

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ

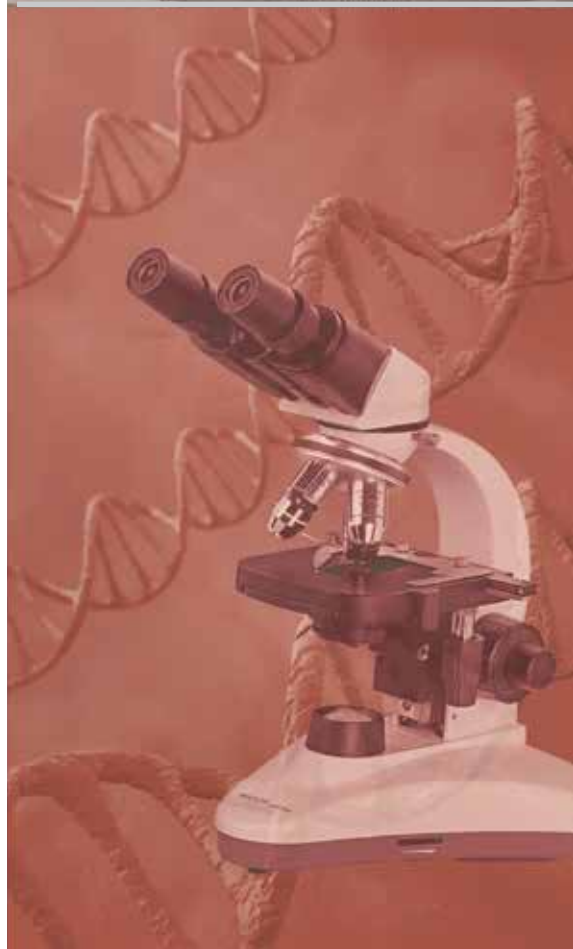


*Выявление и изучение
эпигенетически активных
ксенобиотиков*

*Матриксные металлопротеиназы
экзосом при колоректальном раке*

*Экспрессия PD-L1
и микросателлитная
нестабильность при неорганных
лейомиосаркомах*

*Риск онкологических заболеваний
у работников онкологического
центра*



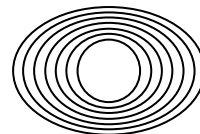
Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук.

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

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



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

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

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

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

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

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

3 ТОМ 6
'19

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

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

Прием статей:
онлайн на сайте

<http://umo.abvpress.ru/jour>
или по адресу adv.mol.onc@ronc.ru

Выпускающий редактор Н.В. Жукова
Корректор Т.Н. Помилуйко
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук

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

*Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору*

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

**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.
2019. Том 6. № 3. 1–72

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2019

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»

Тираж 1000 экз.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 имени П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

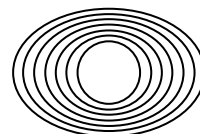
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

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

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

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

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



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

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

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

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

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

FOUNDED IN 2014

3 Vol. 6
'19

Founders:

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

Editorial Office:

Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Build. 15
Kashirskoe Shosse, Moscow
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19.
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru
Article submission: on-line
at <http://umo.abvpress.ru/jour>

or by e-mail
to adv.mol.onc@ronc.ru

Managing editor N.V. Zhukova
Proofreader T.N. Pomiluyko
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

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

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

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

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

**The editorial board is not responsible
for advertising content.**

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

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

Uspekhi molekulyarnoy
onkologii. 2019. Vol. 6
No. 3. 1—72

© PH "ABV-Press", 2019

Pressa Rossii catalogue
index: 93562

Printed at the Mediacolor LLC

1,000 copies

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

EXECUTIVE EDITOR

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

EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Информация для авторов

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

1. Общие правила

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

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

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

Последняя страница должна содержать:

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

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

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

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

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

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

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

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

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

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

- введение,
- цель,
- материалы и методы,
- результаты,
- обсуждение,
- заключение (выводы),
- вклад всех авторов в работу,
- конфликт интересов для всех авторов (в случае его отсутствия необходимо указать: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»),
- информированное согласие пациентов (для статей с авторскими исследованиями и описаниями клинических случаев),
- при наличии финансирования исследования – указать его источник (грант и т. д.),
- благодарности (раздел не является обязательным).

7. Иллюстративный материал

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

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

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

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

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

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

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

9. Список литературы

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

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

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

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

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

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

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

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

Общие положения:

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

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

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

*В.П. Максимова, П.Е. Бугаева, Е.М. Жидкова, О.Г. Усалка, Е.А. Лесовая,
Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов*

Современные подходы к выявлению и изучению эпигенетически активных ксенобиотиков 8

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*Н.В. Юнусова, Е.А. Замбалова, М.Р. Патышева, А.А. Димча,
О.В. Черемисина, С.Г. Афанасьев, И.В. Кондакова*

**Ассоциированные с полом и метаболическими нарушениями изменения
в уровне матричных металлопротеиназ в экзосомах при колоректальном раке 28**

*В.Е. Бугаев, М.П. Никулин, Н.И. Поспехова, В.М. Сафронова, Н.В. Кокосадзе,
Я.А. Божченко, С.Н. Неред, Л.Н. Любченко, И.С. Стилиди*

**Прогностическая значимость экспрессии PD-L1 и оценка статуса микросателлитной
нестабильности у пациентов с забрюшинными неорганными лейомиосаркомами 37**

Е.В. Каюкова, Т.Е. Белокриницкая, Л.Ф. Шолохов, П.П. Терешков

**Уровень некоторых гематологических воспалительных маркеров у больных
раком шейки матки в зависимости от морфологических особенностей первичной опухоли 49**

Е.Ю. Рыбалкина, О.Ю. Сусова, Т.Г. Мойжесс

**Исследование экспрессии цитокинов при подкожной имплантации
онкогенных и неонкогенных миллипоровых фильтров 57**

Л.Г. Соленова

Эпидемиологический мониторинг онкологического риска у работников онкологического центра 63

REVIEWS

- V.P. Maksimova, P.E. Bugaeva, E.M. Zhidkova, O.G. Usalka, E.A. Lesovaya,
G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov*
Modern approaches for the screening of epigenetically active xenobiotics. 8

EXPERIMENTAL REPORTS

- N.V. Yunusova, E.A. Zambalova, M.R. Patysheva, A.A. Dimcha,
O.V. Cheremisina, S.G. Afanas'ev, I.V. Kondakova*
**Changes of exosomal matrix metalloproteinases level in colorectal cancer associated
with sex and metabolic disturbance. 28**
- V.E. Bugaev, M.P. Nikulin, N.I. Pospekhova, V.M. Safronova, N.V. Kokosadze,
Ya.A. Bozhchenko, S.N. Nered, L.N. Lyubchenko, I.S. Stilidi*
**Prognostic significance of PD-L1 expression and evaluation of microsatellite instability status
in patients with retroperitoneal leiomyosarcomas. 37**
- E.V. Kayukova, T.E. Belokrinitskaya, L.F. Sholokhov, P.P. Tereshkov*
**The level of some blood serum inflammatory factors in depending on the morphological features
of the primary tumor of of cervical cancer. 49**
- E.Yu. Rybalkina, O.Yu. Susova, T.G. Moizhess*
**Differences in the profile of cytokine expression induced by implantation
of oncogenic and non-oncogenic millipore filters. 57**
- L.G. Solenova*
Epidemiological monitoring of cancer risk in cancer center workers. 63

Современные подходы к выявлению и изучению эпигенетически активных ксенобиотиков

В.П. Максимова¹, П.Е. Бугаева², Е.М. Жидкова¹, О.Г. Усалка², Е.А. Лесовая^{1,3},
Г.А. Белицкий¹, М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,4}

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

²ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

³ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова»; Россия, 390026 Рязань, ул. Высоковольтная, 9;

⁴ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Контакты: Кирилл Игоревич Кирсанов kkirsanov85@yandex.ru

Цель исследования — анализ существующих методических подходов к тестированию и изучению эпигенетической активности ксенобиотиков.

Материалы и методы. При подготовке обзора были использованы информационные базы биомедицинской литературы SciVerse Scopus (538), PubMed (746), Web of Science (625), РИНЦ (45). Для получения полнотекстовых документов использованы электронные ресурсы PubMed Central (PMC), Research Gate, РИНЦ, КиберЛенинка. В тексте обзора процитированы 87 современных публикаций (2010–2019 гг.), а также 17 статей основоположников анализируемых в обзоре методик, которые используются и в наши дни.

Результаты. В обзоре рассмотрены современные данные по основным закономерностям функционирования системы регуляции экспрессии генов на уровне метилирования ДНК и модификации гистонов, описаны модельные организмы, используемые как при тестировании ксенобиотиков на эпигенетическую активность, так и для детального изучения их конкретных эффектов на отдельные механизмы эпигенетической регуляции транскрипции. Поскольку в настоящее время не разработаны тест-системы, позволяющие интегрально оценить эффекты ксенобиотиков на эпигенетическую систему регуляции транскрипции, в обзоре представлены методы оценки выявления влияний различных факторов окружающей среды, в том числе различных ксенобиотиков, на метилирование ДНК и модификацию гистонов.

Заключение. Современные представления о механизмах эпигенетической регуляции экспрессии генов, использование существующих модельных систем и модельных организмов, а также применение различных методологических и методических подходов позволяют проводить широкое тестирование ксенобиотиков, в том числе медицинских препаратов и соединений, синтезированных для выполнения народнохозяйственных задач, на эпигенетическую активность. Выявление эпигенетически активных соединений важно в плане совершенствования профилактики и лечения ряда заболеваний и, прежде всего, злокачественных новообразований.

Ключевые слова: метилирование ДНК, ацетилирование гистонов, модельные организмы, бисульфитная конверсия, секвенирование, вестерн-блоттинг, рестрикционный анализ

Для цитирования: Максимова В.П., Бугаева П.Е., Жидкова Е.М. и др. Современные подходы к выявлению и изучению эпигенетически активных ксенобиотиков. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(3):8–27.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-3-8-27

Modern approaches for the screening of epigenetically active xenobiotics

V.P. Maksimova¹, P.E. Bugaeva², E.M. Zhidkova¹, O.G. Usalka², E.A. Lesovaya^{1,3},
G.A. Belitsky¹, M.G. Yakubovskaya¹, K.I. Kirsanov^{1,4}

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

²Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

³I.P. Pavlov Ryazan State Medical University; 9 Vysokovo'lnaya St., Ryazan 390026, Russia;

⁴Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

Objective. Review of the modern methodological approaches for testing and studying the epigenetic activity of xenobiotics.

Materials and methods. In preparing the review, we used information databases of biomedical literature SciVerse Scopus (538), PubMed (746), Web of Science (625), RSCI (45). To obtain full-text documents, electronic resources of PubMed Central (PMC), Research Gate, RSCI, CyberLeninka were used. In the text of the review, 87 modern publications (2010–2019) were cited, as well as 17 earlier articles published by the founders of the methods, which are used today.

Results. In the review, current data on epigenetic regulation for gene expression at the level of DNA methylation and histone modification are discussed, in vitro model systems and model organisms are described, and modern methods for screening of epigenetically active xenobiotics are presented.

Conclusion. Modern data concerning the mechanisms of epigenetic regulation of gene expression, the usage of existing model systems and model organisms, as well as the application of various methodological approaches and techniques, allow extensive screening of xenobiotics (including drugs and compounds synthesized for national economic tasks) for epigenetic activity. The identification of epigenetically active compounds is important in terms of improving the prevention and treatment of a number of diseases and, in particular, malignant neoplasms.

Key words: DNA methylation, histone acetylation, model organisms, bisulfite conversion, sequencing, western blotting, restriction analysis

For citation: Maksimova V.P., Bugaeva P.E., Zhidkova E.M. et al. Modern approaches for the screening of epigenetically active xenobiotics. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(3):8–27.

Введение

Степень проявления генетически детерминированных признаков определяется целым рядом механизмов. Важнейшую роль в регуляции экспрессии генов играют эпигенетические механизмы, обеспечивающие индукцию устойчивых и наследуемых изменений в функционировании генома, реализация которых происходит по механизмам, не затрагивающим последовательность ДНК [1, 2]. Основными механизмами эпигенетической регуляции транскрипции являются метилирование ДНК и модификация гистонов, сопровождающиеся ремоделированием хроматина, а также регуляция экспрессии генов некодирующими РНК [3, 4]. При этом процессы эпигенетической регуляции транскрипции находятся в динамическом взаимодействии и могут либо усиливать, либо ингибировать друг друга [2, 3]. Эпигенетически детерминированный профиль экспрессии генов представляет собой результат «настройки» уровня их транскрипции в зависимости от стадии дифференцировки клетки, от типа ткани, к которому эта клетка принадлежит, а также от воздействия эпигенетически активных факторов микроокружения и внешней среды [5]. Особый интерес к механизмам эпигенетической регуляции экспрессии генов обуславливается и тем, что их нарушение играет существенную роль в процессе канцерогенеза [6]. Аберрантное метилирование ДНК, нарушения пространственной структуры хроматина значительно способствуют процессам инициации опухолевого роста, инвазии и метастазирования опухоли, развитию резистентности опухолевых клеток к химиотерапии. Эпигенетически модифицированные сайты, ассоциированные с процессами злокачественной трансформации клетки и опухолевой прогрессии, могут быть потенциальными мишенями для профилактики и терапии злокачественных новообразований [7].

За последние два десятилетия существенный вклад был сделан в понимание механизмов эпигенетической регуляции транскрипции на уровне метилирования ДНК и модификации гистонов. Это позволило разработать ряд методик тестирования соединений на эпигенетическую активность. Актуальность выявления эпигенетически активных ксенобиотиков обусловлена тем, что экспозиция организма к различным новым соединениям, синтезированным в медицинских целях или для выполнения специальных народно-хозяйственных задач, может существенно изменить регулируемый эпи-

генетически профиль экспрессии генов, способствуя или препятствуя развитию патологических процессов и заболеваний [8]. В данном обзоре приводятся результаты анализа опубликованных данных по особенностям функционирования системы эпигенетической регуляции на уровне метилирования ДНК и модификации гистонов, используемые при этом модельные системы, а также представлены методы анализа влияния различных факторов окружающей среды, в том числе различных ксенобиотиков, на механизмы эпигенетической регуляции транскрипции.

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов путем метилирования ДНК

Метилирование ДНК – наследуемая эпигенетическая модификация, которая заключается в присоединении метильной группы к цитозину в позиции С-5. У млекопитающих метилирование ДНК, как правило, происходит в CpG-динуклеотидах (рис. 1). Области размером не менее 200 пар нуклеотидов (п. н.), обогащенные CpG-динуклеотидами, называются CpG-островками (CpGi). Установлено, что CpGi связаны с 60–70 % промоторов генов и, как правило, неметилированы [9]. В дополнение к CpGi, ассоциированным с областью старта транскрипции, был идентифицирован дополнительный класс гипометилированных элементов, функционирующих в качестве дистальных регуляторных элементов [10].

Биологическая функция метилирования ДНК заключается в регуляции генов на уровне транскрипции, что играет ключевую роль в таких процессах, как репрессия генов, геномный импринтинг, инактивация X-хромосомы и подавление экспрессии повторяющихся геномных элементов [11].

Метилирование ДНК регулируется семейством ферментов ДНК-метилтрансфераз (DNMTs), из которых DNMT1 метилирует ДНК во время репликации, DNMT3A и DNMT3B выполняют метилирование *de novo*, а DNMT3L, в свою очередь, отвечает за связывание перечисленных метилтрансфераз с донором метильной группы – S-аденозил-L-метионином. Существует 2 основных механизма эпигенетической регуляции транскрипции посредством метилирования ДНК: прямой и опосредованный (рис. 2).

Прямой механизм действия основан на стерическом препятствии метильных групп взаимодействию ДНК с транскрипционными факторами. В случае

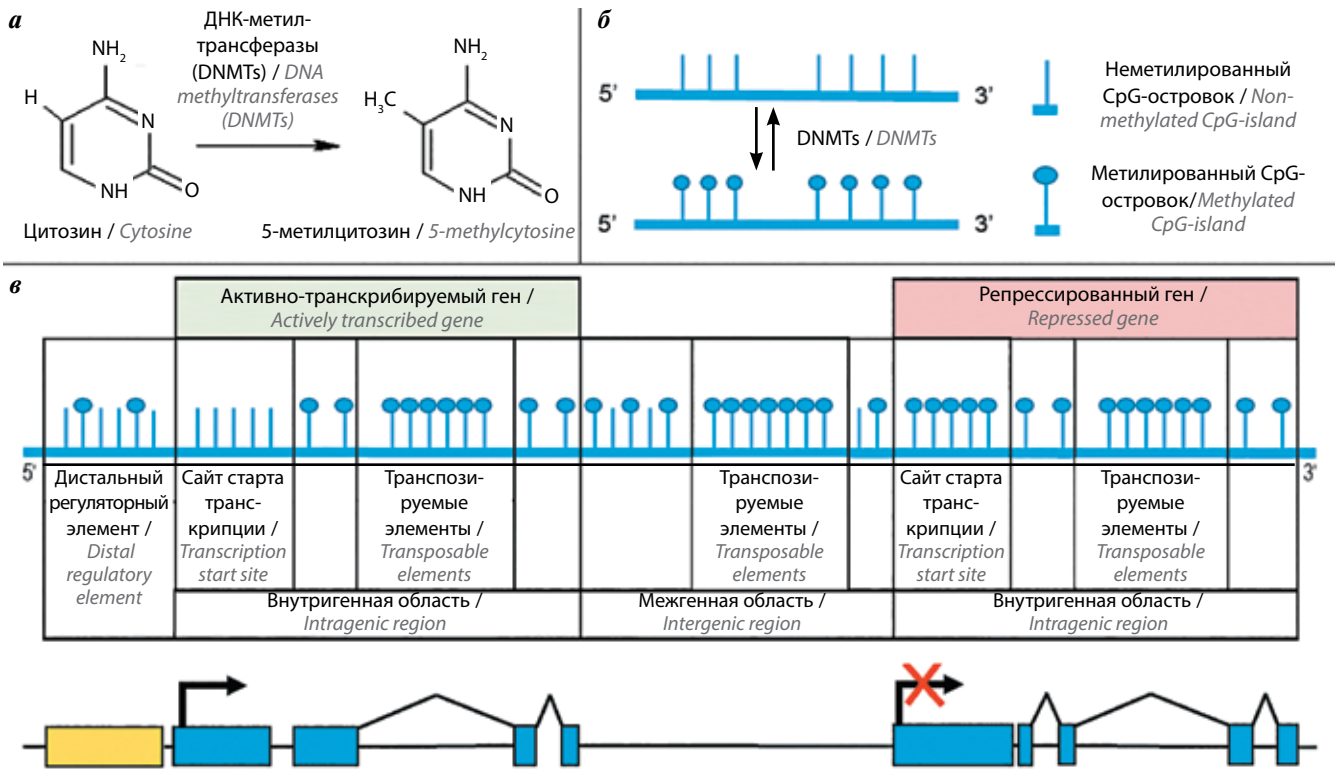


Рис. 1. Метилирование ДНК: а – химическая модификация ДНК; б – схема метилирования ДНК в CpG-динуклеотидах; в – распределение метилирования ДНК в хроматине

Fig. 1. DNA methylation: а – chemical modification of DNA; б – DNA methylation in CpG-dinucleotides; в – distribution of DNA methylation in chromatin

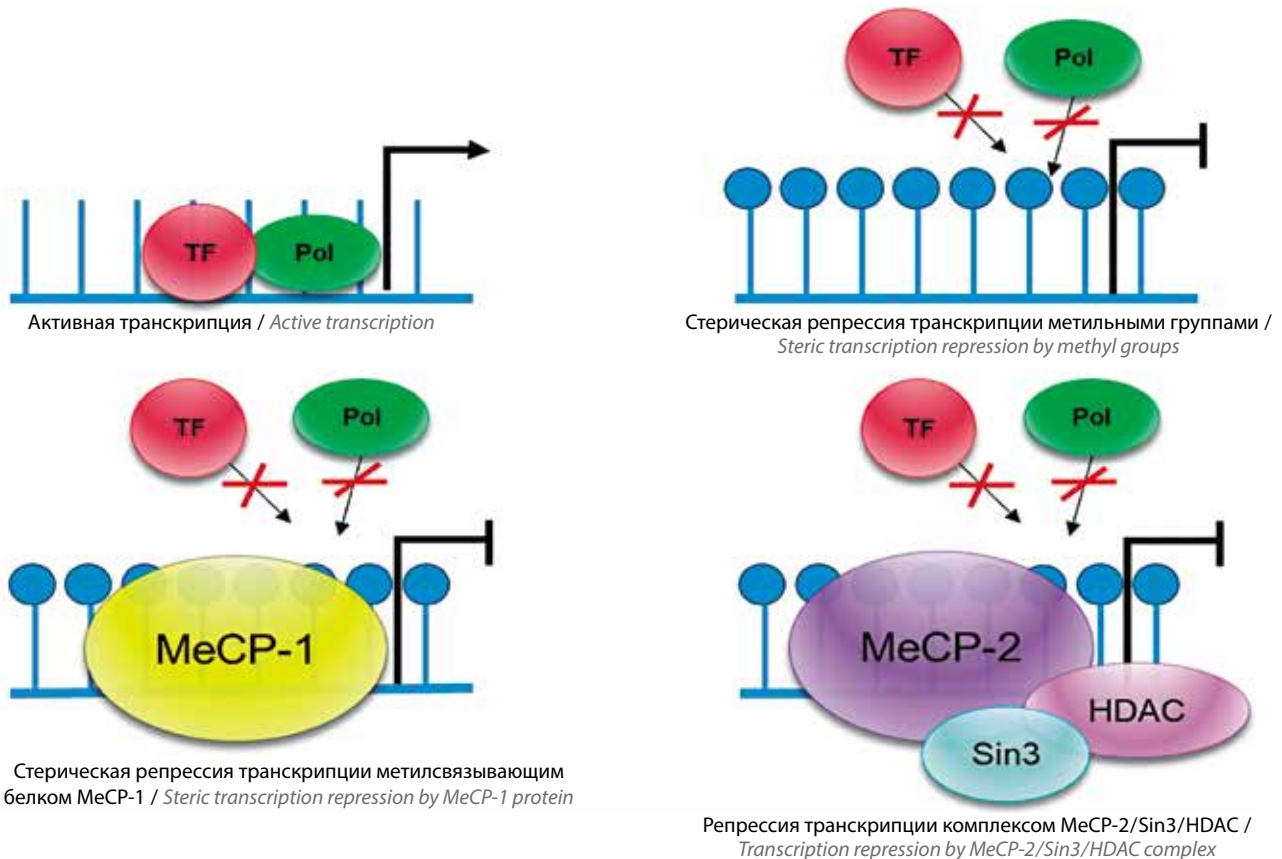


Рис. 2. Метилирование ДНК: механизмы регуляции транскрипции. TF – транскрипционный фактор; Pol – ДНК-зависимая РНК-полимераза

Fig. 2. DNA methylation: mechanisms of transcriptional regulation. TF – transcription factor; Pol – DNA-dependent RNA polymerase

опосредованного механизма метилированные области взаимодействуют с метилсвязывающими белками (methyl-binding proteins, MBPs) MeCP-1 и MeCP-2, которые присоединяются к ДНК в сайте симметричной посадки групп CH_3 [12]. MeCP-1 стерически блокирует связывание ДНК с транскрипционным аппаратом, что ведет к репрессии транскрипции [13]. MeCP-2, в свою очередь, рекрутирует гистоновые деацетилазы (histone deacetylases, HDACs) совместно с транскрипционными корепрессорами, что приводит к уплотнению структуры хроматина и репрессии транскрипции [14].

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов путем модификации гистонов

Посттрансляционные модификации гистонов играют важную роль в регуляции клеточного цикла, эмбриогенезе и обеспечении геномной стабильности [15]. Среди наиболее распространенных модификаций гистонов выделяют 7 типов: ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, АДФ-рибозилирование, гликозилирование, сумоилирование и убиквитинирование [16]. Наибольший вклад в эпигенетическую регуляцию транскрипции вносят ацетилирование и метилирование гистонов H3 и H4, которое происходит на N-концах гистонов в лизиновых и аргининовых аминокислотных остатках [17].

Существует 2 основных механизма, обуславливающих действие гистоновых модификаций на функции хроматина. Первым является нарушение контактов между соседними нуклеосомами или между гистонами и ДНК из-за изменения заряда, например при ацетилировании лизиновых гистонов. Благодаря отрицательному заряду ацетильных групп при данной модификации происходит ослабление сродства между гистонем и ДНК, в результате которого структура хроматина становится более открытой и доступной для транскрипции.

Второй механизм заключается в привлечении посредством гистоновых модификаций или их комбинаций эффекторных белков, которые обеспечивают формирование специфических функциональных состояний хроматина. Установлено, что хромоподобные домены (chromo, MBT, Tudor) специфически связывают метилированные лизины, тогда как ацетилирование специфически распознается бромодоменами и фосфорилируется семейством белков 14-3-3 [18].

В механизме ацетилирования гистонов основную роль играют модифицирующие ферменты – гистоновые ацетилтрансферазы (histone acetyltransferases, HATs) и гистоновые деацетилазы (HDACs). HATs отвечают за перенос ацетильной группы от ацетил-кофермента А к лизину, в результате чего происходит изменение общего заряда гистона с положительного до нейтрального, что способствует активации транскрипции. У млекопитающих к ферментам этого семейства в первую очередь относятся: CBP, P300, KAT2A, KAT2B, HAT1, KAT5, KAT7, KAT6B и др. Члены семейства ферментов

HDACs осуществляют удаление ацетильных групп с лизиновых остатков amino-конца гистонов, что приводит к восстановлению взаимодействия между ДНК и гистонами, конденсации хроматина и репрессии транскрипции (рис. 3) [19]. Эти функции у млекопитающих выполняют 7 белков семейства сиртуинов (SIRT1–7) и 11 белков семейства HDAC (HDAC1–11).

Метилирование гистонов осуществляется гистоновыми метилтрансферазами (histone methyl transferases, HMTs). В качестве донора метильной группы, как и в случае с метилированием ДНК, выступает S-аденозил-L-метионин. Активация или репрессия транскрипции происходит за счет изменения доступности ДНК для транскрипционных факторов в зависимости от того, какой из аминокислотных остатков метилируется. При этом метилирование гистонов может приводить как к активации транскрипции генов, так и к ее ингибированию. Известно, что метилирование сайтов H3K4, H3K48, H3K79 ассоциировано с активацией транскрипции и осуществляется следующими метилтрансферазами: KMT2A, KMT2B, KMT2C, KMT2D, SETD1A, SETD1B и др. В то же время к ингибированию транскрипции приводит метилирование сайтов H3K9, H3K27 и др. У млекопитающих последнее связано с активностью метилтрансфераз SETDB1, SETD2, EHMT, KMT5A, EZH1, EZH2, SUV39H1 ASH1L и др. [9].

