 (см. рис. 1, е). Для данного комплекса характерны алкильные связи с Вал267, Лей239 и Иле227, π -алкильная связь с Лиз265, π - σ -связь с Фен243 и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия с Тре232 и Про240 (см. рис. 2, д).

Поскольку результат связывания лиганда с рецепторами клеток может быть различным, особенно при множественности таких взаимодействий (т. е. вероятна как стимуляция, так и угнетение их активности), для оценки влияния такого связывания на состояние опухолевых клеток проведено сравнение влияния инкубации с алкалоидом P1 на культуру H1299 и на неопухолевые клетки (НФЛЧ) (см. рис. 3).

Жизнеспособность клеток культуры H1299 оказалась статистически значимо ниже, чем клеток культуры

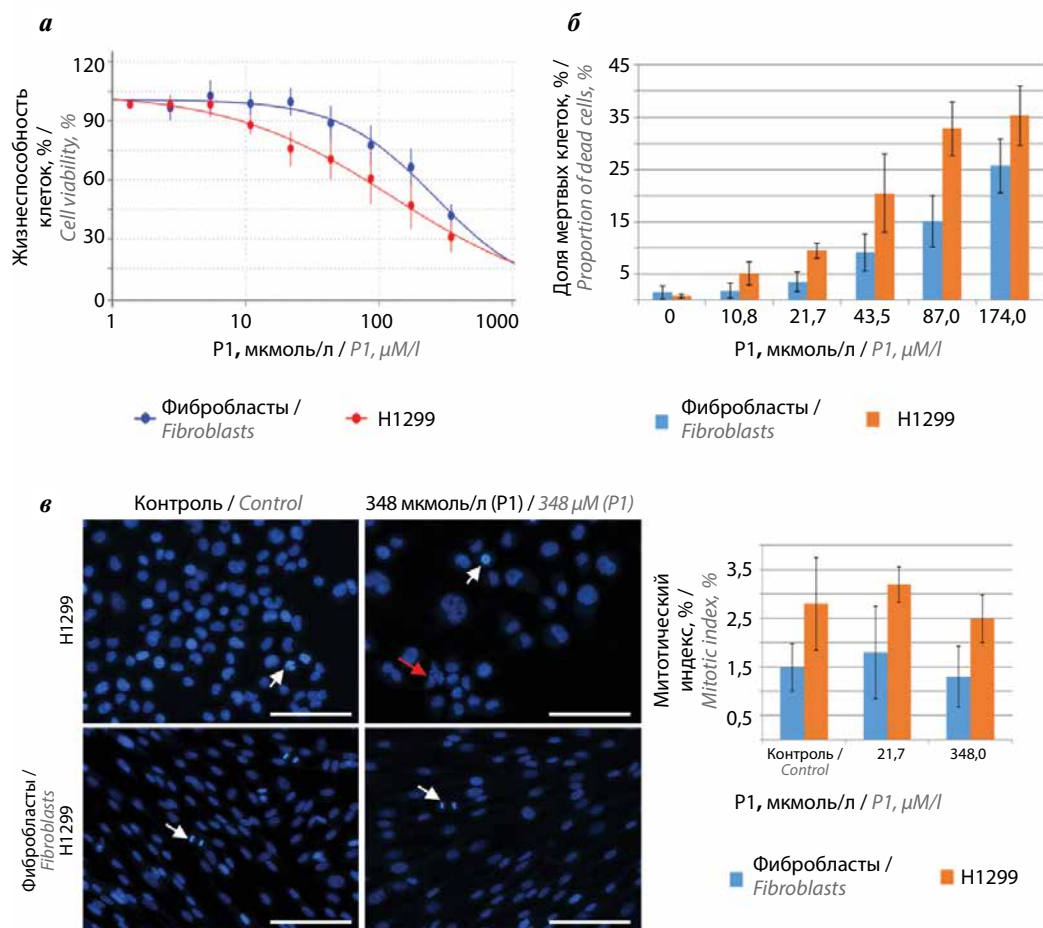


Рис. 3. Влияние алкалоида P1 на жизнеспособность культур H1299 и нормальных фибробластов легкого человека, среднее значение $\pm$ стандартное отклонение: а — содержание живых клеток, % от контроля (ХТТ-тест), б — кривая доза — ответ; в — процент погибших клеток (прямой подсчет). Экспозиция 72 ч. Митотический индекс рассчитан по фото ядер, окрашенных Hoechst 33342. Размер масштабной линейки 100 мкм
Fig. 3. Effect of alkaloid P1 on the viability of H1299 cultures and normal human lung fibroblasts, average value $\pm$ standard deviation: а — content of living cells, % of control (XTT test), б — dose-response curve; в — percentage of dead cells (direct cell count) (в). Exposure 72 h. Mitotic index calculated from a photo of nuclei stained with Hoechst 33342. The scale bar size is 100 μm

НЛФЧ. Значение IC_{50} алкалоида P1 для культуры H1299 составило 127,24 мкмоль/л, для культуры фибробластов — 256,29 мкмоль/л (см. рис. 3, а). Процент погибших клеток в культуре был статистически значимо выше при концентрациях алкалоида выше 10,88 мкмоль/л, с наибольшей разницей (на 11–17 %) в диапазоне концентраций 21,7–87 мкмоль/л (см. рис. 3, б).