Модельные организмы для изучения механизмов эпигенетической регуляции транскрипции

Открытие эпигенетически наследуемых фенотипов произошло при изучении механизмов реализации генетической информации одновременно в нескольких исследованиях с использованием разных организмов. Наиболее популярными эпигенетическими моделями стали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, гриб *Neurospora crassa*, нематода *Caenorhabditis elegans*, фруктовая муха *Drosophila melanogaster*, рыба *Danio rerio*, африканская шпорцевая лягушка *Xenopus laevis*, растение *Arabidopsis thaliana*, мышь *Mus musculus* и крыса *Rattus norvegicus* [20]. Как уже было отмечено, все перечисленные организмы являются активно используемыми моделями для изучения генетических процессов. Их геном, уровень организации, а также устройство хроматина, метаболизм и другие параметры тщательно изучены. В табл. 1 представлены особенности использования данных организмов для изучения системы эпигенетической регуляции транскрипции.

Большой вклад в понимание фундаментальных процессов эпигенетики внесли данные, полученные на представителях грибов *S. cerevisiae*, *S. pombe* и *N. crassa*. На этих грибах были изучены процессы формирования гетерохроматина, а также его роль в функционировании генома [21] и свойства ферментов, отвечающих за пространственную организацию хроматина [22]. Использование *N. crassa* и *A. thaliana* позволило получить информацию о различных ферментах системы

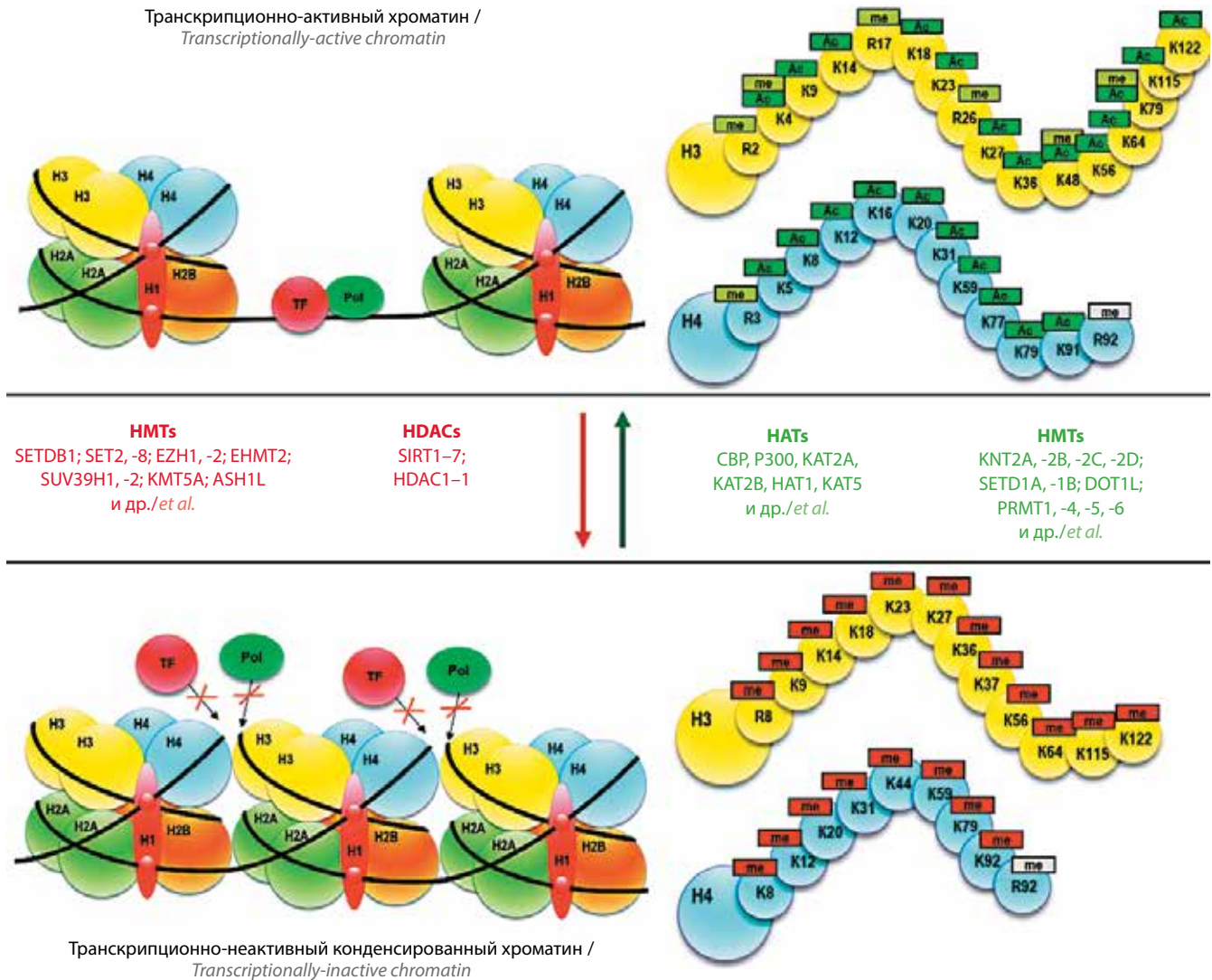


Рис. 3. Ацетилирование и метилирование гистонов: механизм активации и репрессии транскрипции
Fig. 3. Histone acetylation and methylation: mechanisms of transcriptional activation and repression

метилирования ДНК, а также изучить механизмы симметричного (CpG) и асимметричного метилирования (CpNpG, CpHpH), влияющие на эпигенетический сайленсинг повторяющихся последовательностей, транспозонов и других областей гетерохроматина.

В последнее время для изучения метилирования ДНК стали активно использовать рыб *D. rerio*. Данная модель получила широкое распространение в исследованиях эмбрионального развития и для изучения функций генов позвоночных, поскольку гомология генов эмбрионального развития *D. rerio* и млекопитающих составляет около 99 % [23, 24]. Также рыбы *D. rerio* могут использоваться для проведения тестов на эпигенетическую активность ксенобиотиков, поскольку их кожа обладает высокой проницаемостью для водорастворимых молекул. На модели *D. rerio* было показано, что воздействие токсичных компонентов окружающей среды (бензпирен, метилртуть, диоксин) способно вызывать эпигенетически наследуемые изменения [25]. Кроме этого, на эмбрионах *D. rerio* было

изучено влияние следующих ксенобиотиков на глобальное метилирование: бисфенол А, диэтилстильбестрол, 17 α -этинилэстрадиол, никель, кадмий, мышьяк, трибутилин, вальпроевая кислота, атразин, бензпирен и флузилазол [26].

В организмах, не использующих или использующих неактивно механизм метилирования ДНК, наибольший вклад в эпигенетическую регуляцию транскрипции вносят модификации гистонов и некодирующие РНК. Такие свойства дрожжей *S. cerevisiae* и *S. pombe*, а также гриба *N. crassa* и насекомого *D. melanogaster* позволили исследовать действие гистоновых модификаций на экспрессию транспозонов, импринтинг генов и механизм регуляции экспрессии генов, сцепленных с полом (так называемой дозовой компенсации). Кроме этого, на организме *C. elegans* было впервые показано, что эпигенетические изменения могут наследоваться [20].

Широкое применение в качестве модельного организма для изучения эпигенетической регуляции получила лягушка *X. laevis* благодаря схожести с млекопитающими

Таблица 1. Характеристики различных модельных организмов для изучения эпигенетической системы регуляции транскрипции
Table 1. Characteristics of various model organisms used to study the epigenetic system of transcriptional regulation

Свойство Characteristic	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Daphnia</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Mus musculus</i>
	Грибы Fungi			Растения Plants			Животные Animals			
Царство Kingdom										
Размер генома, Мб Genome size, Mb	12	14	40	120	100	180	26	198	3100	2645
Длительность эмбриогенеза Duration of embryogenesis	90 мин 90 min	120 мин 120 min	21–24 ч 21–24 h	24 ч 24 h	12 ч 12 h	24 ч 24 h	72 ч 72 h	24 ч 24 h	36 ч 36 h	3–4 дня 3–4 days
Время генерации Generation time	2 ч 2 h	230 мин 230 min	3 нед 3 weeks	6 нед 6 weeks	3–4 дня 3–4 days	10 дней 10 days	3 мес 3 months	5–10 дней 5–10 days	1–2 года 1–2 years	9–11 нед 9–11 weeks
Время полного жизненного цикла Duration of a full life cycle	<5 нед <5 weeks	2–3 нед 2–3 weeks	<5 лет <5 years	3–5 мес 3–5 months	3 нед 3 weeks	50 дней 50 days	5 лет 5 years	1 год 1 year	15 лет 15 years	12–18 мес 12–18 months
Сайленсинг транспозонов Transposon silencing	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+
Репрессирующие гистоновые модификации Repressive histone modifications	H3K9me3	H3K9me3	H3K9me3, H3K27me3	H3K9me, H3K27me3	H3K9me, H3K27me1/3, H4K20me1, H3K27me1	H3K9me3, H3K27me3	H3K9me, H3K27me3	H3K27me3, H4K20me2, H3K9me	H3K9me, H3K27me, H4K20me	H3K9me, H3K27me3, H4K20me3 и др. et al.
Активирующие гистоновые модификации Activating histone modifications	H3K79me3, H3K4me3, H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac, H3K56ac, H4K16ac	H3K4me2, H3K36me3, H3K9ac, H3K18ac, H3K27ac, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac	H3K4me3, H3K36me3	H3K4me, H3K36me3, H3K9ac	H3K4me, H3K36me, H3K79me, H3K27ac, H4K8ac, H4K16ac	H3K4me, H3K36me3, H3K79me3, H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac, H3K23ac, H3K27ac, H4K16ac	H3K4me, H3K9me, H3K27me3, H3K36me3	H3K4me, H3K79me, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac, H3K9ac, H3K14ac	H3K4me, H3K9me, H3K14ac, H3K18ac, H4K12ac, H4K16ac и др. et al.	H3K4me, H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac, H4K12ac, H4K16ac и др. et al.
Метилирование ДНК DNA methylation	–	–	+	+	–	–	+	–	+	+
СрG	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
СрNpG	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
СрHrH	–	–	+	+	–	+	+	–	–	–
РНК-интерференция RNA interference	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Геномный импринтинг Genomic imprinting	+	+	+	+	+	+	+	Не изучено Unknown	+	+
Источники литературы Reference	[21, 27]	[22, 28, 29]	[29–31]	[49, 50]	[32–34]	[35–37]	[23–25, 28, 38–40]	[20, 37, 39, 41, 42]	[43–48]	[48, 51]

процессу оогенеза. Особенностью данной модели является возможность проведения экспериментов как на целом организме, так и на культуре ооцитов, что позволяет сравнивать эффекты *in vivo* и *in vitro*. В связи с этим *X. laevis* является одной из наиболее удобных моделей для изучения механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов [43, 44]. В ооциты *X. laevis* с помощью инъекций можно вводить ДНК, РНК и плазмидную ДНК, что позволяет варьировать уровень того или иного гена (в том числе гена компонента системы эпигенетической регуляции транскрипции) при изучении влияния факторов окружающей среды на функции генов и процесс сборки хроматина [52].

Для анализа токсического эффекта ксенобиотиков широко применяется модельный организм *Daphnia* sp. [53]. Потомство *Daphnia*, будучи генетическим клоном материнского организма, может приобретать разнообразный фенотип в зависимости от воздействия внешних раздражителей [20]. Такое свойство *Daphnia* позволяет исследовать эпигенетические изменения при действии различных экологических факторов [53]. В исследованиях на данной модели было показано, что 5-азациитидин, винклозолин, генистеин и цинк снижают глобальные или локализованные уровни метилирования ДНК, при этом для 5-аза-2'-дезоксцитидина, биоханина А и кадмия не было показано эффектов на метилирование [41].

Молекулярные механизмы эпигенетической регуляции экспрессии генов являются довольно консервативными. Однако сложность и особенности функционирования некоторых механизмов у высших организмов требуют применения более адекватных модельных систем. Так, для изучения механизмов инактивации X-хромосомы необходимо использовать млекопитающих, в частности мышей (*M. musculus*) и крыс (*R. norvegicus*) [54]. Для изучения системы эпигенетической регуляции экспрессии генов у млекопитающих часто используют трансгенных мышей с различными нокаутированными генами или мышей с эктопической экспрессией некоторых генов [55]. На моделях грызунов проводится большое число исследований влияния окружающей среды, включая химические вещества, радиацию или факторы образа жизни (алкоголь, питание или курение), на эпигенетическую систему регуляции транскрипции на различных этапах развития. Широкое применение в анализе эпигенетических изменений получили мышинные модели с мутантными аллелями Agouti A^{vy}, Cabp^{IAP} и Axin1^{Fu} [56]. У этих животных имеется хорошо охарактеризованный локус, паттерн метилирования которого определяет изменчивость фенотипа. Также мыши с мутантными аллелями имеют четкий визуальный маркер (например, желтая шерсть у Agouti A^{vy}), позволяющий детектировать эпигенетические изменения [57]. На моделях мышей и крыс были выявлены эпигенетические изменения, индуцированные действием алкоголя, кофеина и никотина. Кроме этого, были получены данные

об эпигенетической активности таких ксенобиотиков, как бисфенол А, диэтилстильбестрол, перметрин, диоксин, N, N'-диэтил-мета-толуамид, бензпирен, винклозолин, ДДТ и фталаты [58].

Для выявления эпигенетически активных ксенобиотиков наиболее удобными модельными системами являются иммортализованные клеточные линии, обладающие активной метаболической системой [59]. К преимуществам таких моделей относятся меньшие стоимость и временные затраты проведения экспериментов, в отличие от моделей *in vivo*. В настоящее время для изучения гистоновых модификаций широко используются следующие клеточные линии: HeLa, HepG2, MCF-7, MDA-MB-231, HCT-116, HT-29, SK-Hep1, Hep3B и др. [60]. Для изучения конкретных механизмов действия ксенобиотиков, влияющих на модификацию гистонов, применяются клеточные линии с репрессированными или активированными (в зависимости от направления действия ксенобиотика) генами ферментов, осуществляющих модификации. При изучении эффектов ксенобиотиков на метилирование ДНК необходимо учитывать характер влияния соединения (способность индуцировать гипер- или гиперметилирование). Следующие клеточные линии имеют в составе ДНК наибольшее число метилированных цитозинов и являются наиболее чувствительными к действию деметилирующих агентов: RXF-393, KG1a, HT-29, MDA-MB-435. В дополнение, клеточные линии MDA-MB-231, KG1a и RAJI имеют в своем геноме более 60 % гиперметилированных CpG-островков [61]. Для определения гиперметилирующего потенциала используют клетки с гипометилированным профилем генома: HepG2, SK-Hep1, HeLa [62, 63]. В свою очередь, для анализа метилирования транспозированных элементов и специфичных локусов используют клеточные линии MDA-MB-468, SiHa, CaSki, HCT-116, SW-480, WI-38 VA-13 и др. [64–68]. На моделях *in vitro* был получен большой перечень данных о влиянии на эпигенетические механизмы таких ксенобиотиков, как 2,3,7,8-тетрахлордифенз-пара-диоксин, генистеин, соединения никеля и кадмия [59, 69, 70].

Таким образом, в зависимости от цели исследования для анализа изменений в эпигенетической регуляции транскрипции, вызванных внешними факторами, могут использоваться разные модельные организмы или системы *in vitro*. Стоит отметить, что в исследованиях *in vivo* ключевыми критериями для выбора модели являются такие индивидуальные характеристики организмов, как видовая принадлежность, размер генома, длительность эмбриогенеза, время генерации, время полного жизненного цикла, а также активные у данных организмов механизмы эпигенетической регуляции транскрипции (см. табл. 1).

Методы изучения механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов

При выявлении эпигенетических эффектов ксенобиотиков в первую очередь необходимо провести

интегральную оценку влияния соединений на эпигенетическую регуляцию транскрипции. В настоящее время не известны подходы, позволяющие с помощью одного метода или теста получить данные об интегральном влиянии соединения на систему эпигенетической регуляции транскрипции [5]. В связи с этим интегральную оценку эпигенетической активности ксенобиотиков получают, проводя комплексный анализ влияния ксенобиотиков с использованием методов оценки отдельных механизмов эпигенетической регуляции. Наиболее удобными методами для выявления эпигенетически активных ксенобиотиков являются скрининговые тесты *in vitro*, способные качественно оценить эпигенетические изменения и обладающие высокой пропускной способностью [71]. С помощью таких тестов можно проанализировать более 30 соединений в одном эксперименте. Такие тесты существуют как для анализа уровня метилирования ДНК, так и для анализа гистоновых модификаций.

После исследования эпигенетической активности ксенобиотиков в скрининговых тестах для более глубокого изучения механизмов их действия применяют более точные, высокочувствительные и надежные количественные методы анализа уровней метилирования ДНК и гистоновых модификаций в геноме. Для удобства изложения материала по существующим методам анализа системы эпигенетической регуляции, используемым при изучении эпигенетической активности ксенобиотиков, все методы будут приведены в соответствии с их направленностью на анализ определенного механизма и принципом, используемым для выявления изменений. При этом будут отмечены сложность проведения анализа (временные затраты, необходимость высокотехнологичного оборудования, определяющих стоимость исследования) и чувствительность метода, что позволяет определить целесообразность его использования в скрининговых экспериментах или для детального изучения механизма действия ксенобиотика.

Методы изучения метилирования ДНК

Основными подходами к изучению метилирования ДНК являются таргетный и интегральный анализы. В рамках таргетного анализа оценивают уровень метилирования определенной части генома – генов, промоторов генов и других специфических последовательностей [72]. В свою очередь, при интегральном изучении проводится анализ маркерных последовательностей транскрибируемых генетических элементов или картирование метилома, которое позволяет сравнивать профили метилирования условно нормальных тканей и тканей с патологическими изменениями или тканей организмов, экспонированных к определенному воздействию.

В настоящее время доступен широкий ряд методов для выявления 5-метилцитозина в последовательности ДНК. Выбор того или иного метода зависит от исход-

ного количества ДНК, размера исследуемой последовательности, требуемого уровня чувствительности и пропускной способности метода, а также от доступности реагентов и оборудования [72]. Методы изучения метилирования ДНК по своей направленности можно разделить на несколько групп (рис. 4).

Анализ метилирования ДНК на основе рестрикции ДНК эндонуклеазами

Данная группа методов основана на использовании ДНК эндонуклеазами, обладающими разной чувствительностью к метилированным последовательностям CpG. Классическими представителями эндонуклеаз для изучения метилирования ДНК являются пары ферментов HpaII–MspI (CCGG) и SmaI–XmaI (CCCGG). Особенностью этих ферментов является то, что один из них (MspI, XmaI) не чувствителен к метилированию, а другой (HpaII, SmaI) расщепляет только неметилированные последовательности [73]. После рестрикции анализ полученных фрагментов ДНК может быть проведен различными способами, которые представлены на рис. 5. Одним из главных недостатков методов на основе рестрикции ДНК является невозможность полногеномного анализа из-за ограниченного числа сайтов рестрикции [74].

Метилчувствительная полимеразная цепная реакция (ПЦР) (Methylation-Sensitive Restriction Enzymes-Polymerase Chain Reaction, MSRE-PCR) – надежный и удобный метод для количественного определения метилирования ДНК отдельных последовательностей. При этом ферментативное расщепление осуществляется, как правило, с помощью рестриктаз HpaII–MspI. После этого проводят ПЦР с праймерами к интересующей области ДНК. В результате амплификации фрагментов ДНК, обработанных метилчувствительными рестриктазами, продукты образуются только в случае, если последовательность была метилирована. Анализ с использованием вышеупомянутых эндонуклеаз может осуществляться двумя способами: проводят либо ПЦР в реальном времени, либо обычную ПЦР с последующим электрофорезом в агарозном геле, после чего выполняют анализ полученных фрагментов и расчет процента метилирования [73]. Метод обладает высокой аналитической чувствительностью и позволяет исследовать метилированные области в присутствии большого количества аллелей дикого типа.

Цифровой ферментативный анализ метилирования ДНК (Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation, DREAM) – метод, с помощью которого можно анализировать порядка 50 000–100 000 CpG-сайтов по всему геному. Данный метод основан на расщеплении геномной ДНК эндонуклеазами SmaI и XmaI с последующим высокопроизводительным секвенированием. После обработки геномной ДНК рестриктазами проводится стабилизация 3'-конца путем реакции полиаденилирования и затем лигирование последовательности со специфическими адаптерами [75]. Далее следуют

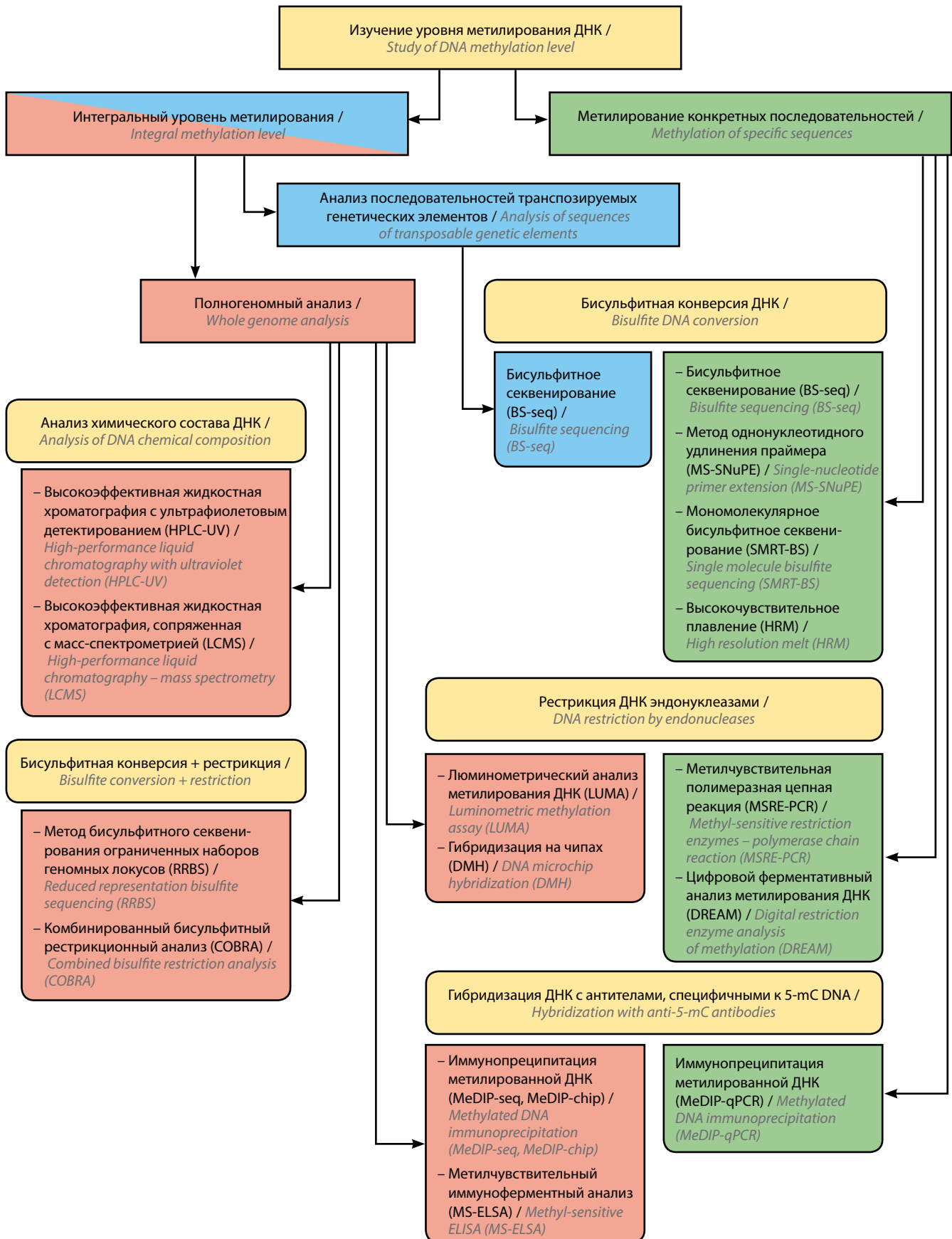


Рис. 4. Типы методов изучения метилирования ДНК
Fig. 4. Types of techniques used to study DNA methylation

стандартные процедуры создания библиотек и высокопроизводительное секвенирование. Доля метилирования ДНК в целевых сайтах CpG рассчитывается через отношение доли секвенированных областей, отвечающих метилированной последовательности, к общей доле секвенированных областей [76].

Люминометрический анализ метилирования ДНК (LUMinometric Methylation Assay, LUMA) заключается в том, что геномную ДНК расщепляют двумя комбинациями эндонуклеаз: HpaII + EcoRI или MspI + EcoRI. Из-за различной специфичности рестриктаз HpaII и MspI к метилированию в результате реакции получают последовательности с «липкими» концами разной длины и состава. Степень расщепления ДНК анализируют методом, основанным на четырехстадийной реакции пиросеквенирования. В реакцию последовательно добавляются следующие нуклеотиды: 1) dATPαS; 2) dGTP + dCTP; 3) dTTP; 4) dGTP + dGCP. При присоединении нуклеотидов к «липким» концам высвобождается неорганический пирофосфат (PPi), который с помощью АТФ-сульфуриказы превращается в АТФ, после чего происходит ферментативная реакция, в результате которой испускается квант света. Значения пиков А и Т (этапы пиросеквенирования 1 и 3) отражают расщепление EcoRI и должны быть одинаковыми. Значение пика С + G, полученное в результате II стадии пиросеквенирования, соответствует интенсивности расщепления ДНК эндонуклеазами HpaII или MspI. В качестве контроля рассматривают значение второго пика С + G, полученного на шаге 4, которое должно быть близким к нулю. Доля метилированной ДНК в анализируемой последовательности определяется по соотношению значений пиков (HpaII/EcoRI) и (MspI/EcoRI) [77].

Анализ метилирования ДНК с помощью гибридизации на микрочипах. Гибридизация на чипах (Differential Methylation Hybridization, DMH) представляет собой высокопроизводительный анализ для скрининга

метилирования ДНК. В рамках данного метода геномная ДНК обрабатывается ультразвуком, после чего полученные фрагменты ДНК лигируются с линкером. Далее проводится ферментативное расщепление лигированных последовательностей с помощью чувствительных к метилированию рестриктаз (HpaII) и осуществляется ПЦР с праймерами, комплементарными к линкерной последовательности, при этом происходит амплификация фрагментов ДНК, метилированных в сайтах рестрикции. Затем проводится маркировка амплифицированных последовательностей флуоресцентными красителями (Cy3 и Cy5) и осуществляется гибридизация полученного продукта с микрочипом. Далее осуществляется анализ последовательности [78].

Методы анализа метилирования ДНК на основе бисульфитной конверсии

Бисульфитная конверсия – широко применяемый метод, который используется для анализа метилирования областей CpG [79]. Суть метода бисульфитной конверсии заключается в ковалентном преобразовании неметилированного цитозина в урацил, тогда как метилированные цитозины в составе CpG-сайтов остаются неизменными. После конверсии цитозина в урацил проводят амплификацию ДНК с праймерами к интересующей последовательности. Далее для определения уровня метилирования ДНК полученный ПЦР-продукт может быть проанализирован различными методами (рис. 6). Методы на основе бисульфитной конверсии обладают высокой эффективностью и могут быть использованы даже для анализа областей ДНК с небольшим количеством сайтов CpG [80].

Анализ метилирования ДНК с помощью бисульфитного секвенирования. В рамках метода бисульфитного секвенирования (Bisulfite Sequencing, BS) последовательность ДНК после конверсии и амплификации подвергается секвенированию. Для этого могут быть

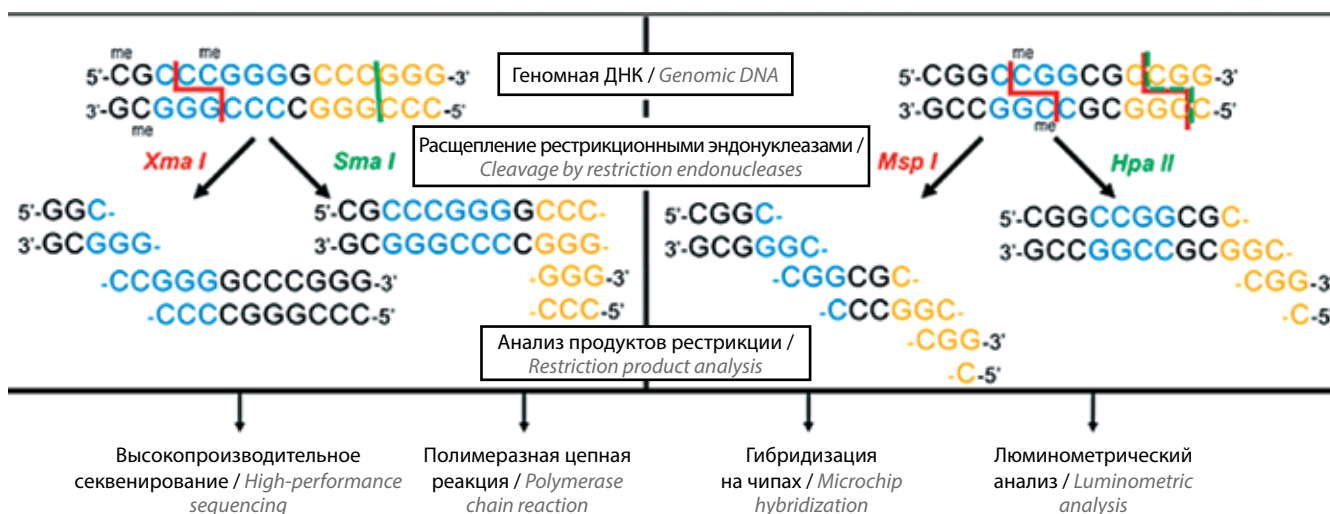


Рис. 5. Методы анализа метилирования ДНК на основе рестрикции
Fig. 5. Restriction methods of DNA methylation analysis

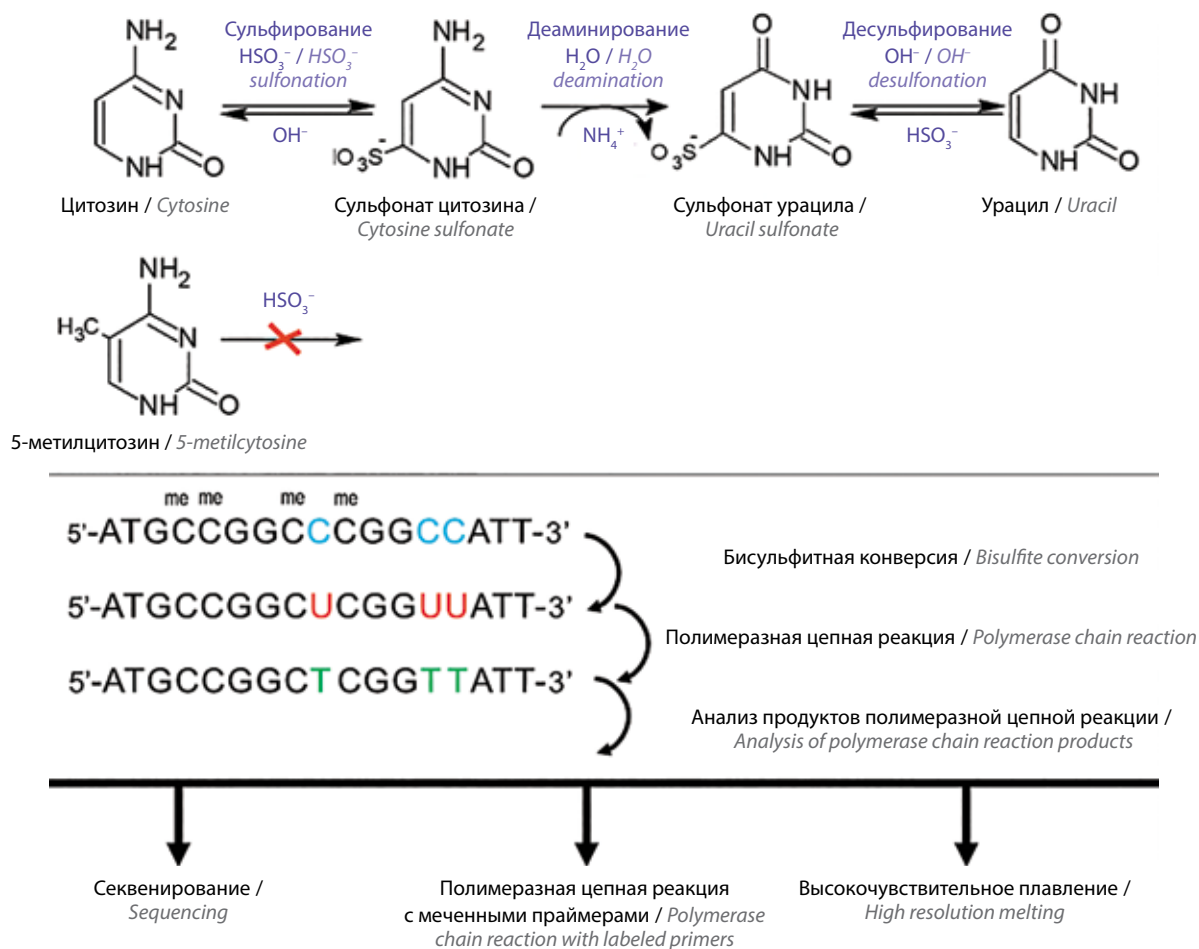


Рис. 6. Методы анализа метилирования ДНК на основе бисульфитной конверсии
Fig. 6. Bisulfite conversion methods of DNA methylation analysis

использованы такие методы, как прямое секвенирование по Сэнгеру, пиросеквенирование, а также различные типы секвенирования нового поколения и др. [80–82].

Одним из наиболее популярных методов бисульфитного секвенирования является бисульфитное пиросеквенирование. Этот метод используют как для анализа метилирования ДНК отдельных локусов, так и для больших геномных последовательностей. Кроме этого, с помощью бисульфитного пиросеквенирования можно провести количественный анализ метилирования в отдельной клетке. Важным отличием данного метода является использование пары праймеров, один из которых ковалентно связан с биотином. За счет сродства биотина к стрептавидину ПЦР-продукт закрепляется на подложке. Далее происходит отжиг праймера и синтез новой цепи. В процессе включения каждого нуклеотида в цепь происходит высвобождение пирофосфата, количество которого определяют с помощью АТФ-люцинометрии [81]. По сравнению с секвенированием по Сэнгеру пиросеквенирование отличается меньшей стоимостью и более высокой производительностью. Однако при секвенировании протяженных

участков, состоящих из одного и того же нуклеотида, могут происходить ошибки в анализе последовательности. Кроме этого, пиросеквенирование эффективно лишь для анализа фрагментов ДНК размером 150–200 п.н. Более удобным и высокоточным методом для полногеномного секвенирования при анализе метилирования ДНК является секвенирование нового поколения. Данный метод секвенирования обладает большей пропускной способностью, что позволяет значительно увеличить масштаб исследования [83].

Анализ метилирования ДНК с помощью высокочувствительного плавления. Метод высокочувствительного плавления (Methylation-Sensitive High Resolution Melting, MS-HRM) проводят следующим образом: после бисульфитной конверсии и ПЦР с бисульфитсовместимыми праймерами продукт амплификации подвергают постепенному нагреванию от 50 °С до 95 °С. Изменение последовательности в ходе бисульфитной конверсии меняет нуклеотидный состав ДНК таким образом, что неметилированные CpG-области содержат в большей степени тимин, а метилированные — цитозин (см. рис. 6). Продукты ПЦР имеют разные профили плавления в зависимости от степени метилирования

исследуемого локуса. Количество двухцепочечных молекул в процессе плавления определяют по уровню флуоресценции ДНК-красителя, избирательно связывающегося с дуплексами [84]. Анализ кривых плавления позволяет определить степень метилирования исследуемой области. Таким образом, метод HRM позволяет осуществить экономически эффективную, быструю и высокочувствительную оценку состояния метилирования определенного локуса.

Метод однонуклеотидного удлинения праймера, чувствительный к метилированию (Methylation-Sensitive Single Nucleotide Primer Extension, MS-SNuPE) – это метод, с помощью которого можно быстро количественно определить статус метилирования ДНК в определенных областях CpG. Главной особенностью данного метода является использование радиоактивно меченных нуклеотидов dCTP и dTTP, что позволяет получить количественные данные по уровню радиоактивности анализируемого образца. Долю ДНК, метилированной в анализируемом участке, определяют по соотношению С : Т [85]. С помощью MS-SNuPE можно анализировать статус метилирования сразу нескольких CpG-областей за счет использования нескольких пар праймеров.

Метод мономолекулярного бисульфитного секвенирования ДНК в реальном времени (Single Molecule Real-Time Bisulfite Sequencing, SMRT-BS) сочетает бисульфитную конверсию и секвенирование 3-го поколения, основанное на непрерывном прочтении последовательности отдельных молекул ДНК [77]. Отсутствие этапа ПЦР позволяет ускорить полногеномный анализ. Для анализа метилирования определенных последовательностей перед секвенированием необходимо осуществить амплификацию области интереса. Преимущества данного метода заключаются в возможности идентифицировать сайты метилирования ДНК в больших геномных последовательностях (до 20 кб), а также в его высокой пропускной способности и большой протяженности считывания, точности и эффективности. Стоит отметить, что также практикуется прямое определение уровня метилирования ДНК без этапа бисульфитной конверсии. Принцип данной разновидности метода основан на разной кинетике присоединения нуклеотидов к модифицированным основаниям. С помощью данного метода можно детектировать все существующие модификации ДНК.

Анализ метилирования ДНК с помощью комбинации бисульфитной конверсии и рестрикционного анализа

Бисульфитная конверсия может быть использована в комбинации с уже описанным рестрикционным методом.

Метод бисульфитного секвенирования ограниченных наборов геномных локусов (Reduced Representation Bisulfite Sequencing, RRBS) основан на использовании эндонуклеаз, чувствительных к метилированным сайтам,

и бисульфитной конверсии. После обработки геномной ДНК эндонуклеазами выполняется очистка фрагментов ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле. Далее фрагмент лигируют с С-необогатенной олигонуклеотидной последовательностью (адаптером) и повторно проводят очистку ДНК с помощью электрофореза, а затем применяют бисульфитную конверсию [86]. После этого полученные последовательности ДНК амплифицируют с использованием праймеров, специфичных к областям адаптера, и выполняют секвенирование ПЦР-продуктов. При необходимости создания библиотеки метилированных последовательностей большой области или целого генома можно клонировать амплифицированную последовательность [87]. Данный метод может быть использован для исследования уровня метилирования ДНК любых областей генома, а также для создания библиотек метилома различных организмов.

Комбинированный бисульфитный рестрикционный анализ (Combined Bisulphite Restriction Analysis, COBRA) – универсальный метод, включающий бисульфитную конверсию, ПЦР и расщепление эндонуклеазами. Данный метод является эффективным даже для небольших количеств ДНК. После стандартной бисульфитной конверсии и амплификации продукты ПЦР обрабатывают эндонуклеазами, активными в сайтах, содержащих цитозин. Так, фрагментация конвертированной ДНК происходит в случае, если исходная последовательность была метилирована. Размер и количество полученных фрагментов определяют с помощью электрофореза в агарозном геле и проводят расчет доли метилированной фракции ДНК [88].

Методы на основе гибридизации ДНК с антителами, специфичными к 5-мС

Иммунопреципитация метилированной ДНК (Methylated DNA Immunoprecipitation, MeDIP) – крупномасштабный метод анализа метилирования ДНК, суть которого заключается в отделении метилированной фракции ДНК специфическими антителами к 5'-mC. Геномную ДНК фрагментируют (до 1000 кб), денатурируют и инкубируют с антителами к 5'-mC, после чего проводят иммунопреципитацию, в процессе которой ДНК, связанная с антителами, конъюгируется с вторичными антителами, фиксированными на магнитных частицах; несвязанная ДНК удаляется (рис. 7a). Затем антитела расщепляют ферментом, таким образом получая чистую фракцию ДНК, которую впоследствии анализируют с помощью таких высокопроизводительных методов, как гибридизация на микрочипах (MeDIP-chip) и секвенирование (MeDIP-seq) [89–92]. Более простым вариантом анализа является количественная ПЦР в реальном времени (MeDIP-qPCR), с помощью которого можно оценить метилирование конкретных областей [82].

Метилчувствительный иммуноферментный анализ (Methyl-Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, MS-ELISA) – метод, основанный на взаимодействии

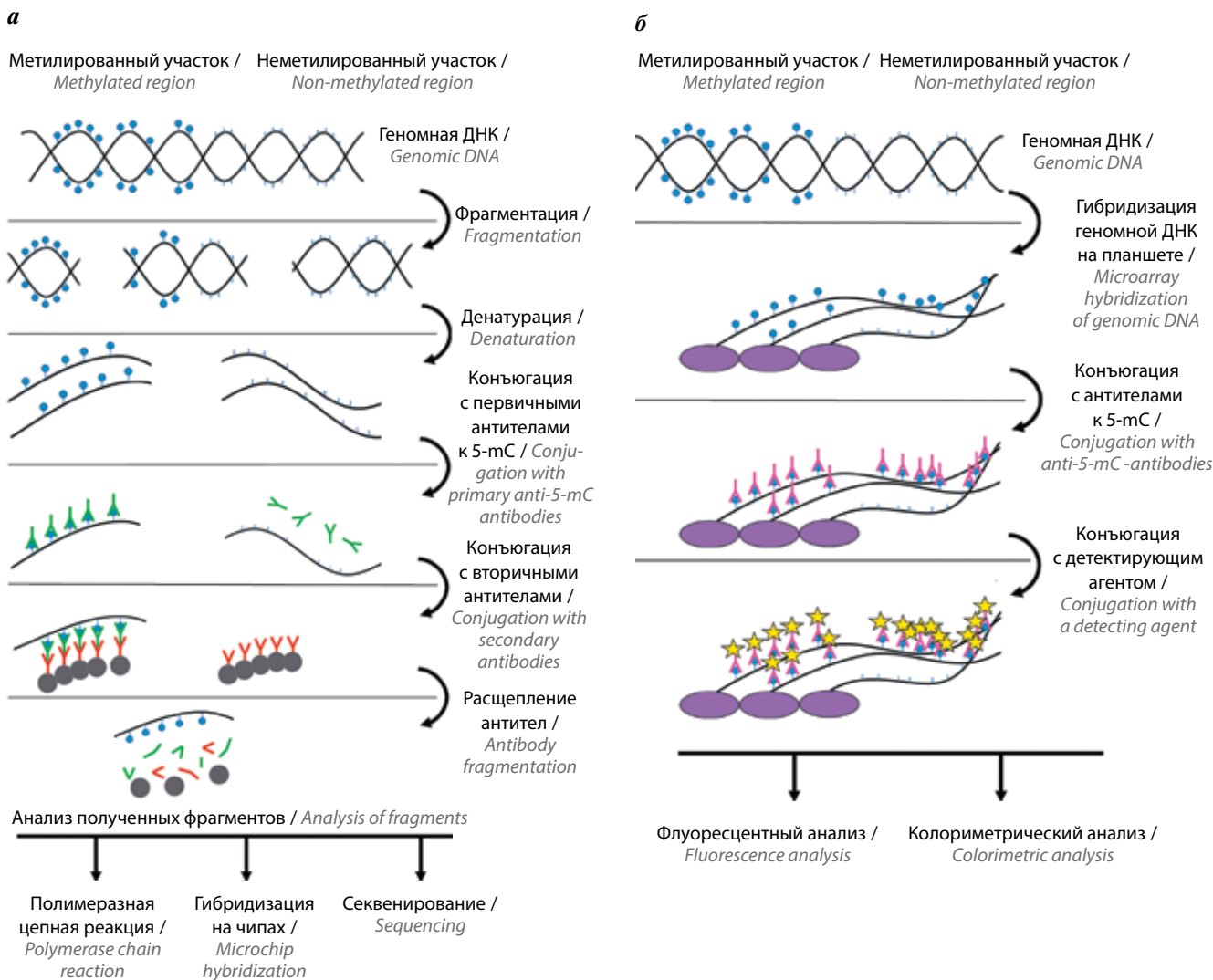


Рис. 7. Методы анализа метилирования ДНК на основе гибридизации ДНК с антителами, специфичными к 5-мС: а – схема методов на основе иммунопреципитации метилированной ДНК; б – схема методов на основе метилчувствительного иммуноферментного анализа
 Fig. 7. DNA methylation analysis methods based on DNA hybridization with anti-5-mC antibodies: а – methylated DNA immunoprecipitation methods; б – methyl-sensitive ELISA

метилированной ДНК с антителами к 5-мС [93]. Принцип метода представлен на рис. 7б. Данный метод позволяет оценить интегральный уровень метилирования ДНК и подходит в большей степени для скрининга [72].

Методы на основе анализа состава ДНК

Высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым (УФ) детектированием (ВЭЖХ-УФ, High-Performance Liquid Chromatography with UV-Vis detection, HPLC-UV) – распространенный метод для исследования уровня метилирования ДНК, суть которого заключается в гидролизе ДНК до нуклеозидов и нуклеотидов, с последующим разделением их ВЭЖХ и количественного анализа состава ДНК с помощью УФ-детектора [94]. Гидролиз ДНК выполняют либо ферментативно, либо с помощью кислот. Кислотный гидролиз – более простой метод, однако ферментативный гидролиз считается более щадящим для оснований

ДНК [95]. При высокой эффективности анализа одним из основных недостатков данного метода является необходимость большого количества ДНК (порядка 10 мкг) для проведения анализа [94].

Высокоэффективная жидкостная хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС, Liquid Chromatography – Mass Spectrometry, LCMS) – альтернативный ВЭЖХ-УФ высокочувствительный метод, используемый для исследования метилирования ДНК [72]. Этот метод также включает гидролиз ДНК до нуклеозидов, после чего осуществляются жидкостная хроматография и масс-спектрометрический анализ состава исследуемой фракции ДНК [96]. Данный метод является точным и эффективным, однако требует дорогостоящего оборудования, что может стать препятствием к его использованию.

Сравнительный анализ методов измерения уровня метилирования ДНК представлен в табл. 2.

Таблица 2. Сравнительный анализ методов измерения уровня метилирования ДНК
 Table 2. Comparative analysis of methods for measuring DNA methylation level

Принцип метода Method principle	Название метода Method name	Исходное количество ДНК Initial DNA amount	Возможное покрытие Possible coverage	Чувствительность Sensitivity	Специфичность Specificity	Преимущество Advantage	Недостаток Disadvantage	Источник литературы Reference
Рестрикция ДНК DNA restriction	MSRE-PCR	500 нг 500 ng	Специфичные области Specific regions	**	**	Не требует модификации ДНК Doesn't require DNA modification	Ограниченное число сайтов рестрикции Limited number of restriction sites	[73]
	DREAM	500 нг 500 ng	Специфичные области Specific regions	**	**			[76]
	LUMA	200–500 нг 200–500 ng	Весь геном Whole genome	**	**	Сложность микрочипов, стоимость Microchip complexity, cost	[78]	
	DMH	100–200 нг 100–200 ng	Весь геном Whole genome	***	***			
Бисульфитная конверсия Bisulfite conversion	BS-seq	50 нг 50 ng	Специфичные области Specific regions	***	**	Высокое разрешение High resolution	Неустойчивость бисульфитной реакции Instability of bisulfite reaction	[80–82]
	MS-SNuPE	2–4 мкг 2–4 µg	Специфичные области Specific regions	***	**			[85]
	SMRT-BS	1 мкг 1 µg	Специфичные области Specific regions	***	**	[84]	[77]	
	MS-HRM	20 нг 20 ng	Специфичные области Specific regions	**	**			
	RRBS	100 нг – 1 мкг 100 ng – 1 µg	Весь геном Whole genome	*** (коррелирует с количеством ДНК) *** (correlates with DNA amount)	***	Ограниченное число сайтов рестрикции, неустойчивость бисульфитной реакции Limited number of restriction sites, instability of bisulfite reaction	[86]	
COBRA	0,1–1 мкг 0.1–1 µg	Весь геном Whole genome	***	**	Высокая пропускная способность High output	[88]		

Окончание табл. 2
The end of table 2

Принцип метода Method principle	Название метода Method name	Исходное количество ДНК Initial DNA amount	Возможное покрытие Possible coverage	Чувствительность Sensitivity	Специфичность Specificity	Преимущество Advantage	Недостаток Disadvantage	Источник литературы Reference
Иммунопреципитация Immunoprecipitation	MeDIP-qPCR	50 нг 50 ng	Специфичные области Specific regions	**	**	Простота, доступность, высокая пропускная способность Simplicity, availability, high output	Низкое разрешение, отсутствие чувствительности к областям с низким содержанием CpG, зависимость от качества антител Low resolution, absence of sensitivity to low CpG regions, dependence on antibody quality	[89] [92]
	MeDIP-seq	50 нг 50 ng	Весь геном Whole genome	**	**			[90]
	MeDIP-chip	3–5 мкг 3–5 µg	Весь геном Whole genome	**	**			
Иммуноферментный анализ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	MS-ELISA	10–200 мкг 100–200 µg	Весь геном Whole genome	***	*	Не требует модификации ДНК, несложное исполнение Doesn't require DNA modification, simple execution	Зависимость от качества антител Dependence on antibody quality	[93]
	НПЛС-UV	3–50 мкг 3–50 µg	Весь геном Whole genome	*	**	Не требует модификации ДНК Doesn't require DNA modification	Требует большого количества ДНК для анализа, дорогостоящее оборудование Requires high amounts of DNA for analysis, expensive equipment	[94]
Анализ структуры ДНК DNA structure analysis	LCMS	100 нг – 1 мкг 100 ng – 1 µg	Весь геном Whole genome	***	***	Высокая чувствительность, не требует высокой степени чистоты ДНК High sensitivity, doesn't require high-purity DNA	Дорогостоящее оборудование Expensive equipment	[96]

Примечание. Здесь и в табл. 3 интенсивность проявления описываемой характеристики метода соответствует низкому (*), среднему (**), высокому (***) уровню.
Note. Here and in the table 3 magnitude of described feature corresponds low (*), medium (**), and high (***) level.

Методы изучения модификаций гистонов
Иммуноферментный анализ, чувствительный
к посттрансляционным модификациям гистонов

Иммуноферментный анализ, чувствительный к посттрансляционным модификациям гистонов (ELISA sensitive to histone post-translational modifications, PTMS-ELISA), – метод, основанный на взаимодействии модифицированных гистонов со специфическими антителами, интенсивность взаимодействия с которыми определяют с помощью ферментативной реакции [97].

Современной разновидностью иммуноферментного анализа, чувствительного к модификациям гистонов, является AlphaLISA. Основной принцип метода заключается в следующем: гистоновые белки взаимодействуют с биотинилированными антителами, специфическими к гистону интереса и акцепторными шариками, специфическими к интересующей модификации гистона. Затем биотиновые метки гибридизуются со стрептавидиновыми (донорными) шариками. При лазерном облучении (680 нм) донорных шариков выделяются короткоживущие молекулы синглетного кислорода, которые взаимодействуют с акцепторными шариками, находящимися в непосредственной близости, при этом испускается усиленный хемилюминесцентный сигнал, детектируемый при 615 нм [71].

Анализ модификаций гистонов с помощью метода
вестерн-блоттинга

Метод вестерн-блоттинга основан на комбинации гель-электрофореза и иммунохимической реакции. Как правило, для изучения гистоновых модификаций используют ядерную, хроматинсодержащую или гистоновую фракции, выделенные из клеток. С помощью антител к различным посттрансляционным модификациям (H3acK9, H3acK27, H4acK12, H3K9me3, H4K20me3 и т. д.) можно исследовать уровень любой интересующей модификации [98]. Стоит отметить, что в ходе манипуляций с белковыми фракциями происходит потеря нативной структуры гистонов, в связи с чем изучение конформационных свойств данным методом становится невозможным [99].

Обратно-фазовая высокоэффективная
жидкостная хроматография

Обратно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ, Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC) является воспроизводимым и эффективным методом для исследования посттрансляционных модификаций гистонов [100]. Для изучения посттрансляционных модификаций гистонов данным методом необходимо экстрагировать гистоны из клеток и лиофилизовать их. После этого лиофилизат растворяют в трифторуксусной кислоте (ТФУ, ион-парный реагент) и проводят ОФ-ВЭЖХ с использованием подвижной фракции на основе воды и ацетонитрила [101]. К недостаткам метода относятся необходимость большого количест-

ва белков для анализа и снижение чувствительности метода при использовании ТФУ.

Обратно-фазовая высокоэффективная
жидкостная хроматография
с масс-спектрометрией

Обратно-фазовая жидкостная хроматография с масс-спектрометрией (ОФ-ВЭЖХ-МС, Reversed-Phase Liquid Chromatography with Mass Spectrometry, RP-LCMS) – еще один метод анализа посттрансляционных модификаций гистонов. Для анализа необходимо использовать лиофилизированный препарат белков, который растворяют в разных соотношениях в муравьиной и уксусной кислотах в качестве ион-парного агента [102]. Использование ТФУ также возможно, однако при этом возникают мешающие анализу аддукты. После хроматографии анализируемый раствор поступает в масс-спектрометр и затем проводится анализ белков. Данный метод обеспечивает структурную идентичность отдельных компонентов смеси с высокой молекулярной специфичностью и чувствительностью выявления модификаций [103]. Единственным весомым недостатком RP-LCMS является дороговизна оборудования.

Сравнительный анализ методов измерения уровня посттрансляционных модификаций гистонов представлен в табл. 3.

Методы изучения ДНК-гистоновых взаимодействий.

Одним из основных методов для изучения ДНК-гистоновых взаимодействий является иммунопреципитация хроматина (ChIP). Для фрагментации хроматина в зависимости от степени ассоциации гистонов с ДНК используют химические, ферментативные агенты или ультразвук. Полученные фрагменты преципитируют с помощью антител, специфических к необходимой модификации гистонов, после чего ДНК очищают от белков и анализируют ее последовательность [104]. Данный метод позволяет детально изучить влияние гистоновых модификаций на определенные гены или области ДНК.