При высокой концентрации исследуемого алкалоида количество клеток в обеих культурах значительно уменьшалось, при этом морфология ядер в культуре НЛФЧ оставалась неизменной, а в культуре H1299 отмечались признаки нарушения митоза, о чем говорит наличие крупноядерных и многоядерных клеток (см. рис. 3, в, красная стрелка). Подсчет количества делящихся клеток в культуре (см. рис. 3, в, белые стрелки) тем не менее показал, что митотический индекс в обеих культурах

значимо не менялся, несмотря на общее сокращение количества клеток (см. рис. 3, в). В обеих культурах также не наблюдались признаки апоптоза, такие как конденсация хроматина и фрагментация ядер даже при высокой концентрации алкалоида P1.

По-видимому, исследуемый алкалоид проявляет цитостатический и цитотоксический, хотя и не связанный с апоптозом, эффекты в отношении как нормальных, так и опухолевых клеток, однако в последнем случае его действие статистически значимо более выражено и наблюдается в широком диапазоне концентраций. Это говорит о более высокой чувствительности к нему злокачественных клеток и представляет важным в плане перспективы его дальнейшего тестирования как соединения с противоопухолевой активностью.

ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе описано связывание наиболее подробно исследованного растительного алкалоида берберина с EGFR и АКТ в клетках линий рака молочной железы с энергией связывания от $-7,57$ до $-7,92$ ккал/моль, сопровождающееся угнетением их активности [11]. Данных по связыванию берберина с онкогеном PDGFR и MRP2, обеспечивающим полирезистентность к ксенобиотикам, не найдено. По остальным из исследованных нами рецепторам встречаются единичные сведения. Так, сообщается о возможности берберина связываться с MET клеток рака молочной железы с энергией $-9,4$ ккал/моль [12] и его способности понижать экспрессию NOX4, стимулированную пальмитатом, в клетках пуповинной крови [13]. Авторы указывают на существенные ограничения полученных данных об энергии связывания берберина с другими мишенями, значимыми для метаболизма опухолевых клеток (FOXO3, Nrf2, NQO1, Gpx4, PIK3CA, Gpx), так как неизвестно, насколько такое связывание соответствует биологическим эффектам соединения и насколько взаимодействие с мишенью зависит от дозы лиганда [14].

Полученные нами данные о величине энергии связывания алкалоида P1 с исследованными рецепторами в целом соответствуют данным по берберину. Результаты исследований, согласно которым значения этого показателя ниже -5 ккал/моль указывают на тесную связь лиганда и рецептора [15], позволяют предположить, что связывание алкалоида P1 с исследованными рецепторами является прочным. Данные молекулярных исследований *in silico* целесообразно подтвердить *in vitro* культуральными методами, что и было сделано нами при оценке действия исследуемого соединения на состояние культуры H1299. Линия H1299 характеризуется высоким уровнем экспрессии EGFR [16], принадлежащего к семейству тирозинкиназных рецепторов и связанного с различными сигнальными путями, включая те, в которых участвуют исследованные нами молекулярные факторы PDGFR, MET и NOX4 [17, 18].

Они рассматриваются как рецепторы, ингибируя которые в результате связывания с ними в области активных центров, алкалоид P1 предположительно может проявлять противоопухолевое действие и/или способность восстанавливать чувствительность опухолевых клеток к ингибиторам EGFR. Наиболее высокие показатели аффинности установлены при исследовании связи алкалоида P1 с MET, что может свидетельствовать об опосредованном через него действии на EGFR. Согласно данным литературы, MET способен связываться с берберином более эффективно, чем с таргетным анти-EGFR-препаратом осимертинибом, что демонстрирует важность воздействия на этот рецептор, опосредующий проонкогенную активность EGFR [19]. Возможно, подобным действием обладает и исследованный нами алкалоид. Выявленное с помощью культуральных методов наличие у него цитостатических/цитотоксических свойств позволяет рассматривать его в качестве потенциально перспективного противоопухолевого средства, мишенями для которого могут быть рецепторы, обеспечивающие химиорезистентность и участвующие в тирозинкиназном пути, от которого зависит деление клеток [20].