Заключение

В настоящее время эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов рассматривают в роли связующего звена между окружающей средой и геномом. В качестве экзогенных агентов, способных оказывать влияние на основные компоненты системы эпигенетической регуляции транскрипции генов, могут выступать как различные компоненты питания и фармакологические препараты, так и экологические факторы. За последние десятилетия получен огромный объем данных по влиянию ксенобиотиков на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов. Помимо прочего, это обусловливается разнообразием модельных организмов, позволяющих изучать влияние внешних факторов не на отдельные части, а на всю эпигенетическую систему в целом. Для исследований влияния

Таблица 3. Сравнительный анализ методов измерения уровня посттрансляционных модификаций гистонов

Table 3. Comparative analysis of methods for measuring post-translational histone modification level

Название метода Method name	Чувстви- тельность Sensitivity	Специ- фичность Specificity	Преимущество Advantage	Недостаток Disadvantage	Источник литературы Reference
PTMS-ELISA	***	**	Высокая чувствительность High sensitivity	Зависимость от качества антител, невозможно исследовать конформационные свойства белка Dependence on antibody quality, impossible to study protein conformation	[97]
Вестерн-блоттинг Western blotting	***	**			[98]
RP-HPLC	*	**	Эффективность Effectiveness	Дорогостоящее оборудование, необходимость в большом количестве образца, подавление чувствительности из-за трифторуксусной кислоты Expensive equipment, requires high sample amounts, suppression of sensitivity due to trifluoroacetate	[100]
RP-LCMS	***	***	Высокая молекулярная чувствительность, эффективность High molecular sensitivity, effectiveness	Дорогостоящее оборудование Expensive equipment	[103]

экологических факторов и факторов питания на метилирование ДНК и модификации гистонов разработана методологическая база. Широкий спектр современных методов на основе рестрикции, бисульфитной конверсии, иммунологических реакций, а также структурного анализа, позволяет изучать эпигенетический

статус как отдельных генов, так и крупных геномных областей при влиянии различных ксенобиотиков. В то же время благодаря развитию технологии секвенирования нового поколения стало возможным анализировать степень метилирования ДНК всего генома.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Portela A., Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010;28(10):1057–68. DOI: 10.1038/nbt.1685.
- Tikhodeyev O.N. The mechanisms of epigenetic inheritance: how diverse are they? *Biol Rev Camb Philos Soc* 2018;93(4):1987–2005. DOI: 10.1111/brv.12429.
- Murr R. Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Adv Genet* 2010;70:101–41. DOI: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60005-8.
- Буренина О.Ю., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. Некодирующие РНК, регулирующие транскрипцию в клетках эукариот. *Acta Naturae* 2017;9(4(35)):13–26. [Burenina O.Yu., Oretskaya T.S., Kubareva E.A. Non-coding RNAs regulating transcription in eucaryotic cells. *Acta Naturae* 2017;9(4(35)):13–26. (In Russ.)].
- Herceg Z., Lambert M.P., van Veldhoven K. et al. Towards incorporating epigenetic mechanisms into carcinogen identification and evaluation. *Carcinogenesis* 2013;34(9):1955–67. DOI: 10.1093/carcin/bgt212.
- Kanwal R., Gupta K., Gupta S. Cancer epigenetics: an introduction. *Methods Mol Biol* 2015;1238:3–25. DOI: 10.1007/978-1-4939-1804-1_1.
- Jones P.A., Issa J.P., Baylin S. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat Rev Genet* 2016;17(10):630–41. DOI: 10.1038/nrg.2016.93.
- Miousse I.R., Murphy L.A., Lin H. et al. Dose-response analysis of epigenetic, metabolic, and apical endpoints after short-term exposure to experimental hepatotoxicants. *Food Chem Toxicol* 2017;109(Pt 1):690–702. DOI: 10.1016/j.fct.2017.05.013.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;128(4):693–705. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.005.
- Long H.K., King H.W., Patient R.K. et al. Protection of CpG islands from DNA methylation is DNA-encoded and evolutionarily conserved. *Nucleic Acids Res* 2016;44(14):6693–706. DOI: 10.1093/nar/gkw258.
- Paulsen M., Ferguson-Smith A.C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol* 2001;195(1):97–110. DOI: 10.1002/path.890.
- Wu H., Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* 2014;156(1–2):45–68. DOI: 10.1016/j.cell.2013.12.019.
- Cui D., Xu X. DNA Methyltransferases, DNA Methylation, and Age-Associated Cognitive Function. *Int J Mol Sci* 2018;19(5). DOI: 10.3390/ijms19051315.
- Shimbo T., Wade P.A. Proteins that read DNA methylation. *Adv Exp Med Biol* 2016;945:303–20. DOI: 10.1007/978-3-319-43624-1_13.
- Lennartsson A., Ekwall K. Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790(9):863–8. DOI: 10.1016/j.bbagen.2008.12.006.
- Wang G.G., Allis C.D., Chi P. Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med* 2007;13(9):363–72. DOI: 10.1016/j.molmed.2007.07.003.

17. Yang J., Sharma S., Kotter P. et al. Identification of a new ribosome methylation in the 18S rRNA of *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 2015;43(4):2342–52. DOI: 10.1093/nar/gkv058.
18. Izzo A., Schneider R. Chatting histone modifications in mammals. *Brief Funct Genomics* 2010;9(5–6):429–43. DOI: 10.1093/bfpg/elq024.
19. Verdone L., Agricola E., Caserta M. et al. Histone acetylation in gene regulation. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006;5(3):209–21. DOI: 10.1093/bfpg/ell028.
20. Bonasio R. The expanding epigenetic landscape of non-model organisms. *J Exp Biol* 2015;218(Pt 1):114–22. DOI: 10.1242/jeb.110809.
21. Grunstein M., Gasser S.M. Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(7). DOI: 10.1101/cshperspect.a017491.
22. Allshire R.C., Ekwall K. Epigenetic regulation of chromatin states in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7(7):a018770. DOI: 10.1101/cshperspect.a018770.
23. McGaughey D.M., Abaan H.O., Miller R.M. et al. Genomics of CpG methylation in developing and developed zebrafish. *G3 (Bethesda)* 2014;4(5):861–9. DOI: 10.1534/g3.113.009514.
24. Mudbhary R., Sadler K.C. Epigenetics, development, and cancer: zebrafish make their mark. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2011;93(2):194–203. DOI: 10.1002/bdrc.20207.
25. Cavalieri V., Spinelli G. Environmental epigenetics in zebrafish. *Epigenetics Chromatin* 2017;10(1):46. DOI: 10.1186/s13072-017-0154-0.
26. Chatterjee N., Gim J., Choi J. Epigenetic profiling to environmental stressors in model and non-model organisms: Ecotoxicology perspective. *Environ Health Toxicol* 2018;33(3):e2018015–0. DOI: 10.5620/eht.e2018015.
27. Fahrenkrog B. Histone modifications as regulators of life and death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell* 2015;3(1):1–13. DOI: 10.15698/mic2016.01.472.
28. Sinha I., Buchanan L., Ronnerblad M. et al. Genome-wide mapping of histone modifications and mass spectrometry reveal H4 acetylation bias and H3K36 methylation at gene promoters in fission yeast. *Epigenomics* 2010;2(3):377–93. DOI: 10.2217/epi.10.18.
29. Chang S.S., Zhang Z., Liu Y. RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annu Rev Microbiol* 2012;66:305–23. DOI: 10.1146/annurev-micro-092611-150138.
30. Aramayo R., Selker E.U. *Neurospora crassa*, a model system for epigenetics research. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(10):a017921. DOI: 10.1101/cshperspect.a017921.
31. Jeon J., Choi J., Lee G.W. et al. Genome-wide profiling of DNA methylation provides insights into epigenetic regulation of fungal development in a plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Sci Rep* 2015;5:8567. DOI: 10.1038/srep08567.
32. Gonzalez-Aguilera C., Palladino F., Askjaer P.C. *elegans* epigenetic regulation in development and aging. *Brief Funct Genomics* 2014;13(3):223–34. DOI: 10.1093/bfpg/elt048.
33. Liu T., Rechtsteiner A., Egelhofer T.A. et al. Broad chromosomal domains of histone modification patterns in *C. elegans*. *Genome Res* 2011;21(2):227–36. DOI: 10.1101/gr.115519.110.
34. Arico J.K., Katz D.J., van der Vlag J. et al. Epigenetic patterns maintained in early *Caenorhabditis elegans* embryos can be established by gene activity in the parental germ cells. *PLoS Genet* 2011;7(6):e1001391. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001391.
35. Haley B., Tang G., Zamore P.D. *In vitro* analysis of RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Methods* 2003;30(4):330–6. DOI: 10.1016/j.journal.pone.0017939.
36. Boros I.M. Histone modification in *Drosophila*. *Brief Funct Genomics* 2012;11(4):319–31. DOI: 10.1093/bfpg/els029.
37. Robichaud N.F., Sassine J., Beaton M.J. et al. The epigenetic repertoire of *Daphnia magna* includes modified histones. *Genet Res Int* 2012;2012:174860. DOI: 10.1155/2012/174860.
38. McGowan R.A., Martin C.C. DNA methylation and genome imprinting in the zebrafish, *Danio rerio*: some evolutionary ramifications. *Biochem Cell Biol* 1997;75(5):499–506.
39. Goll M.G., Halpern M.E. DNA methylation in zebrafish. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2011;101:193–218. DOI: 10.1016/B978-0-12-387685-0.00005-6.
40. Lindeman L.C., Reiner A.H., Mathavan S. et al. Tiling histone H3 lysine 4 and 27 methylation in zebrafish using high-density microarrays. *PLoS One* 2010;5(12):e15651. DOI: 10.1371/journal.pone.0015651.
41. Harris K.D., Bartlett N.J., Lloyd V.K. *Daphnia* as an emerging epigenetic model organism. *Genet Res Int* 2012;2012:147892. DOI: 10.1155/2012/147892.
42. Kato Y., Shiga Y., Kobayashi K. et al. Development of an RNA interference method in the cladoceran crustacean *Daphnia magna*. *Dev Genes Evol* 2011;220(11–12):337–45. DOI: 10.1007/s00427-011-0353-9.
43. Tamaoki K., Okada R., Ishihara A. et al. Morphological, biochemical, transcriptional and epigenetic responses to fasting and refeeding in intestine of *Xenopus laevis*. *Cell Biosci* 2016;6:2. DOI: 10.1186/s13578-016-0067-9.
44. Hardwick L.J., Philpott A. An oncologists friend: How *Xenopus* contributes to cancer research. *Dev Biol* 2015;408(2):180–7. DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.02.003.
45. Flynt A.S., Lai E.C. RNAi in *Xenopus*: look before you leap. *Genes Dev* 2011;25(11):1105–8. DOI: 10.1101/gad.2062911.
46. Shechter D., Nicklay J.J., Chitta R.K. et al. Analysis of histones in *Xenopus laevis*. I. A distinct index of enriched variants and modifications exists in each cell type and is remodeled during developmental transitions. *J Biol Chem* 2009;284(2):1064–74. DOI: 10.1074/jbc.M807273200.
47. Malone J.H., Chrzanowski T.H., Michalak P. Sterility and gene expression in hybrid males of *Xenopus laevis* and *X. muelleri*. *PLoS One* 2007;2(8):e781. DOI: 10.1371/journal.pone.0000781.
48. Munoz-Lopez M., Garcia-Perez J.L. DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr Genomics* 2010;11(2):115–28. DOI: 10.2174/138920210790886871.
49. Fang X., Qi Y. RNAi in plants: an argonaute-centered view. *Plant Cell* 2016;28(2):272–85. DOI: 10.1105/tpc.15.00920.
50. Luo C., Lam E. Quantitatively profiling genome-wide patterns of histone modifications in *Arabidopsis thaliana* using ChIP-seq. *Methods Mol Biol* 2014;1112:177–93. DOI: 10.1007/978-1-62703-773-0_12.
51. Blewitt M., Whitelaw E. The use of mouse models to study epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(11):a017939. DOI: 10.1101/cshperspect.a017939.
52. Blum M., Ott T. *Xenopus*: An undervalued model organism to study and model human genetic disease. *Cells Tissues Organs* 2018;205(5–6):303–13. DOI: 10.1159/000490898.
53. Martins J., Oliva Teles L., Vasconcelos V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environ Int* 2007;33(3):414–25. DOI: 10.1016/j.envint.2006.12.006.
54. Oikawa M., Inoue K., Shiura H. et al. Understanding the X chromosome inactivation cycle in mice: a comprehensive view provided by nuclear transfer. *Epigenetics* 2014;9(2):204–11. DOI: 10.4161/epi.26939.
55. Hanna C.W., Demond H., Kelsey G. Epigenetic regulation in development: is the mouse a good model for the human? *Hum Reprod Update* 2018;24(5):556–76. DOI: 10.1093/humupd/dmy021.
56. Marczylo E.L., Jacobs M.N., Gant T.W. Environmentally induced epigenetic toxicity: potential public health concerns. *Crit Rev Toxicol* 2016;46(8):676–700. DOI: 10.1080/10408444.2016.1175417.

57. Rosenfeld C.S. Animal models to study environmental epigenetics. *Biol Reprod* 2010;82(3):473–88. DOI: 10.1095/biolreprod.109.080952.
58. Nilsson E.E., Sadler-Riggelman I., Skinner M.K. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environ Epigenet* 2018;4(2):dvy016. DOI: 10.1093/eep/dvy016.
59. Patrizi B., Siciliani de Cumis M. TCDD toxicity mediated by epigenetic mechanisms. *Int J Mol Sci* 2018;19(12). DOI: 10.3390/ijms19124101.
60. Barrera L.N., Johnson I.T., Bao Y. et al. Colorectal cancer cells Caco-2 and HCT-116 resist epigenetic effects of isothiocyanates and selenium *in vitro*. *Eur J Nutr* 2013;52(4):1327–41. DOI: 10.1007/s00394-012-0442-1.
61. Paz M.F., Fraga M.F., Avila S. et al. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2003;63(5):1114–21.
62. Stefanska B., Huang J., Bhattacharyya B. et al. Definition of the landscape of promoter DNA hypomethylation in liver cancer. *Cancer Res* 2011;71(17):5891–903. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3823.
63. Varley K.E., Gertz J., Bowling K.M. et al. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res* 2013;23(3):555–67. DOI: 10.1101/gr.147942.112.
64. Peterson M., Chandler V.L., Bosco G. High SINE RNA Expression correlates with post-transcriptional downregulation of BRCA1. *Genes (Basel)* 2013;4(2):226–43. DOI: 10.3390/genes4020226.
65. Hashimoto Y., Zumwalt T.J., Goel A. DNA methylation patterns as noninvasive biomarkers and targets of epigenetic therapies in colorectal cancer. *Epigenomics* 2016;8(5):685–703. DOI: 10.2217/epi-2015-0013.
66. Menga A., Palmieri E.M., Cianciulli A. et al. SLC25A26 overexpression impairs cell function via mtDNA hypermethylation and rewiring of methyl metabolism. *FEBS J* 2017;284(6):967–84. DOI: 10.1111/febs.14028.
67. Le A.V., Szaumkessel M., Tan T.Z. et al. DNA methylation profiling of breast cancer cell lines along the epithelial mesenchymal spectrum-implications for the choice of circulating tumour DNA methylation markers. *Int J Mol Sci* 2018;19(9). DOI: 10.3390/ijms19092553.
68. Huang Y., Song H., Hu H. et al. Trichostatin inhibits DNA methyltransferase and restores methylation-silenced gene expression in human cervical cancer cells. *Mol Med Rep* 2012;6(4):872–8. DOI: 10.3892/mmr.2012.994.
69. Sun H., Shamy M., Costa M. Nickel and epigenetic gene silencing. *Genes (Basel)* 2013;4(4):583–95. DOI: 10.3390/genes4040583.
70. Wang B., Li Y., Shao C. et al. Cadmium and its epigenetic effects. *Curr Med Chem* 2012;19(16):2611–20. DOI: 10.2174/092986712800492913.
71. Gul S. Epigenetic assays for chemical biology and drug discovery. *Clin Epigenetics* 2017;9:41. DOI: 10.1186/s13148-017-0342-6.
72. Kurdyukov S., Bullock M. DNA methylation analysis: choosing the right method. *Biology (Basel)* 2016;5(1). DOI: 10.3390/biology5010003.
73. Melnikov A.A., Gartenhaus R.B., Levenson A.S. et al. MSRE-PCR for analysis of gene-specific DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2005;33(10):e93. DOI: 10.1093/nar/gni092.
74. Boers R., Boers J., de Hoon B. et al. Genome-wide DNA methylation profiling using the methylation-dependent restriction enzyme LpnPI. *Genome Res* 2018;28(1):88–99. DOI: 10.1101/gr.222885.117.
75. Jelinek J., Madzo J. DREAM: a simple method for DNA methylation profiling by high-throughput sequencing. *Methods Mol Biol* 2016;1465:111–27. DOI: 10.1007/978-1-4939-4011-0_10.
76. Jelinek J., Lee J.T., Cesaroni M. et al. Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation (DREAM). *Methods Mol Biol* 2018;1708:247–65. DOI: 10.1007/978-1-4939-7481-8_13.
77. Yang Y., Scott S.A. DNA methylation profiling using long-read Single Molecule Real-Time Bisulfite Sequencing (SMRT-BS). *Methods Mol Biol* 2017;1654:125–34. DOI: 10.1007/978-1-4939-7231-9_8.
78. Deatherage D.E., Potter D., Yan P.S. et al. Methylation analysis by microarray. *Methods Mol Biol* 2009;556:117–39. DOI: 10.1007/978-1-60327-192-9_9.
79. Liu L., Wylie R.C., Hansen N.J. et al. Profiling DNA methylation by bisulfite genomic sequencing: problems and solutions. *Methods Mol Biol* 2004;287:169–79. DOI: 10.1385/1-59259-828-5:169.
80. Parrish R.R., Day J.J., Lubin F.D. Direct bisulfite sequencing for examination of DNA methylation with gene and nucleotide resolution from brain tissues. *Curr Protoc Neurosci* 2012;Chapter 7: Unit 7.24. DOI: 10.1002/0471142301.ns0724s60.
81. Delaney C., Garg S.K., Yung R. Analysis of DNA methylation by pyrosequencing. *Methods Mol Biol* 2015;1343:249–64. DOI: 10.1007/978-1-4939-2963-4_19.
82. Bernstein D.L., Kameswaran V., Le Lay J.E. et al. The BisPCR(2) method for targeted bisulfite sequencing. *Epigenetics Chromatin* 2015;8:27. DOI: 10.1186/s13072-015-0020-x.
83. Ku C.S., Naidoo N., Wu M. et al. Studying the epigenome using next generation sequencing. *J Med Genet* 2011;48(11):721–30. DOI: 10.1136/jmedgenet-2011-100242.
84. Wojdacz T.K., Dobrovic A., Hansen L.L. Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc* 2008;3(12):1903–8. DOI: 10.1038/nprot.2008.191.
85. Gonzalgo M.L., Liang G. Methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SNuPE) for quantitative measurement of DNA methylation. *Nat Protoc* 2007;2(8):1931–6. DOI: 10.1038/nprot.2007.271.
86. Meissner A., Gnirke A., Bell G.W. et al. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 2005;33(18):5868–77. DOI: 10.1093/nar/gki901.
87. Harris R.A., Wang T., Coarfa C. et al. Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. *Nat Biotechnol* 2010;28(10):1097–105. DOI: 10.1038/nbt.1682.
88. Bilichak A., Kovalchuk I. The Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) assay for the analysis of locus-specific changes in methylation patterns. *Methods Mol Biol* 2017;1456:63–71. DOI: 10.1007/978-1-4899-7708-3_5.
89. Zhang X., Sun Q., Shan M. et al. Promoter hypermethylation of ARID1A gene is responsible for its low mRNA expression in many invasive breast cancers. *PLoS One* 2013;8(1):e53931. DOI: 10.1371/journal.pone.0053931.
90. Hsu Y.W., Huang R.L., Lai H.C. MeDIP-on-Chip for methylation profiling. *Methods Mol Biol* 2015;1249:281–90. DOI: 10.1007/978-1-4939-2013-6_21.
91. Lindner R., Puttagunta R., Nguyen T. et al. DNA methylation temporal profiling following peripheral versus central nervous system axotomy. *Sci Data* 2014;1:140038. DOI: 10.1038/sdata.2014.38.
92. Staunstrup N.H., Starnawska A., Nyegaard M. et al. Genome-wide DNA methylation profiling with MeDIP-seq using archived dried blood spots. *Clin Epigenetics* 2016;8:81. DOI: 10.1186/s13148-016-0242-1.
93. So M.Y., Tian Z., Phoon Y.S. et al. Gene expression profile and toxic effects in human bronchial epithelial cells exposed to zearalenone. *PLoS One* 2014;9(5):e96404. DOI: 10.1371/journal.pone.0096404.
94. Lisanti S., Omar W.A., Tomaszewski B. et al. Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. *PLoS One* 2013;8(11):e79044. DOI: 10.1371/journal.pone.0079044.
95. Li X.L., Yuan J., Dong Y.S. et al. Optimization of an HPLC method for

- determining the genomic methylation levels of taxus cells. *J Chromatogr Sci* 2016;54(2):200–5. DOI: 10.1093/chromsci/bmv129.
96. Gomez D., Shankman L.S., Nguyen A.T. et al. Detection of histone modifications at specific gene loci in single cells in histological sections. *Nat Methods* 2013;10(2):171–7. DOI: 10.1038/nmeth.2332.
97. Dai B., Giardina C., Rasmussen T.P. Quantitation of nucleosome acetylation and other histone posttranslational modifications using microscale NU-ELISA. *Methods Mol Biol* 2013;981:167–76. DOI: 10.1007/978-1-62703-305-3_13.
98. Jayani R.S., Ramanujam P.L., Galande S. Studying histone modifications and their genomic functions by employing chromatin immunoprecipitation and immunoblotting. *Methods Cell Biol* 2010;98:35–56. DOI: 10.1016/S0091-679X(10)98002-3.
99. Shechter D., Dormann H.L., Allis C.D. et al. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc* 2007;2(6):1445–57. DOI: 10.1038/nprot.2007.202.
100. Huang H., Lin S., Garcia B.A. et al. Quantitative proteomic analysis of histone modifications. *Chem Rev* 2015;115(6):2376–418. DOI: 10.1021/cr500491u.
101. Gurley L.R., Valdez J.G., Prentice D.A. et al. Histone fractionation by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1983;129(1):132–44. DOI: 10.1016/0003-2697(83)90061-1.
102. You J., Wang L., Saji M. et al. High-sensitivity TFA-free LC-MS for profiling histones. *Proteomics* 2011;11(16):3326–34. DOI: 10.1002/pmic.201000445.
103. Pitt J.J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev* 2009;30(1):19–34. DOI: PMC2643089
104. Pillai S., Dasgupta P., Chellappan S.P. Chromatin immunoprecipitation assays: analyzing transcription factor binding and histone modifications *in vivo*. *Methods Mol Biol* 2015;1288:429–46. DOI: 10.1007/978-1-4939-2474-5_25.

Вклад авторов

В.П. Максимова: проведение системного анализа и обобщение данных, подготовка текста обзора;
 П.Е. Бугаева: подготовка раздела «Модельные организмы для изучения механизмов эпигенетической регуляции транскрипции»;
 Е.М. Жидкова, О.Г. Усалка: подготовка раздела «Методы изучения метилирования ДНК»;
 Е.А. Лесовая: подготовка раздела «Методы изучения модификаций гистонов»;
 Г.А. Белицкий: проведение системного анализа и обобщение данных;
 М.Г. Якубовская: определение структуры обзора, проведение системного анализа и обобщение данных;
 К.И. Кирсанов: определение структуры обзора, проведение системного анализа и обобщение данных.

Authors' contributions

V.P. Maksimova: systemic analysis and data consolidation, manuscript preparation;
 P.E. Bugaeva: preparation of the section “Model organisms for study the mechanisms of epigenetic regulation of transcription”;
 E.M. Zhidkova, O.G. Usalka: preparation of the section “Methods for analysis of DNA methylation”;
 E.A. Lesovaya: preparation of the section “Methods for analysis of histone modifications”;
 G.A. Belitsky: systemic analysis and data consolidation;
 M.G. Yakubovskaya: determination of review structure, systemic analysis and data consolidation.
 K.I. Kirsanov: determination of review structure, systemic analysis and data consolidation.

ORCID авторов/ORCID of authors

В.П. Максимова/V.P. Maksimova: <https://orcid.org/0000-0003-0896-2952>
 Е.А. Лесовая/E.A. Lesovaya: <https://orcid.org/0000-0002-1967-9637>
 М.Г. Якубовская/M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>
 К.И. Кирсанов/K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-75-00115).

Financing. The study was performed with support from the Russian Science Foundation (project No. 18-75-00115).

Статья поступила: 11.09.2019. **Принята к публикации:** 30.09.2019.

Article received: 11.09.2019. **Accepted for publication:** 30.09.2019.

Ассоциированные с полом и метаболическими нарушениями изменения в уровне матричных металлопротеиназ в экзосомах при колоректальном раке

Н.В. Юнусова, Е.А. Замбалова, М.Р. Патышева, А.А. Димча, О.В. Черемисина,
С.Г. Афанасьев, И.В. Кондакова

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;
Россия, 634009 Томск, Кооперативный переулок, 5

Контакты: Елена Анатольевна Замбалова etugutova@mail.ru

Цель исследования – оценить содержание матричных металлопротеиназ (ММП) MMP9 и MMP2, а также их индуктора EMMPRIN в циркулирующих экзосомах больных колоректальным раком (КРР) в связи с клиническо-морфологическими параметрами, а также с наличием метаболического синдрома для поиска перспективных экзосомальных маркеров, связанных с инвазией, метастазированием и метаболическими нарушениями.

Материалы и методы. В исследование были включены 40 больных КРР (T2–4N0–2M0–1) и 10 пациентов контрольной группы. Экзосомы плазмы крови выделены методом ультрафильтрации с ультрацентрифугированием. Уровни MMP9, MMP2, а также их индуктора EMMPRIN оценивали с помощью проточной цитометрии.

Результаты и заключение. Экспрессия MMP9 в образцах экзосом была значимо выше у больных КРР по сравнению с больными с колоректальными полипами. Доля MMP9-отрицательных образцов латексных частиц, содержащих экзосомы, и образцов с положительной экспрессией MMP9/MMP2/EMMPRIN, наоборот, была выше у пациентов с полипами по сравнению с больными КРР. Образцы латексных частиц, содержащих экзосомы, экспрессирующие MMP9 и отрицательные по 2 другим маркерам, преобладали как у больных КРР, так и у пациентов контрольной группы. Не выявлено значимых различий в экспрессии ММП и EMMPRIN в образцах экзосом плазмы крови больных КРР в зависимости от возраста, стадии, степени дифференцировки и локализации опухолевого процесса. Выявлены гендерные различия в экспрессии ММП и EMMPRIN в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы у больных КРР. Не обнаружено взаимосвязей экспрессии ММП и EMMPRIN в экзосомах и наличия метаболического синдрома, антропометрических параметров, уровней общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой плотности и липопротеинов высокой плотности. Однако выявлены связи экспрессии образцов латексных частиц, содержащих экзосомы, экспрессирующих MMP9 и отрицательных по MMP2 и EMMPRIN ($r = 0,51$ и $r = -0,56$ соответственно; $p < 0,05$), а также экспрессирующих MMP9 и EMMPRIN и отрицательных по MMP2 ($r = -0,60$ и $r = 0,57$ соответственно; $p < 0,05$), с уровнями триглицеридов и глюкозы в сыворотке крови. Необходимы дальнейшие исследования по изучению характеристик экзосом, ассоциированных с метаболическими нарушениями, и возможности их использования в качестве диагностических, прогностических или предикторных маркеров.

Ключевые слова: экзосома, член семейства матричных металлопротеиназ, MMP2, MMP9, колоректальный рак, метаболический синдром

Для цитирования: Юнусова Н.В., Замбалова Е.А., Патышева М.Р. и др. Ассоциированные с полом и метаболическими нарушениями изменения в уровне матричных металлопротеиназ в экзосомах при колоректальном раке. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(3):28–36.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-3-28-36

Changes of exosomal matrix metalloproteinases level in colorectal cancer associated with sex and metabolic disturbance

N. V. Yunusova, E. A. Zambalova, M. R. Patysheva, A. A. Dimcha, O. V. Cheremisina, S. G. Afanas'ev, I. V. Kondakova

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

The objective is to evaluate the contents of matrix metalloproteinases (MMP) MMP9, MMP2, as well as their inducer EMMPRIN in circulating exosomes of patients with colorectal cancer in relation with clinical and morphological parameters, as well as with the presence of metabolic syndrome to search for promising exosomal markers associated with invasion, metastasis and metabolic disorders.

Materials and methods. The study included 40 patients with colorectal cancer (T2–4N0–2M0–1) and 10 control patients. Exosomes of blood plasma were isolated by ultrafiltration with ultracentrifugation. The level of MMP9, MMP2 and their inducer EMMPRIN in exosomes was evaluated by flow cytometry.

Results and conclusion. The level of MMP9-positive exosomes was significantly higher in patients with colorectal cancer compared with patients with colorectal polyps. The proportion of MMP9-negative and triple positive MMP9+/MMP2+/EMMPRIN+ exosomes, on the contrary, was higher in patients with polyps compared with patients with colorectal cancer. Mixed subpopulation of MMP9+/MMP2–/EMMPRIN–exosomes

prevailed both in patients with colorectal cancer and in control patients. There were no significant differences in the subpopulations of MMP and EMMPRIN in the exosomes of colorectal cancer patients depending on the age, stage, grade and localization. Gender differences in the occurrence of a triple-positive exosome subpopulation in colorectal cancer patients have been revealed. No relationship was found between the expression of MMP and EMMPRIN in exosomes and the presence of the metabolic syndrome, anthropometric parameters, the level of total cholesterol, low density lipoprotein cholesterol, high density lipoprotein cholesterol. However, the relationships between MMP9+/MMP2-/EMMPRIN-, MMP9+/MMP2-/EMMPRIN- and the level of triglycerides and glucose in blood serum were revealed. Further studies are needed to study the characteristics of exosomes associated with metabolic disorders and the possibility of their use as diagnostic, prognostic, or predictor biomarkers.

Key words: exosome, the member of matrix metalloproteinases family, MMP2, MMP9, colorectal cancer, metabolic syndrome

For citation: Yunusova N.V., Zambalova E.A., Patysheva M.R. et al. Changes of exosomal matrix metalloproteinases level in colorectal cancer associated with sex and metabolic disturbance. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2019;6(3):28–36.*

Введение

Колоректальный рак (КРР) в настоящее время является одним из наиболее распространенных видов злокачественных новообразований и занимает 2–3-е место в структуре онкологической заболеваемости в России и большинстве развитых стран.

В настоящее время большое значение в процессах инвазии и метастазирования опухолей придают секретрируемыми внеклеточным везикулам, которые представлены экзосомами (30–100 нм) и микровезикулами (100–1000 нм). Они обнаружены во многих биологических жидкостях, таких как плазма, сыворотка крови, моча, слюна, грудное молоко, спинномозговая жидкость, асцит [1]. Тетраспанины CD9, CD63, CD81 являются экзосомальными биомаркерами и составляют около 12 % всех белков экзосом [2, 3]. Показано, что экзосомы несут различные протеазы, их активаторы и ингибиторы. В процессах опухолевой инвазии и метастазирования наибольшее значение отводят тетраспанинассоциированным протеазам, к которым относят, главным образом, ADAM10, ADAM17 и матриксные металлопротеиназы (ММП) [3]. Секретируемые (ММП1, ММП2, ММП3, ММП7, ММП9, ММП10, ММП13) и мембраносвязанные (ММП14, ММП24, ММП25) ММП выявлены в экзосомах, однако наиболее изучены ММП2 и ММП9. Также в экстраклеточных везикулах выявлен индуктор ММП EMMPRIN (CD147), а также ингибиторы ММП TIMP1, TIMP2 и TIMP3 [4]. Как незрелые, так и зрелые формы ММП2, ММП9, ММП 14, имеющие протеолитическую активность, выявлены в экстраклеточных везикулах, в том числе и в экзосомах, происходящих от опухолевых клеточных линий, включая клеточные линии КРР, а также нетрансформированных клеточных линий. Необходимо отметить, что зрелые формы ADAM-протеаз преимущественно находятся в экзосомах [5, 6]. Субстратами для ММП являются коллаген 4-го типа, эластин, фибронектин и ламинин, а также белки клеточной поверхности – E-кадгерин, фибрин и интерлейкин 1. Таким образом, они модулируют взаимодействие клеток и внеклеточного матрикса [7]. Высокая внеклеточная активность ММП способствует росту опухоли, тканевой инвазии, ангиогенезу и метастазированию [8]. Перенос экзосомами ММП2, ММП3 и ММП9 увели-

чивает их содержание в отдаленных от первичной опухоли участках, в частности в лимфатических узлах и ткани легкого [9].

Примерно у 55–60 % больных КРР возникает на фоне метаболического синдрома. В соответствии с нашими ранее опубликованными данными метаболический синдром обнаружен примерно в 60 % случаев у больных КРР со стадиями II–III и менее распространен при метастатическом КРР [10, 11]. Показано, что экзосомы несут комплекс маркеров, связанных с ожирением и резистентностью к инсулину, а экзосомы, секретрируемые адипоцитами, богаты ММП3 и способствуют метастазированию [12, 13]. В настоящее время свойства экзосом при КРР, связанные с ожирением или метаболическим синдромом, не описаны. Однако с учетом распространенности синдрома у больных с локализованными формами КРР представляется актуальным поиск таких экзосомальных маркеров, которые, возможно, будут полезны для диагностики КРР. У трети пациентов с локализованными формами КРР в течение 3 лет возникают рецидивы или развиваются гематогенные метастазы в печень [6]. Поэтому важен поиск молекулярных предикторов гематогенного метастазирования у пациентов с локализованным и местнораспространенным КРР в целях персонализации адъювантной терапии.

Цель исследования – оценка уровня содержания ММП9, ММП2, а также их индуктора EMMPRIN в циркулирующих экзосомах больных КРР и определение возможной ассоциации протеаз с клиническими и морфологическими параметрами, а также с наличием метаболического синдрома для поиска перспективных экзосомальных маркеров, связанных с инвазией, метастазированием и метаболическими нарушениями.

Материалы и методы

Образцы крови пациентов группы контроля ($n = 10$; возраст $45,3 \pm 4,1$ года) и больных КРР ($n = 40$; возраст $58,6 \pm 1,6$ года) с различными стадиями (T2–4N0–2M0–1) получены в НИИ онкологии ТНИМЦ (г. Томск). В контрольную группу были включены 10 пациентов, обследованных в условиях поликлинического отделения НИИ онкологии ТНИМЦ, у которых при обследовании, в том числе видеокOLONоскопии, выявлены

колоректальные полипы, исключена злокачественная опухоль толстой и прямой кишки, а также другая онкологическая патология. Критериями исключения при формировании группы КРР явились первично-множественные формы КРР, стадия Ia (T1N0M0), а также рак прямой кишки с поражением средне- и нижеампулярного отдела.

Все пациенты с КРР были разделены на 2 подгруппы в зависимости от наличия метаболического синдрома: с метаболическим синдромом ($n = 24$) и без метаболического синдрома ($n = 16$). Критерием включения в группу с метаболическим синдромом с учетом рекомендаций Международной федерации диабета (2005) было наличие абдоминального типа ожирения (окружность талии >94 см для мужчин и >80 см для женщин) в сочетании, по крайней мере, с 2 из 4 дополнительных критериев: повышение уровня триглицеридов в сыворотке крови $>1,7$ ммоль/л или лечение дислипидемии; снижение уровня холестерина (ХС) липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) $<1,03$ ммоль/л для мужчин и $<1,29$ ммоль/л для женщин; высокое артериальное давление (систолическое >135 мм рт. ст. или диастолическое >85 мм рт. ст., или терапия артериальной гипертонии); повышение уровня глюкозы крови натощак $>5,6$ ммоль/л или выявленный сахарный диабет 2-го типа. Дополнительно у всех больных рассчитывали индекс массы тела по стандартной формуле, соотношение талии и бедер (waist-hip ratio), отражающее тип распределения жира. Уровень общего ХС определяли на биохимическом анализаторе. Клинические и гистологические параметры пациентов представлены в табл. 1. Исследование было одобрено локальным комитетом по медицинской этике НИИ онкологии ТНИМЦ.

Выделение экзосом. Экзосомы плазмы крови выделяли методом ультрафильтрации с ультрацентрифугированием [5]. Выделенные экзосомы ресуспендировали в 350 мкл PBS. Аликвоты экзосом замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80 °С.

Электронная микроскопия экзосом и количественная оценка белка в экзосомах. Для негативного контрастирования образцы экзосом сорбировали на медные сетки с формваровой подложкой, стабилизированной углеродом, в течение 1 мин и 10 с и контрастировали 2 % раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты. Сетки были изучены с использованием просвечивающего электронного микроскопа Jem 1400 (Jeol, Япония), изображения получены с помощью цифровой камеры Veleta (Olympus Corporation, Япония).

Для оценки концентрации белка в экзосомах использовали набор количественного определения NanoOrange Protein (Molecular Probes, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Проточная цитометрия. Для выполнения проточной цитометрии 10 мкл (3×10^5 альдегид-сульфатных латексных частиц диаметром 4 мкм (4 %, A37304, Invitrogen)) отмывали дважды по 100 мкл 0,1 М MES-буфером

Таблица 1. Клинические и гистологические параметры больных КРР

Table 1. Clinical and histological parameters of patients with CRC

Параметр Parameter	n	%
Пол, n (%): Gender, n (%):		
мужской male	19	47,5
женский female	21	52,5
Возраст, лет: Age, years:		
≤ 59	12	30
> 59	28	70
Стадия: Stage:		
неметастатический КРР: non-metastatic CRC:	18	45,0
T2–4N0M0	17	42,5
T2–4N1–2M0	5	12,5
метастатический КРР metastatic CRC		
Степень дифференцировки: Differentiation grade:		
G ₁ –G ₂	35	87,5
G ₃	5	12,5
Метаболический синдром: Metabolic syndrome:		
есть present	22	55
нет absent	18	45

Примечание. КРР – колоректальный рак.

Note. CRC – colorectal cancer.

(рН 5,5; 3000g, 15 мин) и ресуспендировали в 25 мкл MES-буфера. Затем к 12,5 мкл частиц вносили по 3 мкг моноклональных антител против CD9 (ab134375, Abscam) при комнатной температуре в течение 14 ч при осторожном перемешивании. Аликвоты экзосом (около 30 мкг белка) инкубировали с комплексами антител – латексные частицы в 100 мкл PBS при температуре 4 °С в течение 14 ч при осторожном перемешивании. Реакцию блокировали 0,2 М глицином в течение 30 мин при 4 °С. Комплексы экзосомы – антител – латексные частицы дважды отмывали промывочным буфером (PBS с добавлением 2 % бычьей сыворотки, деплетированной от экзосом), инкубировали с блокирующим иммуноглобулином G (BD Biosciences, США) при комнатной температуре в течение 10 мин, отмывали, затем проводили инкубацию с FITC-конъюгированными антителами против тетраспанинов (CD63, 557288, BD Biosciences, США; CD81, 551108, BD Biosciences, США, CD24, 555427, BD Biosciences, США) при температуре 4 °С в течение 50 мин. Комплексы отмывали дважды промывочным буфером и исследовали образцы на цитометре Cytotflex (Beckman

Coulter, США), данные анализировали с помощью программы CytExpert 2.0 Software. Медиана интенсивности флуоресценции (MFI) экзосом была проанализирована по сравнению с изотипическим контролем (BD Bioscience, США) и отрицательным контролем.

Анализ экспрессии MMP и EMMPRIN в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы. Аликвоты экзосом (около 30 мкг белка) инкубировали с 3×10^5 анти-CD9-латексными частицами в 150 мкл PBS при температуре 4 °С в течение ночи при осторожном перемешивании и блокировали в 0,2 М глицине в течение 30 мин, затем окрашивали anti-EMMPRIN (CD147) – APC (5 мл на тест, MAB5047, Abnova, США), anti-MMP2-PE (0,3–0,5 мг на тест, ABIN6170380, Antibodies-online, Германия) и anti-MMP9-FITC (1 мг на тест, ABIN2482809Antibodies-online, Германия, США) в течение 20 мин при комнатной температуре. Проточная цитометрия выполнена на цитометре Cytotflex (Beckman Coulter, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения CytExpert 2.0.

Статистический анализ. Статистическая обработка данных проведена в программе Statistica 10.0. Данные проанализированы на соответствие выборки нормальному распределению с использованием критерия Шапиро–Уилка. Все данные выражены как средние со стандартными ошибками. Достоверность различий была оценена с помощью U-критерия Манна–Уитни и критерия Краскела–Уоллиса. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$. Рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена (r). При анализе учитывали только статистически значимые корреляционные связи ($p < 0,05$).

Результаты

Характеристика экзосом плазмы. Экзосомальная природа выделенных везикул была подтверждена при трансмиссионной электронной микроскопии. В препаратах, выделенных из плазмы крови контрольных пациентов и больных КРР, экзосомы визуализировались как четко структурированные частицы чашеобразной формы низкой электронной плотности с сохранной мембраной (рис. 1). В препаратах также присутствовали частицы, не соответствующие экзосомам по морфологии, их размер не превышал 100 нм. Выделенные экзосомы также охарактеризованы методом проточной цитометрии на наличие экзосомальных маркеров (CD24, CD9, CD81 и CD63). Сочетание конъюгированных и неконъюгированных антител позволяет идентифицировать различные субпопуляции экзосом (рис. 2). CD9/CD24-субпопуляция экзосом преобладала как у больных с колоректальными полипами, так и во всех подгруппах больных КРР. MFI CD9/CD24-популяции в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы больных КРР II стадии, составила 5500 ± 600 , больных КРР III стадии – 2400 ± 360 ($p < 0,05$) (рис. 3). Кроме этого, MFI CD9/CD24-популяции в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы больных КРР III

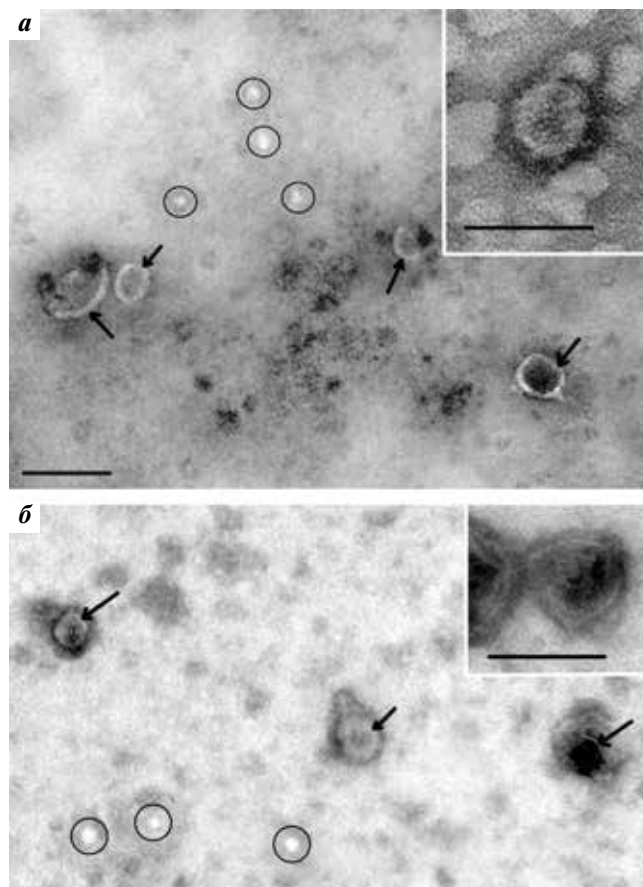


Рис. 1. Общий вид препаратов экзосом, полученных из плазмы крови: а – здорового пациента; б – больного колоректальным раком. На вставках изображены экзосомы. Стрелки указывают на экзосомы, эллипсы – «не-везикулы». Размер шкалы соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, отрицательное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой

Fig. 1. General appearance of exosome samples retrieved from plasma: а – control patient; б – patient with colorectal cancer. Panels show exosomes. Arrows point at exosomes, ellipses at “non-vesicles”. Scale is 100 nm. Electron microscopy, negative contrast with phosphotungstic acid

стадии, была статистически значимо выше, чем у больных метастатическим КРР: 2400 ± 360 и 4000 ± 490 соответственно (см. рис. 3).

Анализ экспрессии MMP и EMMPRIN в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы плазмы крови. Для анализа экспрессии MMP и EMMPRIN выполняли проточную цитометрию с использованием латексных частиц, покрытых антителами к CD9. Стратегия гейтирования представлена на рис. 3. Поскольку наиболее часто в экзосомах больных КРР и контрольных пациентов экспрессировалась MMP9, акцент в работе сделан на изучение образцов латексных частиц, содержащих MMP9-положительные экзосомы (табл. 2). Выявлено, что MMP9-положительные экзосомы чаще встречались в плазме крови больных КРР, однако образцы частиц, содержащих экзосомы, экспрессирующие как MMP9, так и MMP2 и EMMPRIN, чаще встречались у пациентов контрольной группы. У пациентов как с колоректальными полипами, так и с КРР

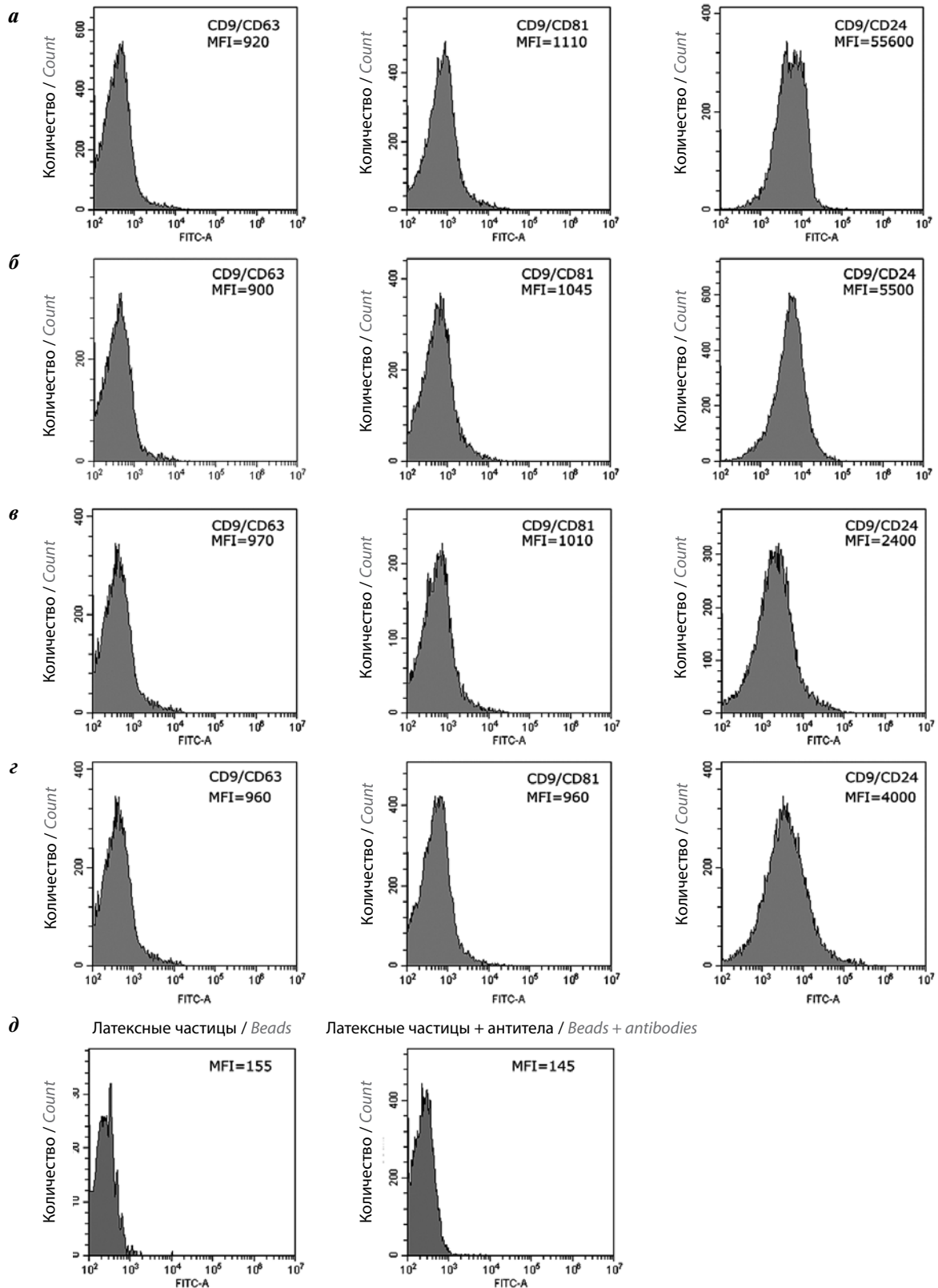


Рис. 2. Экспрессия CD63, CD81 и CD24 на CD9-положительных экзосомах плазмы крови здоровых лиц (а), больных колоректальным раком со II стадией (б), больных колоректальным раком с III стадией (в) и больных метастатическим КРР (з). Изотипический контроль и отрицательный контроль (латексные частицы, покрытые антителами к CD9 с CD81 FITC-антителами) (д). Представлены средние значения медианы интенсивности флуоресценции (MFI)

Fig. 2. Expression of CD63, CD81 and CD24 on CD9-positive exosomes from plasma of control patients (a), patients with stage II colorectal cancer (б), patients with stage III colorectal cancer (в) and patients with metastatic colorectal cancer (з). Isotypic control and negative control (latex particles covered in antibodies against CD9 with CD81 FITC-antibodies) (д). Mean values of median fluorescence intensity (MFI) are presented

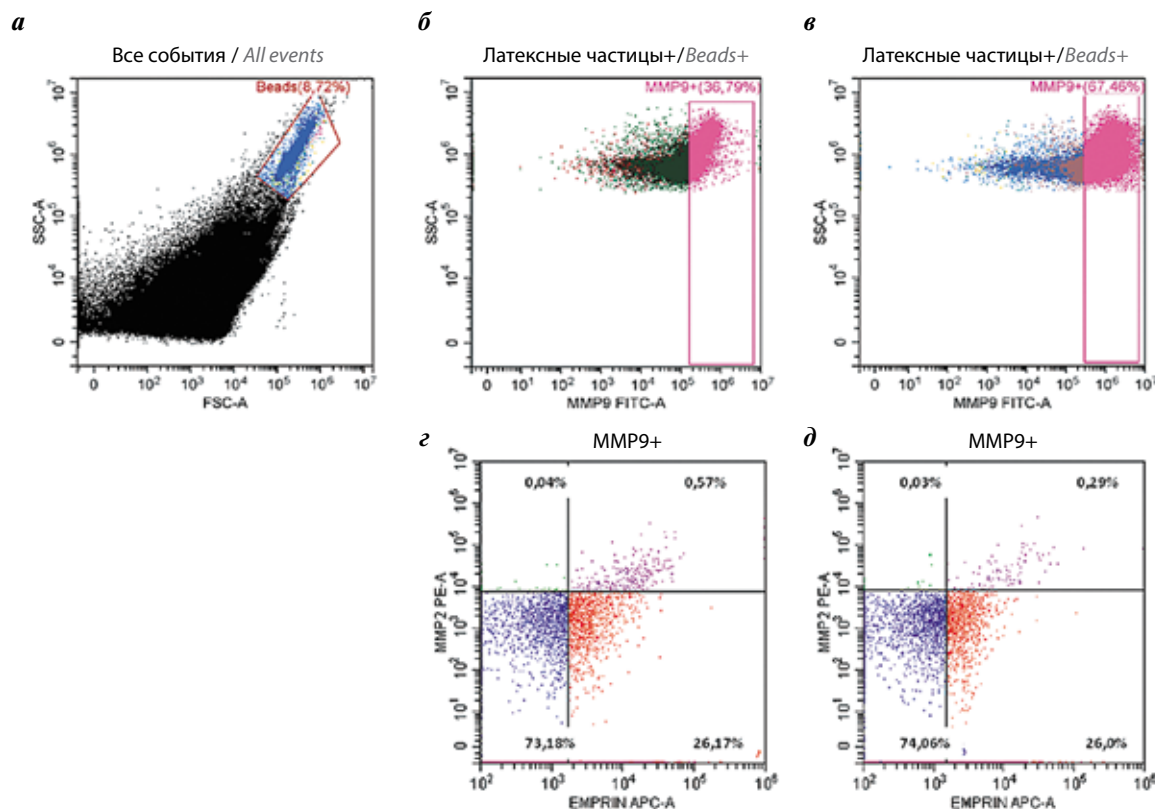


Рис. 3. Проточная цитометрия плазменных экзосом: а – прямое светорассеяние (FSC-A) и боковое светорассеяние (SSC-A) комплексов экзосом с альдегид-сульфатными латексными частицами; б – экспрессия матричной металлопротеиназы (ММР) MMP9 в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы у контрольных пациентов; в – экспрессия MMP9 в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы у больных колоректальным раком; г, д – тройное мечение антителами против MMP9, MMP2 и EMMPRIN образцов частиц, содержащих экзосомы контрольных пациентов (г) и больных колоректальным раком (д)

Fig. 3. Flow cytometry of plasma exosomes: а – forward scatter (FSC-A) and side scatter (SSC-A) of exosome complexes with aldehyde sulphate latex particles; б – expression of matrix metalloprotease (MMP) MMP9 in samples of latex particles containing exosomes in control patients; в – expression of MMP9 in samples of latex particles containing exosomes in patients with colorectal cancer; г, д – triple labeling with antibodies against MMP9, MMP2 and EMMPRIN of particles containing exosomes of control patients (г) and patients with colorectal cancer (д)

доминировали образцы латексных частиц, содержащих экзосомы, экспрессирующие MMP9, но отрицательные по MMP2 и EMMPRIN (до 73 %). Выявлены гендерные различия в экспрессии MMP9 и EMMPRIN у больных КРР. У женщин образцы латексных частиц, содержащих экзосомы с положительной экспрессией MMP и EMMPRIN, встречались чаще, чем у мужчин ($0,38 \pm 0,06$ и $0,20 \pm 0,05$ % соответственно; $p < 0,05$). Вообще, MMP9-положительные экзосомы у больных КРР также несколько чаще встречались у женщин, однако различия были недостоверными (табл. 3). Не выявлено значимых различий в экспрессии MMP и EMMPRIN в образцах экзосом плазмы крови больных КРР в зависимости от возраста, стадии, степени дифференцировки и локализации опухолевого процесса.