Для более полного представления о потенциальном противоопухолевом эффекте алкалоида P1 следует изучить его действие на другие мишени, участвующие в пролиферации, и расширить спектр применяемых моделей. Ограничениями данного исследования являются использование недостаточного количества клеточных линий, а также первичных фибробластов, в качестве неопухолевых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Алкалоид, выделенный из *Petasites hybridus* (L.), способен связываться с мишенями, опосредующими опухолевый рост, повреждает клетки культуры аденокарциномы легкого H1299. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования его возможного противоопухолевого действия на моделях *in vitro* и *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mushtaq S., Abbasi B.H., Uzair B., Abbasi R. Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents. *EXCLI J* 2018;4(17):420. DOI: 10.17179/excli2018-1174
- Кит О.И., Жукова Г.В., Толкачев О.Н. и др. Противоопухолевые факторы природного происхождения и некоторые подходы к разработке эффективных схем фитотерапии в онкологии (обзор литературы с включением результатов собственных исследований). *Вопросы онкологии* 2022;68(5):27–38. Kit O.I., Zhukova G.V., Tolkahev O.N. et al. Antitumor factors of natural origin and some approaches to the development of effective regimens of phytotherapy in oncology (literature review including the findings of authors' own research). *Voprosy onkologii = Problems in Oncology* 2022;68(5):27–38. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-5-527-538
- Morgillo F., Della Corte C.M., Fasano M., Ciardiello F. Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: lung cancer. *ESMO Open* 2016;1(3):e000060. DOI: 10.1136/esmoopen-2016-000060
- Du H., Gu J., Peng Q. et al. Berberine suppresses EMT in liver and gastric carcinoma cells through combination with TGFβR regulating TGF-β/Smad pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2021;18(21):2337818. DOI: 10.1155/2021/2337818
- Cosme P., Rodríguez A.B., Espino J., Garrido M. Plant phenolics: bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. *Antioxidants (Basel)* 2020;9(12):1263. DOI: 10.3390/antiox9121263
- Златник Е.Ю., Енин Я.С., Буров О.Н. и др. Молекулярно-клеточные аспекты воздействия вторичных метаболитов Барбари-

- са обыкновенного и Белокопытника гибридного на клеточную линию HeLa. Исследования и практика в медицине 2023;10(4):31–47. DOI: 10.17709/2410-1893-2023-10-4-3
- Zlatnik E.Yu., Enin Ya.S., Burov O.N. et al. Molecular and cellular aspects of the impact of secondary metabolites from common barberry and hybrid goat's rue on the HeLa cell line. Issledovaniya i praktika v meditsine = Research'n Practical Medicine Journal 2023;10(4):31–47. (In Russ.). DOI: 10.17709/2410-1893-2023-10-4-3
7. Fu W., Liu L., Tong S. Berberine inhibits the progression of breast cancer by regulating METTL3-mediated m6A modification of FGF7 mRNA. Thorac Cancer 2024;15(17):1357. DOI: 10.1111/1759-7714.15321
8. Achi I.T., Sarbadhikary P., Blassan P.G., Abrahamse H. Multi-target potential of berberine as an antineoplastic and antimetastatic agent: a special focus on lung cancer treatment. Cells 2022;11(21):3433. DOI: 10.3390/cells11213433
9. Hassan S.M., Farid A., Panda S.S. et al. Indole compounds in oncology: therapeutic potential and mechanistic insights. Pharmaceuticals 2024;17(7):922. DOI: 10.3390/ph17070922
10. Roehm N.W., Rodgers G.H., Hatfield S.M., Glasebrook A.L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. J Immunol Methods 1991;142(2):257–65. DOI: 10.1016/0022-1759(91)90114-u
11. Jabbarzadeh K.P., Leong M.P., Ismail P., Ling K.H. Antitumor effects of berberine against EGFR, ERK1/2, P38 and AKT in MDA-MB231 and MCF-7 breast cancer cells using molecular modelling and in vitro study. Pharmacol Rep 2019;71(1):13. DOI: 10.1016/j.pharep.2018.07.005
12. Huang B., Wen G., Li R. et al. Integrated network pharmacology, bioinformatics, and molecular docking to explore the mechanisms of berberine regulating autophagy in breast cancer. Medicine (Baltimore) 2023;102(36):e35070. DOI: 10.1097/MD.00000000000035070
13. Zhang M., Wang C.M., Li J. et al. Berberine protects against palmitate-induced endothelial dysfunction: involvements of upregulation of AMPK and eNOS and downregulation of NOX4. Mediators Inflamm 2013;(4):260464. DOI: 10.1155/2013/260464
14. Sun A., Yang H., Li T. et al. Molecular mechanisms, targets and clinical potential of berberine in regulating metabolism: a review focussing on databases and molecular docking studies. Front Pharmacol 2024;15(6). DOI: 10.3389/fphar.2024.1368950
15. Hu M., Yan H., Li H. et al. Use of network pharmacology and molecular docking to explore the mechanism of action of curcuma in the treatment of osteosarcoma. Sci Rep 2023;13:9569. DOI: 10.1038/s41598-023-36687-z
16. Kang H.N., Kim S.H., Yun M.R. et al. ER2, a novel human anti-EGFR monoclonal antibody inhibit tumor activity in non-small cell lung cancer models. Lung Cancer 2016;5(95):57–64. DOI: 10.1016/j.lungcan.2016.02.013
17. Liu W.J., Wang L., Zhou F.M. et al. Elevated NOX4 promotes tumorigenesis and acquired EGFR-TKIs resistance via enhancing IL-8/PD-L1 signaling in NSCLC. Drug Resist Updat 2023;9(70):100987. DOI: 10.1016/j.drug.2023.100987
18. Pandey P., Khan F., Upadhyay T.K. et al. New insights about the PDGF/PDGFR signaling pathway as a promising target to develop cancer therapeutic strategies. Biomed Pharmacother 2023;161:114491. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114491
19. Chen Z., Vallega K.A., Chen H. et al. The natural product berberine synergizes with osimertinib preferentially against MET-amplified osimertinib-resistant lung cancer via direct MET inhibition. Pharmacol Res 2022;1(175):105998. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105998
20. Chin T.M., Boopathy G.T.K., Man E.P.S. et al. Targeting microtubules sensitizes drug resistant lung cancer cells to lysosomal pathway inhibitors. Theranostics 2020;10(6):2727–43. DOI: 10.7150/thno.38729