Связь MMP экзосом с метаболическим синдромом и метаболическими нарушениями у больных КРР. В данном исследовании заболеваемость метаболическим синдромом у больных КРР составляла 60 %. Уровни MMP и EMMPRIN в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы, больных КРР был проанализирован не только с наличием метаболического синдрома,

но и с некоторыми антропометрическими параметрами, а также с уровнем глюкозы и липидным спектром сыворотки крови (триглицериды, общий ХС, ХС липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), ХС ЛПВП). Не выявлено связей экспрессии MMP и EMMPRIN в экзосомах с наличием метаболического синдрома, антропометрическими параметрами, уровнями общего ХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП. Однако выявлены связи с уровнями триглицеридов и глюкозы в сыворотке крови. Графики рассеяния уровня экспрессии образцов латексных частиц, содержащих экзосомы плазмы крови MMP9+/MMP2-/EMMPRIN- и MMP9+/MMP2-/EMMPRIN+, от уровня триглицеридов ($r = 0,51$ и $r = -0,56$ соответственно; $p < 0,05$) и от уровня глюкозы плазмы крови ($r = -0,60$ и $r = 0,57$ соответственно; $p < 0,05$) представлены на рис. 4.

Обсуждение

Экспрессия MMP и EMMPRIN в экзосомах при КРР не зависела от стадии заболевания, поэтому маловероятно, что эти биомаркеры в экзосомах могут использоваться в качестве прогностических циркулирующих

Таблица 2. Экспрессия матричных металлопротеиназ (ММР) и их индуктора ЕММРIN в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы у здоровых лиц и больных колоректальным раком, % ($m \pm M$)

Table 2. Expression of matrix metalloproteases (MMP) and their inductor EMMPRIN in samples of latex particles containing exosomes in control patients and patients with colorectal cancer, % ($m \pm M$)

Показатель Characteristic	Контрольная группа Control patients	Больные колоректальным раком Patients with colorectal cancer	<i>p</i>
MMP9+	40,0 ± 8,12	60,9 ± 6,86	<0,05
MMP9 –	60,0 ± 7,13	39,1 ± 6,8	<0,05
MMP9+/MMP2+/EMMPRIN+	0,57 ± 0,12	0,28 ± 0,05	<0,05
MMP9+/MMP2–/EMMPRIN –	72,7 ± 6,66	71,1 ± 2,44	>0,05
MMP9+/MMP2–/EMMPRIN+	26,8 ± 4,00	28,6 ± 2,00	>0,05
MMP9+/MMP2+/EMMPRIN –	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	>0,05

Таблица 3. Гендерные различия в экспрессии матричных металлопротеиназ (ММР) и их индуктора ЕММРIN (%) в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы, у здоровых лиц и больных колоректальным раком, % ($m \pm M$)

Table 3. Gender differences in expression of matrix metalloproteases (MMP) and their inductor EMMPRIN (%) in samples of latex particles containing exosomes in control patients and patients with colorectal cancer, % ($m \pm M$)

Показатель Characteristic	Мужчины Males	Женщины Females	<i>p</i>
MMP9+	46,8±7,43	64,6±8,00	>0,05
MMP9–	53,2 ± 7,15	34,4 ± 7,12	>0,05
MMP9+/MMP2+/EMMPRIN+	0,20 ± 0,05	0,38 ± 0,06	<0,05
MMP9+/MMP2–/EMMPRIN–	72,7 ± 3,17	70,4 ± 3,90	>0,05
MMP9+/MMP2–/EMMPRIN+	27,1 ± 2,18	29,2 ± 2,00	>0,05
MMP9+/MMP2+/EMMPRIN–	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	>0,05

маркеров, полезных для оптимизации адъювантного лечения. Однако уровни ММР9-положительных, ММР9-отрицательных и ММР9+/ММР2+/ЕММРIN+ экзосом у пациентов с колоректальными полипами и КРР статистически значимо различались. Таким образом, актуальным является дальнейшее изучение экзосом, экспрессирующих ММР и ЕММРIN, для диагностики КРР.

В настоящее время КРР рассматривается как злокачественное новообразование, в значительной степени связанное с метаболическим синдромом [14]. В нашем исследовании не выявлено связей экспрессий ММР и ЕММРIN в экзосомах с наличием метаболического синдрома, антропометрическими параметрами, уровнями общего ХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, но обнаружены связи с уровнем триглицеридов и глюкозы в сыворотке крови. По-видимому, это связано с монокомпонентностью метаболического синдрома. В настоящее время выделяют 3-, 4- и 5-компонентный метаболический синдром. Обсуждается вопрос о существовании нескольких патогенетических вариантов метаболического синдрома [11]. По нашим дан-

ными, 15 % больных КРР не имеют метаболического синдрома, но страдают от избыточной массы тела или ожирения без каких-либо других метаболических нарушений или в сочетании только с одним измененным метаболическим параметром. Таким образом, около 75 % больных КРР имеют метаболические нарушения.

Заключение

Уровень ММР9-положительных образцов экзосом был значимо выше у больных КРР по сравнению с больными с колоректальными полипами. Доля ММР9-отрицательных образцов латексных частиц, содержащих экзосомы, и образцов с положительной экспрессией ММР9, ММР2 и ЕММРIN, наоборот, была выше у больных с полипами по сравнению с больными КРР. Образцы латексных частиц, содержащих ММР9-положительные экзосомы и отрицательные по ММР2 и ЕММРIN, преобладали как у больных КРР, так и в контрольной группе. Не выявлено значимых различий в экспрессии ММР и ЕММРIN в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы плазмы

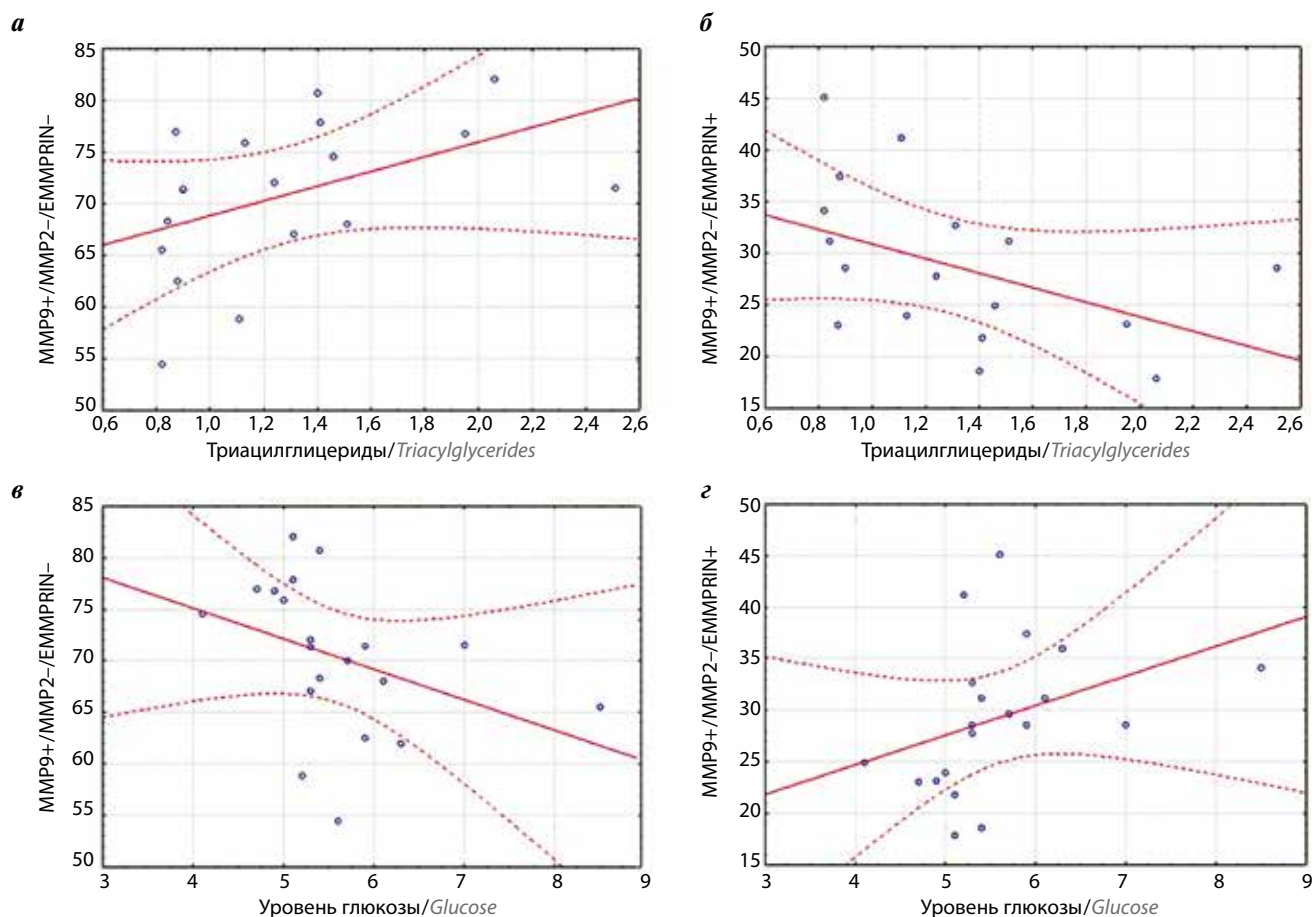


Рис. 4. Графики рассеяния. Зависимость экспрессии образцов латексных частиц, содержащих экзосомы $MMP9+/MMP2-/EMMPRIN-$ и $MMP9+/MMP2-/EMMPRIN+$, от уровней триглицеридов (а, б) и глюкозы плазмы крови (в, г)

Fig. 4. Scatter plots. Dependence of expression of latex particle samples containing $MMP9+/MMP2-/EMMPRIN-$ and $MMP9+/MMP2-/EMMPRIN+$ exosomes on plasma triglyceride (а, б) and glucose (в, г) levels

крови больных КРР, в зависимости от возраста, стадии, степени дифференцировки и локализации опухолевого процесса. Не обнаружено взаимосвязей экспрессии MMP, EMMPRIN в экзосомах и наличия метаболического синдрома, антропометрических параметров, уровней общего ХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП. Выявлены корреляционные связи экзосом плазмы крови $MMP9+/MMP2-/EMMPRIN-$ и $MMP9+/MMP2-/EMMPRIN+$

с уровнями триглицеридов ($r = 0,51$ и $r = -0,56$ соответственно; $p < 0,05$) и глюкозы плазмы крови ($r = -0,60$ и $r = 0,57$ соответственно; $p < 0,05$). Необходимы дальнейшие исследования по изучению характеристик экзосом, ассоциированных с метаболическими нарушениями, и возможности их использования в качестве диагностических, прогностических или предикторных маркеров.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Li W., Li C., Zhou T. et al. Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Mol Cancer* 2017;16(1):145. DOI: 10.1186/s12943-017-0706-8.
- Yunusova N.V., Tamkovich S.N., Stakheeva M.N. et al. The characterization of exosome from blood plasma of patients with colorectal cancer. *AIP Conference Proceedings*; 2016;1760(1). DOI: 10.1063/1.4960289.
- Юнусова Н.В., Тугутова Е.А., Тамкович С.Н., Кондакова И.В. Роль тетраспанинов и протеаз экзосом в опухолевой прогрессии. *Биомедицинская химия* 2018;64(2):123–33. DOI: 10.18097/PBMC20186402123. [Yunusova N.V., Tugutova E.A., Tamkovich S.N., Kondakova I.V. The role of exosomal tetraspanins and proteases in tumor progression. *Biomeditsinskaya khimiya* = *Biomedical Chemistry* 2018;64(2):123–33. (In Russ.)].
- Shimoda M., Khokha R. Metalloproteinases in extracellular vesicles. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017;1864(11PtA):1989–2000. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.027.
- Tamkovich S.N., Yunusova N.V., Tugutova E.A. et al. Protease cargo in circulating exosomes of breast cancer and

- ovarian cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2019;20(1):255–62. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.1.255.
6. Замбалова Е.А., Патышева М.Р., Димча А.А. и др. Экзосомальные протеазы при колоректальном раке. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(4):117–26. DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-117-126. [Zambalova E.A., Patysheva M.R., Dimcha A.A. et al. Exosomal proteases in colorectal cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):117–26. (In Russ.)].
 7. Friedl P., Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3(5):362–74. DOI: 10.1038/nrc1075.
 8. Huang K.J., Sui L.H. The relevance and role of vascular endothelial growth factor C, matrix metalloproteinase-2 and E-cadherin in epithelial ovarian cancer. *Med Oncol* 2011;29(1):318–23. DOI: 10.1007/s12032-010-9817-4.
 9. D'Souza-Schorey C., di Vizio D. Biology and proteomics of extracellular vesicles: harnessing their clinical potential. *Expert Rev Proteomics* 2014;11(3):251–3. DOI: 10.1586/14789450.2014.874290.
 10. Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A. et al. Molecular targets for the therapy of cancer associated with metabolic syndrome (transcription and growth factors). *Asia-Pac J Clin Oncol* 2017;14(3):134–40. DOI: 10.1111/ajco.12780.
 11. Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A. et al. The role of metabolic syndrome variant in the malignant tumors progression. *Diabetes Metab Res Rev* 2018;12:807–12. DOI: 10.1016/j.dsx.2018.04.
 12. Eitan E., Tosti V., Suire C.N. et al. In a randomized trial in prostate cancer patients, dietary protein restriction modifies markers of leptin and insulin signaling in plasma extracellular vesicles. *Aging Cell* 2017;16(6):1430–3. DOI: 10.1111/accel.12657.
 13. Wang J., Wu Y., Guo J. et al. Adipocyte-derived exosomes promote lung cancer metastasis by increasing MMP9 activity via transferring MMP3 to lung cancer cells. *Oncotarget* 2017;8(47):81880–91. DOI: 10.18632/oncotarget.18737.
 14. Esposito K., Chiodini P., Colao A. et al. Metabolic syndrome and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2012;35(11):2402–11. DOI: 10.2337/dc12-0336.

Вклад авторов

Н.В. Юнусова: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 Е.А. Замбалова: выделение экзосом, проточная цитометрия, статистический анализ, написание текста рукописи;
 М.Р. Патышева: проточная цитометрия, обзор публикаций по теме статьи;
 А.А. Димча: сбор клинических данных, анализ метаболических нарушений у больных;
 О.В. Черемисина: формирование клинической группы больных с колоректальными полипами;
 С.Г. Афанасьев: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных;
 И.В. Кондакова: анализ полученных данных.

Authors' contributions

N.V. Yunusova: reviewing of publications on the article's topic, analysis of obtained data, article writing;
 E.A. Zambalova: exosome isolation, flow cytometry, statistical analysis, reviewing of publications on the article's topic, article writing;
 M.R. Patysheva: flow cytometry, reviewing of publications on the article's topic;
 A.A. Dimcha: collecting of clinical data, analysis of metabolic disturbance
 O.V. Cheremisina: formation a group of patients with colorectal polyps;
 S.G. Afanas'ev: study design development, analysis of obtained data;
 I.V. Kondakova: analysis of obtained data.

ORCID авторов/ORCID of authors

Н.В. Юнусова/N.V. Yunusova: <https://orcid.org/0000-0003-4595-4177>
 Е.А. Замбалова/E.A. Zambalova: <https://orcid.org/0000-0003-3698-8455>
 М.Р. Патышева/M.R. Patysheva: <https://orcid.org/0000-0003-2865-7576>
 А.А. Димча/A.A. Dimcha: <https://orcid.org/0000-0002-9551-1908>
 О.В. Черемисина/O.V. Cheremisima: <https://orcid.org/0000-0000-7234-4708>
 С.Г. Афанасьев/S.G. Afanas'ev: <https://orcid.org/0000-0002-4701-0375>
 И.В. Кондакова/I.V. Kondakova: <https://orcid.org/0000-0003-0907-4615>

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 фонда фундаментальных исследований и Администрации Томской области в рамках научного проекта № 18-415-703006.

Financing. The reported research was funded by Russian Foundation for Basic Research and the government of the Tomsk region of the Russian Federation, grant № 18-415-703006.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

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

Статья поступила: 02.07.2019. **Принята к публикации:** 17.09.2019.

Article received: 02.07.2019. **Accepted for publication:** 17.09.2019.

Прогностическая значимость экспрессии PD-L1 и оценка статуса микросателлитной нестабильности у пациентов с забрюшинными неорганными лейомиосаркомами

В.Е. Бугаев¹, М.П. Никулин¹, Н.И. Поспехова¹, В.М. Сафронова¹, Н.В. Кокосадзе¹,
Я.А. Божченко¹, С.Н. Неред¹, Л.Н. Любченко^{1,2}, И.С. Стилиди¹

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

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Владислав Евгеньевич Бугаев vladbugaev@mail.ru

Введение. Лейомиосаркома является одной из самых распространенных злокачественных опухолей мягких тканей. Радикальное хирургическое лечение с последующей адъювантной терапией остается наиболее эффективным методом. Иммуноterapia – перспективный метод противоопухолевого лечения, основанного на использовании антител, блокирующих лиганд PD-L1 (programmed death ligand 1) или рецептор PD-1 (programmed death 1). Уровень экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и наличие микросателлитной нестабильности (MSI) могут рассматриваться как прогностический и предиктивный маркер течения заболевания и эффективности иммунотерапевтического лечения.

Цель исследования – определить уровень экспрессии PD-L1 и статус MSI у пациентов с забрюшинными неорганными лейомиосаркомами и оценить их влияние на общую и безрецидивную выживаемость.

Материалы и методы. В исследование были включены 57 пациентов с забрюшинными неорганными лейомиосаркомами, которым выполнялось хирургическое или комбинированное лечение. Проведен анализ клинических и морфологических показателей, изучены результаты хирургического лечения. Оценка экспрессии PD-L1 и MSI проводилась с использованием иммуногистохимического и молекулярно-генетического анализа.

Результаты. У 41 из 57 проанализированных пациентов была проведена оценка экспрессии PD-L1. В 10 (24 %) из 41 случая выявлена положительная экспрессия (уровень экспрессии составил 3–50 %). У 1 (2,4 %) пациента первичная опухоль и метастатический очаг имели низкий уровень MSI (MSI-low, MSI-L). Медиана наблюдения за больными составила 31 мес. У пациентов с положительной экспрессией PD-L1 по сравнению с больными с PD-L1-отрицательными опухолями выявлен более высокий индекс пролиферативной активности Ki-67 (58,8 и 47,8 % соответственно; $p = 0,02$), а также достоверно низкая медиана общей выживаемости при опухолях II степени злокачественности (30 и 105 мес; $p = 0,043$). При лейомиосаркомах III степени злокачественности отмечен тренд к снижению медианы общей выживаемости у больных с PD-L1-отрицательными опухолями (31,0 мес) по сравнению с пациентами с наличием экспрессии PD-L1 (61,2 мес) ($p = 0,11$).

Заключение. Частота экспрессии PD-L1 среди больных забрюшинными лейомиосаркомами в нашем наблюдении составила 24 % (10/41), статус MSI-L определен в 2,4 % (1/41) случаев. У больных с опухолью II степени злокачественности наличие экспрессии PD-L1 связано с достоверным снижением общей выживаемости. PD-L1 у больных забрюшинными лейомиосаркомами следует рассматривать как прогностический маркер и потенциальную терапевтическую мишень.

Ключевые слова: лейомиосаркома, экспрессия PD-L1, микросателлитная нестабильность

Для цитирования: Бугаев В.Е., Никулин М.П., Поспехова Н.И. и др. Прогностическая значимость экспрессии PD-L1 и оценка статуса микросателлитной нестабильности у пациентов с забрюшинными неорганными лейомиосаркомами. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(3):37–48.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-3-37-48

Prognostic significance of PD-L1 expression and evaluation of microsatellite instability status in patients with retroperitoneal leiomyosarcomas

V.E. Bugaev¹, M.P. Nikulin¹, N.I. Pospekhova¹, V.M. Safronova¹, N.V. Kokosadze¹,
Ya.A. Bozhchenko¹, S.N. Nered¹, L.N. Lyubchenko^{1,2}, I.S. Stilidi¹

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

²Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

Background. Leiomyosarcoma is one of the most common types of soft tissue sarcomas. Radical surgical resection with subsequent adjuvant chemotherapy remain the most effective treatment approach. Immunotherapy based on inhibition of PD-L1 (programmed death ligand 1) or its receptor PD1 (programmed death 1) is considered a promising treatment option. Level of PD-L1 expression in tumor cells and presence of microsatellite instability (MSI) could be considered prognostic and predictive markers of disease progression and effectiveness of immunotherapy.

The study objective is to determine PD-L1 expression level and MSI status in patients with retroperitoneal leiomyosarcomas and evaluate their effect on overall and recurrence-free survival.

Materials and methods. The study included 57 patients with retroperitoneal leiomyosarcomas who underwent surgical or combination treatment. Analysis of clinical and morphological characteristics was performed; results of surgical treatment were researched. Evaluation of PD-L1 expression and MSI status was performed using immunohistochemical and molecular genetic analysis.

Results. PD-L1 expression and MSI status were evaluated in 41 patients of 57. In 10 (24 %) of 41 cases, positive PD-L1 expression was observed (expression level 3–50 %). In 1 (2.4 %) patient, the primary tumor and metastatic lesion had low MSI level (MSI-low, MSI-L). Median follow-up was 31 months. In patients with positive PD-L1 expression, higher Ki-67 proliferative index was observed compared to patients with PD-L1 negative tumors (58.8 and 47.8 % respectively; $p = 0.02$), as well as significantly lower median overall survival for grade II tumors (30 and 105 months; $p = 0.043$). In grade III leiomyosarcomas, a trend towards lower median overall survival in patients with PD-L1-negative tumors (31.0 months) compared to patients with PD-L1 expression (61.2 months) ($p = 0.11$) was observed.

Conclusion. Among patients with retroperitoneal leiomyosarcomas, positive expression of PD-L1 was observed in 24 % (10/41) of cases and MSI-low status was found in 2.4 % (1/41) of cases. In patients with grade 2 tumors, positive PD-L1 expression is associated with significantly lower overall survival. PD-L1 expression in patients with retroperitoneal leiomyosarcomas could be considered a prognostic marker and a potential therapeutic target.

Key words: leiomyosarcoma, PD-L1 expression, microsatellite instability

For citation: Bugaev V.E., Nikulin M.P., Pospekhova N.I. Prognostic significance of PD-L1 expression and evaluation of MSI-status in patients with retroperitoneal leiomyosarcomas. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(3):37–48.

Введение

Лейомиосаркомы — группа опухолей мезенхимального происхождения с гладкомышечной дифференцировкой, которые составляют почти 25 % общего числа мягкотканых сарком [1]. На протяжении нескольких десятилетий основу лекарственного лечения мягкотканых сарком составляет доксорубицин в возможной комбинации с ифосфамидом. Однако, несмотря на внедрение комбинированных методов терапии в клиническую практику, результаты лечения остаются неудовлетворительными — медиана выживаемости больных местно-распространенной и метастатической лейомиосаркомой не превышает 12 мес [2]. В это же время в лекарственном лечении солидных опухолей большой успех связан с внедрением в клиническую практику иммунотерапии [3], которая принята к использованию при опухолях различной локализации. Ингибиторы PD-1 (programmed death 1) и PD-L1 (programmed death ligand 1) предотвращают инактивацию Т-лимфоцитов, тем самым потенцируя противоопухолевый иммунный ответ [4].

Важным вопросом остается поиск биомаркеров, позволяющих спрогнозировать ответ на проведение иммунотерапии. Результаты ряда исследований показали, что наличие положительной экспрессии PD-L1 связано с ослаблением противоопухолевого иммунитета, а значит с худшим прогнозом [5]. При различных солидных опухолях, таких как меланома, немелкоклеточный рак легкого, почечно-клеточный рак, проведение анти-PD-1- и анти-PD-L1-терапии позволило значительно улучшить результаты лечения [6]. Результаты некоторых исследований показали возможность использования экспрессии PD-L1 как предиктивного маркера эффективности лечения [6, 7].

Данные по частоте экспрессии PD-L1 и ее прогностической значимости в мягкотканых саркомах немногочисленны, к тому же в исследования по этому

вопросу были включены лишь единичные пациенты с лейомиосаркомой [8].

В настоящее время также известно, что микросателлитная нестабильность (microsatellite instability, MSI) — независимый прогностический фактор, определяющий степень злокачественности новообразований различной локализации. Изучение применения ингибиторов PD-1 у больных колоректальным раком показало, что наличие высокого уровня MSI (MSI-high, MSI-H) ассоциировано с высоким уровнем экспрессии PD-1/PD-L1, а также с продолжительным ответом на анти-PD-1-терапию [9]. Схожие результаты лечения были получены и при опухолях других локализаций [9, 10]. Это позволило рассматривать MSI-H-фенотип как универсальный биомаркер, предсказывающий потенциальный клинический эффект вне зависимости от гистологической структуры опухоли [10–12].

Частота микросателлитно-нестабильных опухолей среди лейомиосарком и прогностическое значение статуса MSI также остаются практически неизученными, что определяет актуальность исследования.

Цель исследования — определить частоту экспрессии PD-L1 и статус MSI у больных забрюшинными неорганными лейомиосаркомами и оценить их влияние на общую и безрецидивную выживаемость.

Материалы и методы

Нами был проведен ретроспективный анализ результатов лечения пациентов с забрюшинными неорганными лейомиосаркомами, которым выполнялось хирургическое или комбинированное лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в период с 2003 по 2018 г. Проведен анализ клинических показателей, морфологического исследования опухолей, изучены результаты хирургического лечения. Выполнена оценка экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках и/или иммунных клетках опухолевого микроокружения с помощью иммуногистохимического анализа.

Иммуногистохимический анализ проводили на парафиновых срезах опухолевой ткани на автоматическом иммуногистостейнере BenchMark GX Ventana (Roche) с использованием антител Anti-PD-L1 (28–8) ab205921 в разведении 1:300. Положительной считалась экспрессия PD-L1 в более чем 1 % опухолевых и/или иммунных клеток. MSI определяли в образцах ДНК, выделенных из опухолевой ткани, полученных со срезов парафиновых блоков под контролем патоморфолога, методом полимеразной цепной реакции с использованием панели из 5 мононуклеотидных маркеров (BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27), ассоциированных со структурно-функциональными нарушениями системы репарации неспаренных оснований ДНК, с последующим проведением фрагментного анализа на платформе Beckman Coulter GenomeLab GeXP.

На основании полученных данных опухоль классифицировали по 3 фенотипам. При отсутствии нестабильности по всем маркерам опухоль относили к микросателлитно-стабильному фенотипу (microsatellite stable, MSS). Проявление нестабильности по одному из маркеров рассматривали как опухолевый фенотип с низким уровнем MSI (MSI-low, MSI-L). Наличие нестабильности по 2 и более из исследуемых маркеров оценивали как высокогенетически нестабильный фенотип опухоли (MSI-H).

Статистический анализ проводили с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics

(выпуск 22.0) (IBM, США). При анализе отдаленных результатов безрецидивной выживаемостью считали период от оперативного вмешательства до появления признаков рецидива опухоли, последнего наблюдения или смерти по причине, не связанной с основным заболеванием; общей выживаемостью – период от оперативного вмешательства до смерти по любой причине. Анализ выживаемости выполняли по методу Каплана–Майера с использованием *log-rank*-теста. Статистически значимым считали результат при $p < 0,05$.

Результаты

В исследование были включены 57 пациентов: 46 (81 %) женщин, 11 (19 %) мужчин. Медиана возраста составила 54 года (22–86 лет). Распределение больных по степени злокачественности опухоли было следующим: G_1 – 2 (3,5 %), G_2 – 23 (40,4 %), G_3 – 32 (56,1 %). Хирургическое вмешательство выполняли в объеме удаления первичной опухоли у 40 (70,2 %) больных, рецидивной опухоли – у 15 (26,3 %), метастатических очагов – у 2 (3,5 %).

Экспрессия PD-L1. Оценка экспрессии PD-L1 выполнена у 41 пациента. Микроскопическая картина при оценке степени экспрессии PD-L1 представлена на рис. 1. На основании PD-L1-статуса больные были разделены на 2 группы: с отрицательной (PD-L1 < 1 % клеток) и положительной (PD-L1 \geq 1 % клеток)

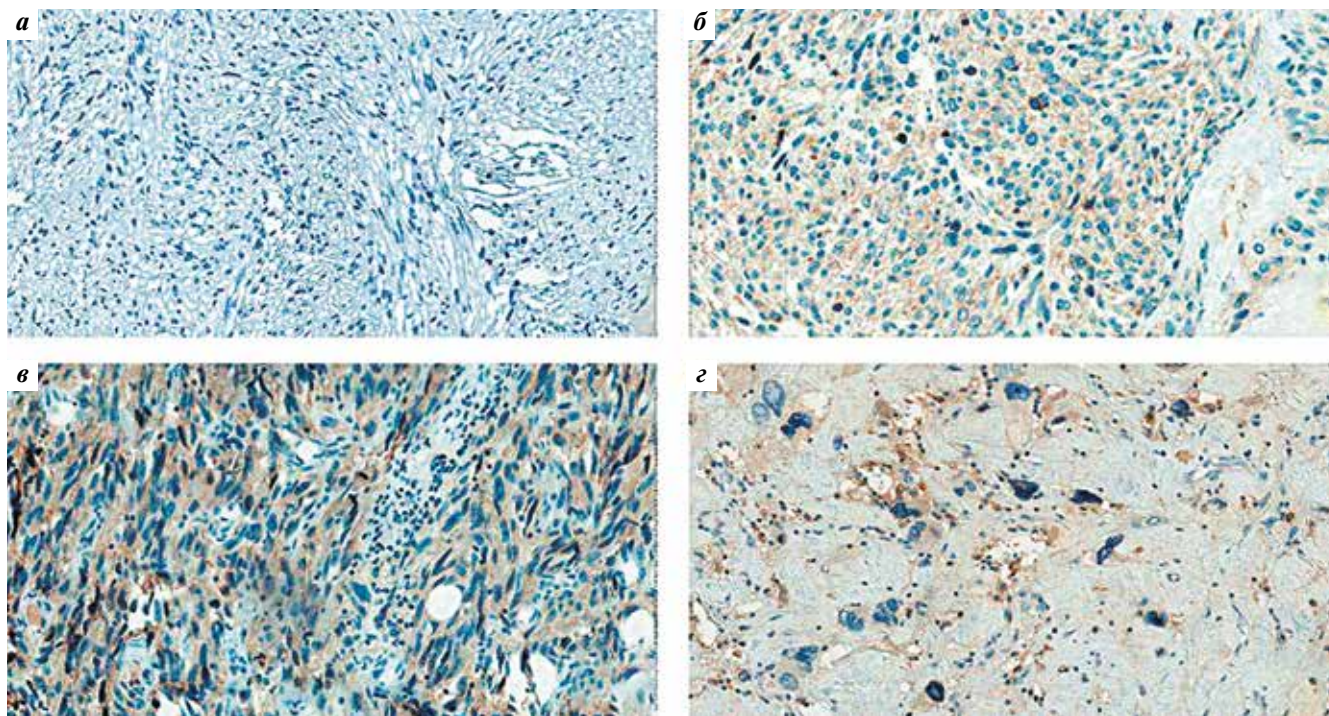


Рис. 1. Микроскопическая картина при оценке степени экспрессии PD-L1: а – экспрессия PD-L1 в клетках опухоли и иммунных клетках 0 %; б – экспрессия PD-L1 в клетках опухоли 15 %; интенсивность окраски 0–1; иммунные клетки до 3 %; в – экспрессия PD-L1 в клетках опухоли 30 %; интенсивность окраски 1+; иммунные клетки 0 %; г – экспрессия PD-L1 в клетках опухоли 50 %; интенсивность окраски 1+; иммунные клетки примерно 1 %

Fig. 1. Microscopic image during evaluation of PD-L1 expression level: а – PD-L1 expression in tumor and immune cells is 0 %; б – PD-L1 expression in tumor cells is 15 %; staining intensity is 0–1; immune cells are up to 3 %; в – PD-L1 expression in tumor cells is 30 %; staining intensity is 1+; immune cells are 0 %; г – PD-L1 expression in tumor cells is 50 %; staining intensity is 1+; immune cells are approximately 1 %

экспрессией PD-L1 для оценки ее клинической значимости. Клинико-морфологические характеристики проанализированных пациентов суммированы в табл. 1. У 10 (24 %) из 41 обследованного пациента определен PD-L1-положительный статус (3–50 % клеток). В 7 случаях экспрессия определялась в 3–15 % клеток, в 2 случаях – в 30 % и в 1 случае – в 50 %.

Пациенты были сопоставимы по клинико-морфологическим характеристикам за исключением индекса

Таблица 1. Клинико-морфологические характеристики исследуемой когорты больных

Table 1. Clinical and morphological characteristics of the studied patient cohort

Характеристика Characteristic	PD-L1 <1 % (n = 31)	PD-L1 ≥1 % (n = 10)	p
Медиана возраста, лет Median age, years	54	61	0,57
Пол, n (%): Gender, n (%):			
мужской male	6 (20)	3 (30)	0,66
женский female	25 (80)	7 (70)	0,52
Степень злокачественности опухоли (grade), n (%): Malignancy grade, n (%):			
G ₁	2 (6)	0	0,71
G ₂	12 (39)	4 (40)	0,43
G ₃	17 (55)	6 (60)	0,65
Индекс пролиферации Ki-67 (медиана), % Ki-67 proliferation index (median), %	47,8	58,8	0,02

пролиферации Ki-67, который был достоверно выше у больных с положительной экспрессией PD-L1. Медиана наблюдения за больными составила 31 мес. В общей когорте больных после хирургического лечения независимо от степени злокачественности опухоли и типа оперативного вмешательства медиана безрецидивной выживаемости у больных с PD-L1-отрицательными опухолями составила 18 мес против 19 мес для PD-L1-положительных опухолей ($p = 0,802$) (рис. 2а), медиана общей выживаемости – 78 и 60 мес для пациентов с PD-L1-отрицательными и PD-L1-положительными опухолями соответственно ($p = 0,62$) (рис. 2б).

Медиана безрецидивной выживаемости среди больных с опухолями II степени злокачественности при отсутствии или наличии экспрессии PD-L1 составила 27,6 и 17,5 мес соответственно, однако различия не были статистически значимыми ($p = 0,88$). Медиана общей выживаемости среди больных с положительной экспрессией PD-L1 была достоверно ниже и составила 30 мес по сравнению со 105 мес среди пациентов, у которых экспрессия PD-L1 отсутствовала ($p = 0,043$) (табл. 2, рис. 3).

У пациентов с опухолью III степени злокачественности медиана безрецидивной выживаемости составила 15,8 мес при отсутствии экспрессии PD-L1 и 19,5 мес при положительном PD-L1-статусе ($p = 0,47$). Медиана общей выживаемости – 31 и 61,2 мес соответственно ($p = 0,11$) (см. табл. 2, рис. 4).

Статус MSI. Оценка статуса MSI проведена у 41 больного. В большинстве случаев (97,6 % (40/41)) лейомиосаркомы были представлены опухолями со стабильной системой репарации (MSS) (рис. 5а). В 1 (2,4 %) случае из 41 первичная опухоль и метастатический очаг были нестабильными по маркеру NR21, что позволило определить их статус MSI как низкий

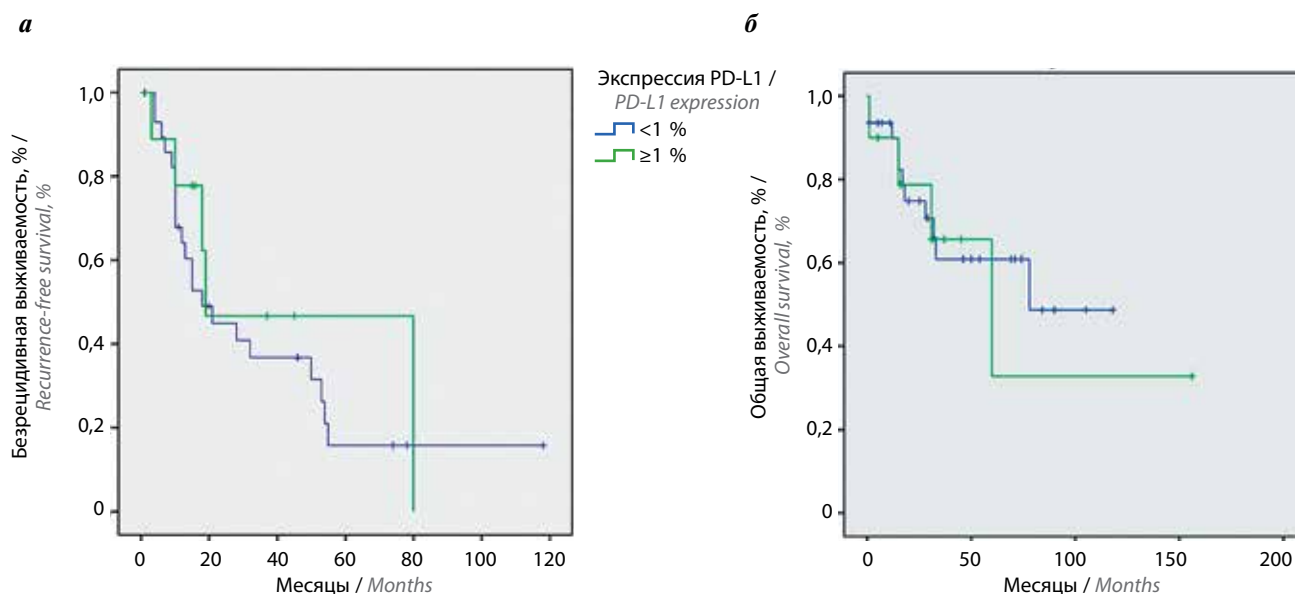


Рис. 2. Безрецидивная (а) и общая (б) выживаемость больных после хирургического лечения в зависимости от экспрессии PD-L1
Fig. 2. Recurrence-free (a) and overall (b) survival of patients after surgical treatment depending in PD-L1 expression

Таблица 2. Показатели общей и безрецидивной выживаемости у больных лейомиосаркомой II и III степени злокачественности в зависимости от наличия экспрессии PD-L1

Table 2. Overall and recurrence-free survival in patients with grade II and III leiomyosarcomas depending on the presence of PD-L1 expression

Степень злокачественности опухоли (grade) Malignancy grade	Экспрессия PD-L1, % PD-L1 expression, %	n	Медиана безрецидивной выживаемости, мес Median recurrence-free survival, months	p	Медиана общей выживаемости, мес Median overall survival, months	p
G ₁	<1	2	115,0			
G ₂	<1	12	27,6	0,88	105	0,043
	≥1	4	17,5		30	
G ₃	<1	17	15,8	0,47	31	0,11
	≥1	6	19,5		61,2	
Всего Total	<1	31	18,0	0,802	78	0,62
	≥1	10	19,0		60	

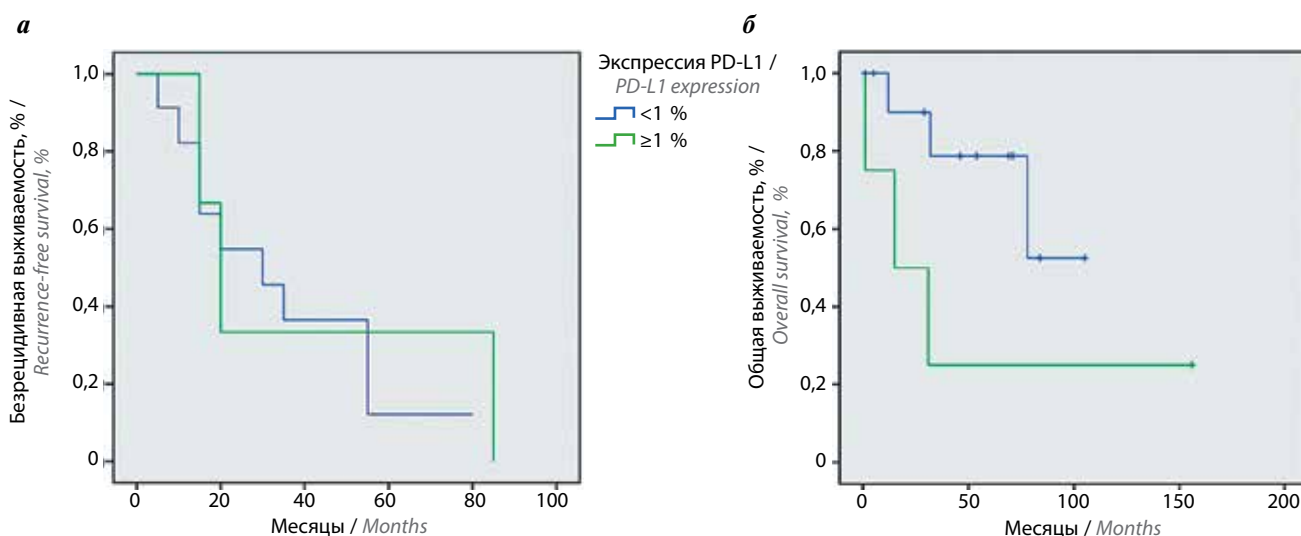


Рис. 3. Безрецидивная (а) и общая (б) выживаемость больных с опухолями II степени злокачественности в зависимости от наличия экспрессии PD-L1

Fig. 3. Recurrence-free (a) and overall (b) survival of patients with grade II tumors depending on the presence of PD-L1 expression

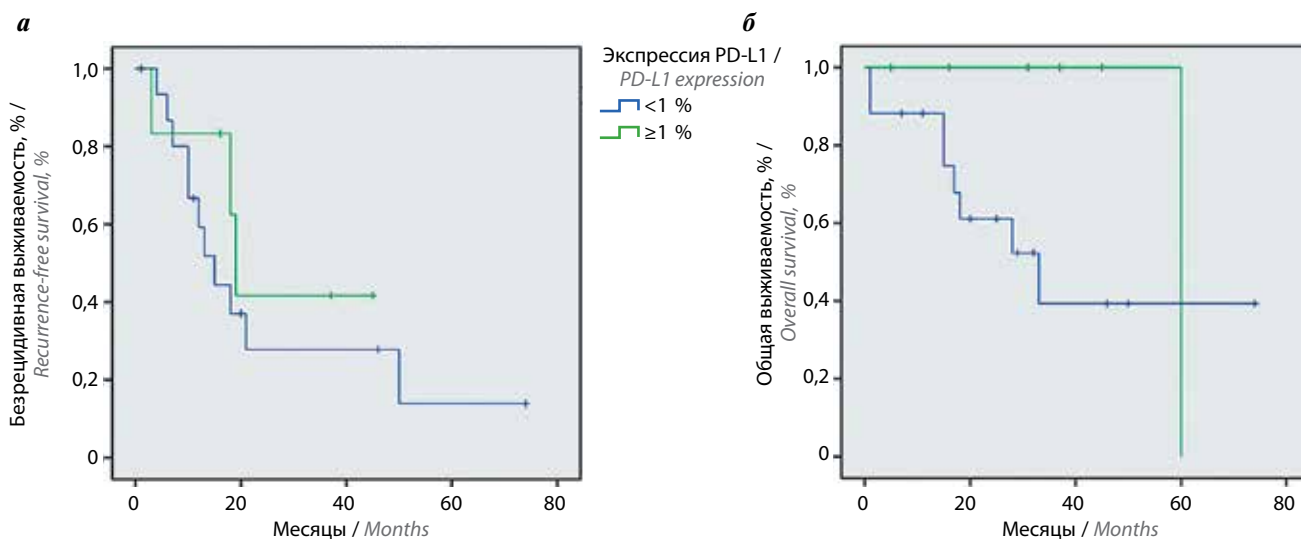


Рис. 4. Безрецидивная (а) и общая (б) выживаемость больных с опухолями III степени злокачественности в зависимости от наличия экспрессии PD-L1

Fig. 4. Recurrence-free (a) and overall (b) survival of patients with grade III tumors depending on the presence of PD-L1 expression

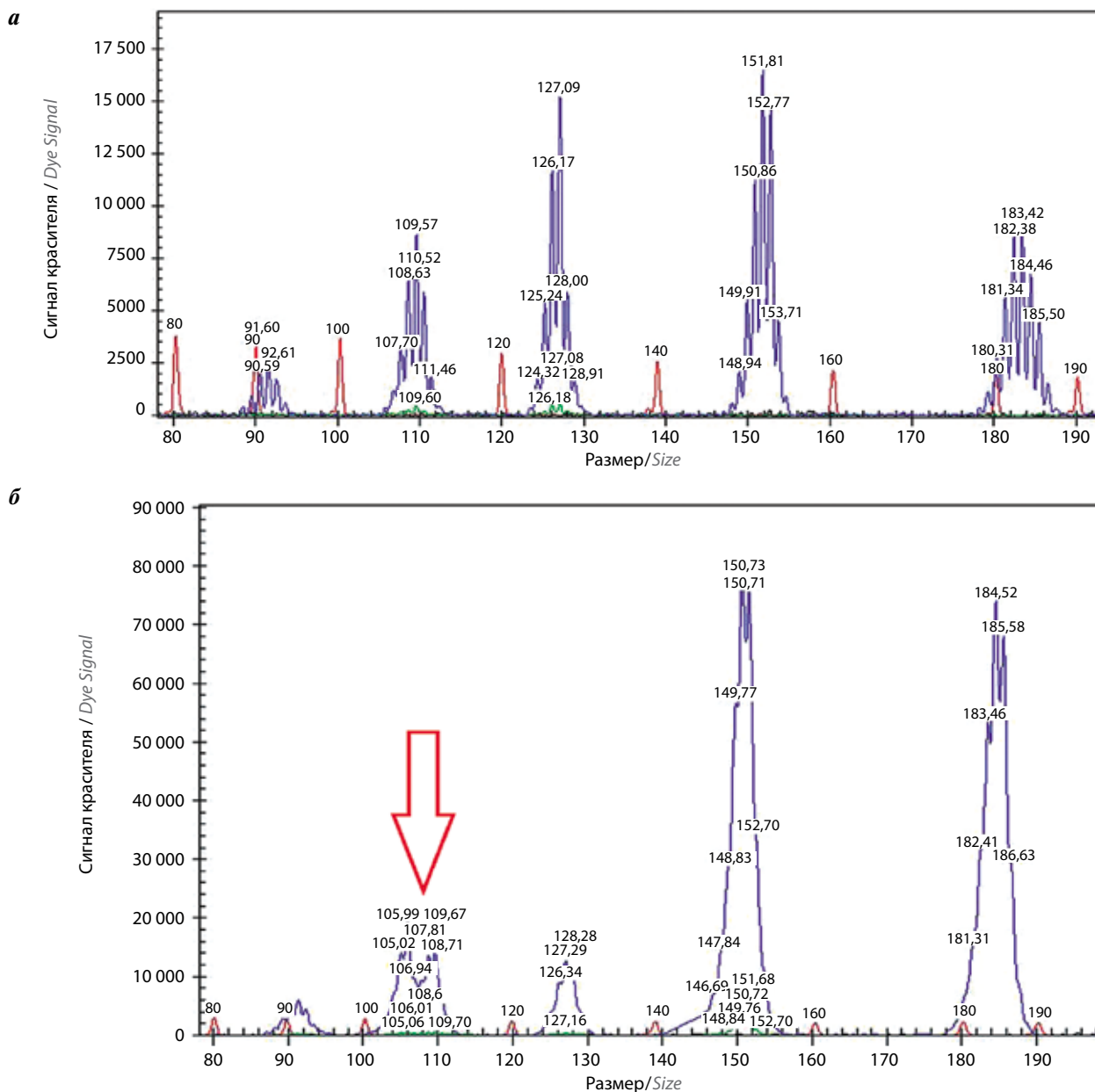


Рис. 5. Результаты фрагментного анализа с использованием маркеров NR27, NR21, NR24, BAT25, BAT26: а – пример микросателлитно-стабильной опухоли (MSS); б – пример опухоли с микросателлитной нестабильностью низкого уровня (MSI-L). Маркер NR21 имеет 2 фрагмента разной длины

Fig. 5. Results of fragment analysis using NR27, NR21, NR24, BAT25, BAT26 markers: а – example of microsatellite stable tumor (MSS); б – example of a tumor with low microsatellite instability (MSI-L). NR21 marker has 2 fragments of different lengths

(MSI-L) (рис. 5б). При этом у данной пациентки отмечен различный уровень содержания клеток, экспрессирующих PD-L1 в первичной опухоли (0 %) и метастатическом очаге (15 %). Изначально данная пациентка была прооперирована по поводу лейомиосаркомы G₃ размером 25 см; адъювантная терапия не проводилась. Безрецидивный период составил 19 мес, после чего было отмечено прогрессирование в виде появления 2 метастатических очагов в печени, неоднократно подвергнутых сеансам радиочастотной абляции. Через 38 мес после первичной операции пациентка была прооперирована по поводу метастатического очага

в подкожной жировой клетчатке, на материале которого и было проведено иммуногистохимическое и молекулярно-генетические исследования. Через 60 мес пациентка скончалась от прогрессирования заболевания.

Общая и безрецидивная выживаемость после удаления первичной опухоли. Вне зависимости от PD-L1-статуса и степени злокачественности опухоли, медиана общей выживаемости в группе больных, прооперированных по поводу первичной опухоли, составила 101 мес по сравнению с 22 мес в группе больных, прооперированных по поводу рецидивной опухоли ($p = 0,094$) (табл. 3,

Таблица 3. Медиана общей выживаемости у больных лейомиосаркомой различной степени злокачественности в зависимости от характера удаляемой опухоли

Table 3. Median overall survival in patients with leiomyosarcoma of various grades depending on the type of resected tumor

Степень злокачественности опухоли (grade) Malignancy grade	Тип опухоли Tumor type	Медиана общей выживаемости, мес Median overall survival, months	<i>p</i>
G ₁	Первичная Primary	115	0,88
G ₂	Первичная Primary	83,5	
	Рецидив Recurrent	76,9	
G ₃	Первичная Primary	100,4	<0,001
	Рецидив Recurrent	16,3	
Всего Total	Первичная Primary	101	0,09
	Рецидив Recurrent	22	

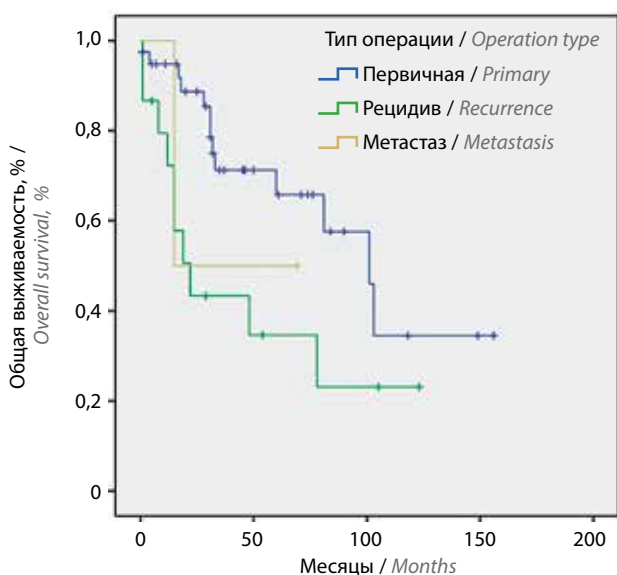


Рис. 6. Общая выживаемость в зависимости от характера удаляемой опухоли (первичная/рецидивная/метастатическая)

Fig. 6. Overall survival depending in the type of resected tumor (primary/recurrent/metastatic)

рис. 6). В основном эти различия были обусловлены статистически достоверной разницей в общей выживаемости в подгруппе больных с низкодифференцированными опухолями G₃ ($p < 0,001$). Среди пациентов с опухолью II степени злокачественности медиана общей выживаемости после операции по поводу

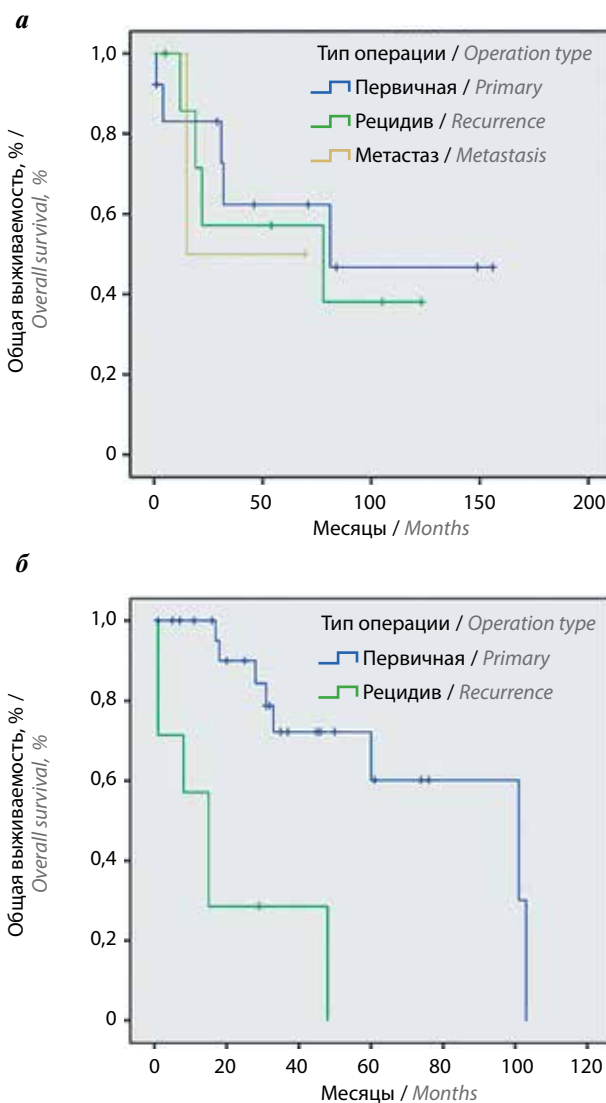


Рис. 7. Общая выживаемость в зависимости от характера удаляемой опухоли у больных лейомиосаркомой II (а) и III (б) степеней злокачественности

Fig. 7. Overall survival depending on the type of resected tumor in patients with grade II (a) and III (b) leiomyosarcomas

первичной или рецидивной опухоли составила 83,5 и 76,8 мес соответственно ($p = 0,879$) (рис. 7). Двое больных были прооперированы по поводу метастазов лейомиосаркомы.