Благодарность. Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования ФГБУ «Национальный медицинский онкологический центр онкологии» Минздрава России (<https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742/>) за предоставление оборудования.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to the Center for Collective Use of the National Medical Oncological Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (<https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742/>) for providing the equipment.

Вклад авторов

Е.Ю. Златник: идея и организация исследования, анализ полученных данных, статистическая обработка данных, написание текста статьи;
С.Ю. Филиппова: анализ полученных данных, статистическая обработка данных, написание текста статьи;
Я.С. Енин: обработка результатов экспериментов, подготовка иллюстративного материала;
Т.В. Чембарова: культивирование культур клеток, редактирование;
Ф.Ф. Амирджанов: проведение молекулярного докинга;
О.Н. Буров: выделение исследуемого соединения, редактирование;
А.Д. Загребав: очистка исследуемого соединения, верификация соединения методом ядерно-магнитного резонанса;
К.А. Онасенко: проведение молекулярного докинга;
Ю.В. Дзигунова: сбор и определение видовой принадлежности растительного материала.

Authors' contributions

E.Yu. Zlatnik: the idea and organization of the study, the analysis of the data obtained, statistical data processing, article writing;
S.Yu. Filippova: analysis of the data obtained, statistical data processing, article writing;
Ya.S. Enin: processing of experimental results, preparation of illustrative material;
T.V. Chembarova: cell culture cultivation, editing;
F.F. Amirdzhanov: conducting molecular docking;
O.N. Burov: isolation of the investigated compound, editing;
A.D. Zagrebaev: purification of the investigated compound, verification of the compound by nuclear magnetic resonance;
K.A. Onasenko: conducting molecular docking;
Yu.V. Dziganova: collecting and determination of the species of plant material.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.Ю. Златник / E.Yu. Zlatnik: <https://orcid.org/0000-0002-1410-122X>
С.Ю. Филиппова / S.Yu. Filippova: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>
Я.С. Енин / Ya.S. Enin: <https://orcid.org/0000-0002-4572-1579>
Т.В. Чембарова / T.V. Chembarova: <https://orcid.org/0000-0002-4555-8556>
Ф.Ф. Амирджанов / F.F. Amirdzhanov: <https://orcid.org/0009-0008-1682-1344>
О.Н. Буров / O.N. Burov: <https://orcid.org/0000-0002-7704-033X>
А.Д. Загребаев / A.D. Zagrebaev: <https://orcid.org/0000-0001-5864-8991>
К.А. Онасенко / K.A. Onasenko: <https://orcid.org/0009-0003-6944-9690>
Ю.В. Дзигунова / Yu.V. Dzigunova: <https://orcid.org/0009-0002-5692-2576>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания «Поиск натуральных и синтетических вторичных метаболитов растений, обладающих противоопухолевыми и иммунокорригирующими свойствами на моделях *in vitro* и *in vivo*» (№ 124022100044-2 от 2024 г.).

Funding. The study was conducted as part of the state task “Search for natural and synthetic secondary plant metabolites with antitumor and immunocorrecting properties in *in vitro* and *in vivo* models” (No. 124022100044-2 dated 2024).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России (протокол № 7 от 17.02.2020).

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the committee on biomedical ethics of the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 7 dated 02.17.2020).