Вне зависимости от степени злокачественности опухоли, медиана безрецидивной выживаемости после первичной операции при положительной экспрессии PD-L1 составила 19,6 мес по сравнению с 29,9 мес у пациентов с отсутствием экспрессии PD-L1 (рис. 8), однако различия не были статистически значимы ($p = 0,796$).

Медиана общей выживаемости не зависела достоверно от наличия экспрессии PD-L1 у больных с опухолью II и III степеней злокачественности: при опухолях G₂ — 80,0 и 32,5 мес при отсутствии или наличии экспрессии PD-L1 ($p = 0,103$), при опухолях G₃ — 70 и 61,2 мес соответственно ($p = 0,311$) (табл. 4, рис. 9).

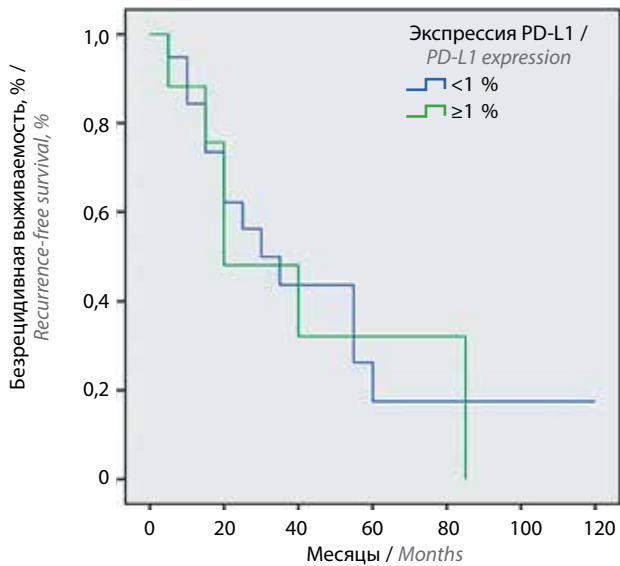


Рис. 8. Безрецидивная выживаемость после операции по поводу первичной опухоли в зависимости от наличия экспрессии PD-L1
Fig. 8. Recurrence-free survival after surgery for primary tumor depending on the presence of PD-L1 expression

Таблица 4. Медиана общей выживаемости после первичной операции в зависимости от степени злокачественности опухоли и наличия экспрессии PD-L1

Table 4. Median overall survival after primary surgery depending on the tumor grade and presence of PD-L1 expression

Степень злокачественности опухоли (grade) Malignancy grade	Экспрессия PD-L1, % PD-L1 expression, %	Медиана общей выживаемости, мес Median overall survival, months	<i>p</i>
G ₂	<1	80,0	0,103
	≥1	32,5	
G ₃	<1	70,0	0,311
	≥1	61,2	

Обсуждение

PD-1 и его лиганд PD-L1 играют важную роль в антиген-специфическом Т-клеточном ответе, опосредующем противоопухолевый иммунный ответ. В последнее время у больных с опухолями различной локализации активно изучается экспрессия этих белков. Крайне актуальным остается определение их прогностической значимости в определении прогноза заболевания и возможного ответа на терапию ингибиторами контрольных точек [9, 13].

В целом полученные нами данные по частоте экспрессии PD-L1 сопоставимы с описанными в литературе. По данным М. Kostine и соавт., изучивших 106 образцов лейомиосарком, в том числе лейомиом, частота экспрессии PD-L1 в лейомиосаркомах составляет 30 % [14]. Обращало на себя внимание, что в основном это

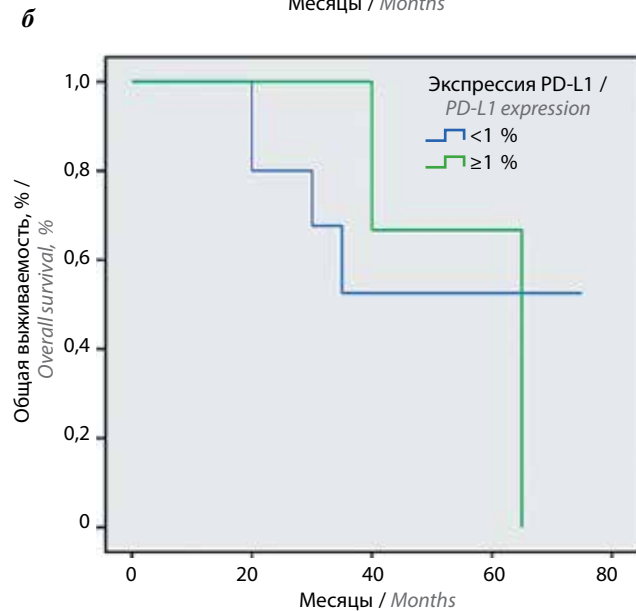
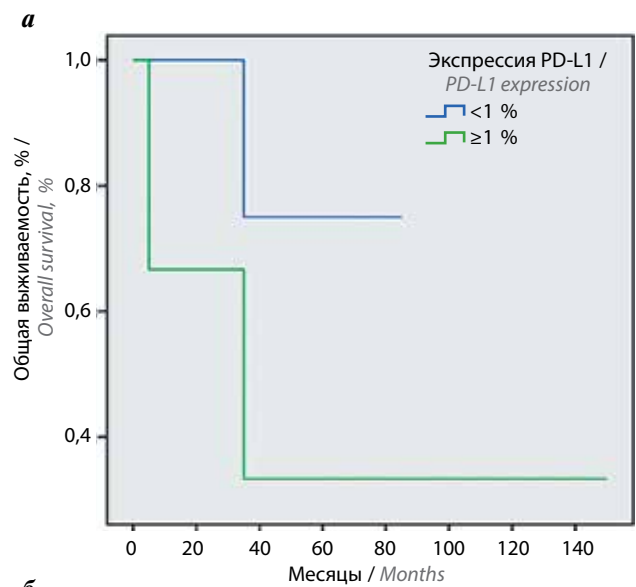


Рис. 9. Общая выживаемость после операции по поводу первичной опухоли в зависимости от степени злокачественности опухоли и наличия экспрессии PD-L1: а – II степень злокачественности; б – III степень злокачественности

Fig. 9. Overall survival after surgery for primary tumor depending on the tumor grade and presence of PD-L1 expression: a – grade II; б – grade III

были опухоли II и III степени злокачественности, в то время как из всех PD-L1-положительных опухолей только в 1 случае была опухоль I степени злокачественности ($p = 0,005$). Тем не менее значимого влияния на показатели выживаемости в этом исследовании не выявлено, в то время как при эпителиальных опухолях обнаружена достоверная связь положительной экспрессии PD-L1 с плохим прогнозом выживаемости [6]. S. Paydas и соавт. проводили исследование по оценке экспрессии PD-1 и PD-L1 среди 65 больных с различными вариантами мягкотканых сарком, в том числе у 9 больных лейомиосаркомой различной локализации [8]. Только у 1 больного была выявлена

положительная экспрессия PD-L1 (≥ 1 % клеток) в опухоли и опухолевом микроокружении. Суммарно среди пациентов с мягкоткаными саркомами частота экспрессии PD-1 в опухоли и опухолевом микроокружении составляла 17 и 12 % соответственно, а PD-L1 – 29 и 30 % соответственно. Детальное распределение представлено в табл. 5.

Таблица 5. Частота экспрессии PD-1 и PD-L1 в мягкотканых саркомах (по данным S. Paydas и соавт.)

Table 5. PD-1 and PD-L1 expression frequency in soft-tissue sarcomas (per S. Paydas et al.)

Гистологический вариант опухоли Histological type of tumor	n	Положительная экспрессия PD-L1, n (%) Positive PD-L1 expression, n (%)	
		в опухоли in tumor	в микроокружении in microenvironment
Липосаркома Liposarcoma	6	1 (16,7)	2 (33,3)
Лейомиосаркома Leiomyosarcoma	9	1 (11,1)	1 (11,1)
Остеосаркома Osteosarcoma	10	3 (30,0)	0
Саркома Юинга Ewing sarcoma	8	1 (12,5)	1 (12,5)
Злокачественная шваннома Malignant schwannoma	4	1 (25,0)	2 (50,0)
Саркома Капоши Kaposi's sarcoma	5	4 (80,0)	4 (80,0)
Синовиальная саркома Synovial sarcoma	4	1 (25,0)	0
Плеоморфная саркома Pleomorphic sarcoma	6	3 (50,0)	3 (50,0)
Фибросаркома Fibrosarcoma	3	1 (33,3)	3 (100)
Другие виды сарком Other sarcomas	11	4	5

Полученная нами тенденция к снижению общей выживаемости у больных с наличием экспрессии PD-L1 (в первую очередь при анализе данных больных после операций по поводу первичной опухоли), а также статистически значимая разница в общей выживаемости у больных лейомиосаркомой II степени злокачественности в целом соответствуют гипотезе исследования. Однако полученные данные о противоположном, пусть

и недостоверном влиянии экспрессии PD-L1 на выживаемость больных лейомиосаркомой III степени злокачественности не совсем ясны. Возможно, при увеличении степени злокачественности, когда молекулярно-генетические нарушения в опухоли лавинообразно нарастают, изменения в экспрессии PD-L1 перестают быть единственными, влияющими на прогноз. Другим объяснением может быть то, что в нашей работе мы не исследовали влияние на прогноз таких важных факторов, как полихимиотерапия и ее варианты.

В нашем исследовании лишь у 1 (2,4 %) из 41 больного был выявлен статус MSI-L, причем и в первичной опухоли, и в метастатическом очаге. Опухолей с MSI-H в нашей выборке больных не обнаружено.

Данные литературы на этот счет противоречивы. Считается, что наличие MSI – редкое явление среди мягкотканых сарком. К. Kawaguchi и соавт. провели анализ опухолевой ткани у 40 больных мягкоткаными саркомами и в 10 (25 %) случаях выявили MSI (2 больных с MSI-H и 8 больных с MSI-L) [15]. Согласно другим данным статус MSI-H не был определен ни у одного пациента с мягкотканой саркомой (0 случаев из 71) [16]. Сводные данные литературы представлены в табл. 6.

Прогностическая значимость статуса MSI у больных мягкоткаными саркомами остается спорной. Наиболее изучено влияние статуса MSI на прогноз заболевания у больных раком толстой кишки. Опухоли толстой кишки с MSI-H не склонны к метастазированию и имеют благоприятный прогноз, что было подтверждено результатом метаанализа 32 исследований [17]. В нашем исследовании у 1 пациентки с MSI-L (по маркеру NR21) прогрессирование заболевания было отмечено через 19 мес после удаления первичной опухоли, летальный исход – через 60 мес. Таким образом, наше исследование оставляет открытым вопрос о прогностической значимости статуса MSI у больных лейомиосаркомой.

В настоящее время проводятся исследования по оценке возможности применения иммунотерапии у больных лейомиосаркомой. Согласно предварительным результатам исследования II фазы ALLIANCE, в котором больные метастатической или нерезектабельной саркомой мягких тканей во 2-й линии терапии получали комбинацию ниволумаба и ипилимумаба в дозе 1 мг/кг, частота объективных ответов составила 16 % при приемлемом профиле токсичности [18]. В 1-й же линии терапии изучается добавление пембролизумаба к доксорубину, однако исследование пока проводится в I/II фазе (NCT02888665). В уже опубликованном исследовании SARC028, в которое наряду с другими саркомами были включены 10 больных лейомиосаркомой после 1-й линии терапии, назначался пембролизумаб до прогрессирования [19]. Среди больных лейомиосаркомой ни в одном случае не было отмечено клинического ответа, однако и ни у одного больного не было положительной экспрессии PD-L1.

Таблица 6. Оценка статуса MSI среди больных мягкоткаными саркомами

Table 6. Evaluation of MSI status among patient with soft-tissue sarcomas

Автор Author	Число больных, n Number of patients, n	Метод исследования Study method	Результат Result
R. Wooster и соавт. [20] R. Wooster et al. [20]	18	ПЦР (ди-, три- и тетра-нуклеотидные маркеры) PCR (di-, tri- and tetranucleotide markers)	11 % (2/18) – MSI-H и MSI-L 11 % (2/18) – MSI-H and MSI-L
T. Saito и соавт. [21] T. Saito et al. [21]	8	ИГХ (экспрессия MSH2 и MLH1) IHC (MSH2 and MLH1 expression)	25 % (2/8) – MSI-H и MSI-L 25 % (2/8) – MSI-H and MSI-L
K. Ericson и соавт. [22] K. Ericson et al. [22]	209	ИГХ (экспрессия MLH1, MSH2 и MSH6) IHC (MLH1, MSH2 and MSH6 expression)	0,9 % (2/209) – MSI-H и MSI-L 0,9 % (2/209) – MSI-H and MSI-L
M. Rucińska и соавт. [23] M. Rucińska et al. [23]	16	ПЦР (ди- и тринуклеотидные маркеры) PCR (di- and trinucleotide markers)	25 % (4/16) – опухоли MSI-L 18,7 % (3/16) – опухоли MSI-H 25 % (4/16) – MSI-L tumors 18,7 % (3/16) – MSI-H tumors
K. Kawaguchi и соавт. [15] K. Kawaguchi et al. [15]	40	ПЦР (динуклеотидные маркеры) ИГХ (экспрессия MLH1 и MSH2) PCR (dinucleotide markers) IHC (MLH1 and MSH2 expression)	20 % (8/40) – опухоли MSI-L 5 % (2/40) – опухоли MSI-H 20 % (8/40) – MSI-L tumors 5 % (2/40) – MSI-H tumors
N.C. Campanella и соавт. [16] N.C. Campanella et al. [16]	71	ПЦР (моно- и динуклеотидные маркеры) ИГХ (экспрессия MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2) PCR (mono- and dinucleotide markers) IHC (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 expression)	Все опухоли MSS All tumors were MSS
Оценка статуса MSI среди больных лейомиосаркомами <i>Evaluation of MSI status among patients with leiomyosarcomas</i>			
Данные НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, 2019 N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology data, 2019	41	ПЦР (моноклеотидные маркеры) PCR (mononucleotide markers)	2,4 % (1/41) – опухоль с MSI-L по маркеру NR21 2,4 % (1/41) – MSI-L tumor per the NR21 marker

Примечание. MSI – микросателлитная нестабильность; MSI-H (MSI-high) – высокий уровень MSI; MSI-L (MSI-low) – низкий уровень MSI; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ИГХ – иммуногистохимическое исследование; MSS – микросателлитно-стабильный фенотип.

Note. MSI – microsatellite instability; MSI-H (MSI-high) – high MSI level; MSI-L (MSI-low) – low MSI level; PCR – polymerase chain reaction; IHC – immunohistochemistry; MSS – microsatellite stable phenotype.

Заключение

Частота экспрессии PD-L1 среди больных брюшинными лейомиосаркомами в нашем наблюдении составила 24 % (10/41), статус MSI-L определен в 2,4 % (1/41) случаев. У больных с опухолью II степени зло-

качественности наличие экспрессии PD-L1 связано с достоверным снижением общей выживаемости. PD-L1 у больных брюшинными лейомиосаркомами следует рассматривать как прогностический маркер и потенциальную терапевтическую мишень.

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

1. Lamm W., Natter C., Schur S. et al. Distinctive outcome in patients with non-uterine and uterine leiomyosarcoma. *BMC Cancer* 2014;14:981. DOI: 10.1186/1471-2407-14-981.
2. Jacobs A.J., Michels R., Stein J., Levin A.S. Improvement in overall survival from extremity soft tissue sarcoma over twenty years. *Sarcoma* 2015;2015:279601. DOI: 10.1155/2015/279601.
3. Emens L.A., Emens L.A., Butterfield L.H., Hodi F.S. Jr et al. Cancer immunotherapy trials: leading a paradigm shift in drug development. *J Immunother Cancer* 2016;4:42. DOI: 10.1186/s40425-016-0146-9.
4. Chen D.S., Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013;39(1):1–10. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
5. Reiss K.A., Forde P.M., Brahmer J.R. Harnessing the power of the immune system via blockade of PD-1 and PD-L1: a promising new anticancer strategy. *Immunotherapy* 2014;6(4):459–75. DOI: 10.2217/imt.14.9.
6. Zhang Y., Kang S., Shen J. et al. Prognostic significance of programmed cell death 1 (PD-1) or PD-1 ligand 1 (PD-L1) Expression in epithelial-originated cancer: a meta-analysis. *Medicine* 2015;94(6):515. DOI: 10.1097/MD.0000000000000515.
7. Topalian S.L., Hodi F.S., Brahmer J.R. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2443–54. DOI: 10.1056/NEJMoa1200690.
8. Paydas S., Bagir E.K., Deveci M.A., Gonlusen G. Clinical and prognostic significance of PD-1 and PD-L1 expression in sarcomas. *Med Oncol* 2016;33(8):93. DOI: 10.1007/s12032-016-0807-z.
9. Chen K., Cheng G., Zhang F. et al. Prognostic significance of programmed death-1 and programmed death-ligand 1 expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016;7(21):30772. DOI: 10.18632/oncotarget.8956.
10. Le D.T., Uram J.N., Wang H. et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015;372(26):2509–20. DOI: 10.1056/NEJMoa1500596.
11. Dudley J.C., Lin M.T., Le D.T., Eshleman J.R. Microsatellite instability as a biomarker for PD-1 blockade. *Clin Cancer Res* 2016;22(4):813–20. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1678.
12. Nabouh A., Roman C.A.J., Shapira I. Immune checkpoint inhibitors in malignancies with mismatch repair deficiency: a review of the state of the current knowledge. *J Investig Med* 2017;65(4):754–8. DOI: 10.1136/jim-2016-000342.
13. Schmidt L.H., Kummel A., Görlich D. et al. PD-1 and PD-L1 expression in NSCLC indicate a favorable prognosis in defined subgroups. *PLoS One* 2015;10(8):0136023. DOI: 10.1371/journal.pone.0136023.
14. Kostine M., Briaire-de Bruijn I.H., Cleven A.H.G. et al. Increased infiltration of M2-macrophages, T-cells and PD-L1 expression in high grade leiomyosarcomas supports immunotherapeutic strategies. *Oncoimmunology* 2018;7(2):1386828. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1386828.
15. Kawaguchi K., Oda Y., Takahira T. et al. Microsatellite instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in soft tissue sarcomas. *Oncol Rep* 2005;13(2):241–6.
16. Campanella N.C., Penna V., Ribeiro G. et al. Absence of microsatellite instability in soft tissue sarcomas. *Pathobiology* 2015;82(1):36–42. DOI: 10.1159/000369906.
17. Popat S., Hubner R., Houlston R.S. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005;23(3):609–18.
18. D'Angelo S.P., Mahoney M.R., van Tine B.A. et al. Nivolumab with or without ipilimumab treatment for metastatic sarcoma (Alliance A091401): two open-label, non-comparative, randomised, phase 2 trials. *Lancet Oncol* 2018;19(3):416–26. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30006-8.
19. Tawbi H.A., Burgess M., Bolejack V. et al. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017;18(11):1493–501. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30624-1.
20. Wooster R., Cleton-Jansen A.M., Collins N. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nat Genet* 1994;6(2):152. DOI: 10.1038/ng0294-152.
21. Saito T., Oda Y., Kawaguchi K. et al. Possible association between tumor-suppressor gene mutations and hMSH2/hMLH1 inactivation in alveolar soft part sarcoma. *Hum Pathol* 2003;34(9):841–9. DOI: 10.1016/s0046-8177(03)00343-5.
22. Ericson K., Engellau J., Persson A. et al. Immunohistochemical loss of the DNA mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 in malignant fibrous histiocytomas. *Sarcoma* 2004;8(4):123–7. DOI: 10.1080/13577140400010856.
23. Rucińska M., Kozłowski L., Pepiński W. et al. High grade sarcomas are associated with microsatellite instability (chromosome 12) and loss of heterozygosity (chromosome 2). *Med Sci Monit* 2005;11(2):65–8.

Вклад авторов

В.Е. Бугаев: получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 М.П. Никулин: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 Н.И. Поспехова, Н.В. Кокосадзе: получение данных для анализа, анализ полученных данных;
 В.М. Сафронова, Я.А. Божченко: получение данных для анализа;
 С.Н. Неред: анализ полученных данных;
 Л.Н. Любченко, И.С. Стилиди: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных.

Authors' contributions

V.E. Bugaev: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing;
 M.P. Nikulin: developing the research design, analysis of the obtained data, article writing;
 N.I. Pospekhova, N.V. Kokosadze: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;
 V.M. Safronova, Ya.A. Bozhchenko: obtaining data for analysis;
 S.N. Nered: analysis of the obtained data;
 L.N. Lyubchenko, I.S. Stilidi: developing the research design, analysis of the obtained data.

ORCID авторов/ORCID of authors

В.Е. Бугаев/V.E. Bugaev: <https://orcid.org/0000-0002-2410-7801>
 М.П. Никулин/M.P. Nikulin: <https://orcid.org/0000-0002-9608-4696>

Н.И. Поспехова/N.I. Pospekhova: <https://orcid.org/0000-0001-5255-5065>

Л.Н. Любченко/L.N. Lyubchenko: <https://orcid.org/0000-0003-4775-3299>

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

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

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

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Уровень некоторых гематологических воспалительных маркеров у больных раком шейки матки в зависимости от морфологических особенностей первичной опухоли

Е.В. Каюкова¹, Т.Е. Белокриницкая¹, Л.Ф. Шолохов², П.П. Терешков¹

¹ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России; Россия, 672000 Чита, ул. Горького, 39А;

²ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»; Россия, 664003 Иркутск, ул. Тимирязева, 16

Контакты: Елена Владимировна Каюкова elena_pochta22@mail.ru

Введение. Системное действие опухоли на организм подразумевает влияние на различные процессы жизнедеятельности органов и тканей, приводящие к кахексии, иммунодепрессии, анемии, изменению гуморальной регуляции и др. Поскольку воспаление является одним из хорошо известных этиологических факторов канцерогенеза, в том числе и для рака шейки матки (РШМ), мы предполагаем влияние опухолевой прогрессии на содержание маркеров воспаления в плазме крови пациенток с данным онкологическим заболеванием.

Цель исследования — оценить уровень ряда гематологических маркеров воспалительного процесса у больных РШМ в сопоставлении с гистологическими особенностями первичной опухоли.

Материалы и методы. Материал исследования — сыворотка крови пациенток с инвазивным РШМ I–IV стадии (4 пациентки с веррукозным раком, 26 — с РШМ, среди которых у 10 степень злокачественности G_p , у 6 — G_2 , у 10 — G_3). Метод исследования — проточная цитометрия. Определяемые показатели: миоглобин, кальпротектин, липокалин, матриксная металлопероксидаза-2, -9, остеопонтин, миелопероксидаза, сывороточный амилоид А, белок 4, связывающий инсулиноподобный фактор роста, молекула межклеточной адгезии 1, молекула адгезии сосудистого эндотелия 1, цистатин С.

Результаты. Выявлены изменения профиля некоторых воспалительных маркеров в крови пациенток с РШМ низкой степени дифференцировки и веррукозным РШМ.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения ассоциации уровня содержания ряда гематологических маркеров воспалительного процесса и наличия РШМ низкой степени дифференцировки в целях их возможного использования в качестве вспомогательных дифференциальных и прогностических критериев.

Ключевые слова: рак шейки матки, маркер воспаления, степень дифференцировки, веррукозный рак

Для цитирования: Каюкова Е.В., Белокриницкая Т.Е., Шолохов Л.Ф., Терешков П.П. Уровень некоторых гематологических воспалительных маркеров у больных раком шейки матки в зависимости от морфологических особенностей первичной опухоли. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(3):49–56.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-3-49-56

The level of some blood serum inflammatory factors in depending on the morphological features of the primary tumor of of cervical cancer

E.V. Kayukova¹, T.E. Belokrinitskaya¹, L.F. Sholokhov², P.P. Tereshkov¹

¹Chita State Medical Academy, Ministry of Health of Russia; 39A Gorkogo St., Chita 672000, Russia;

²Scientific Center of Family Health Problems and Human Reproduction; 16 Timiryazeva St., Irkutsk 664003, Russia

Background. Tumors influence on various vital processes in organism leading to cachexia, immunosuppression, anemia, changes in humoral regulation etc. Inflammation is one of the well-known etiological factors of carcinogenesis, including for cervical cancer, so we suggest that some blood serum inflammatory factors in patients with cervical cancer influence are associated with the level of tumor progression.

The objective of our study was to analyze the level of some hematological markers of inflammation in the blood serum of patients with cervical cancer in dependence on the histological characteristics of the primary tumors.

Materials and methods. In the study we analyzed the blood serum of patients with invasive cervical cancer I–IV stage (4 patients with verrucous cancer and 26 — with cervical cancer among them 10 — of G_1 stage, 6 — of G_2 stage, 10 — G_3 stage) using flow cytometry. We studied the value of myoglobin, calprotectin, lipocalin, matrix metalloperoxidase 2, matrix metalloperoxidase 9, osteopontin, myeloperoxidase, serum amyloid A, protein 4, insulin-like growth factor-binding protein 4, cell-cell adhesion molecule 1, vascular cell adhesion molecule, cystatin C.

Results. We revealed the changes of some serum markers of inflammation in patients with G_3 and verrucous cervical cancer.

Conclusion. The obtained dates demonstrate that further study of blood inflammatory markers as an additional differential and prognostic criteria in patients with cervical cancer should be considered as reasonable.

Key words: cervical cancer, marker of inflammation, degree of differentiation, verrucous cervical cancer

For citation: Kayukova E.V., Belokrinitskaya T.E., Sholokhov L.F., Tereshkov P.P. The level of some blood serum inflammatory factors in depending on the morphological features of the primary tumor of of cervical cancer. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2019;6(3):49–56.

Введение

Рак шейки матки (РШМ) занимает 3-е место по частоте заболеваемости злокачественными новообразованиями среди женщин во всем мире [1]. Факторами, определяющими прогноз этого заболевания, являются стадия опухолевого процесса, размер опухоли, вовлечение региональных лимфатических узлов, лимфоваскулярная, стромальная инвазия и ее степень. К настоящему времени появились данные о том, что степень злокачественности (G_1 – G_3) у больных РШМ также является критерием прогноза. Больные РШМ с низкой степенью злокачественности (G_1 или G_2) имеют лучшие показатели общей и безрецидивной выживаемости. Общая 5-летняя выживаемость пациенток с РШМ составляет 76,0 %, этот показатель снижается до 65,1 % при РШМ низкой степени дифференцировки (G_3) ($p = 0,031$). При этом общая безрецидивная выживаемость составляет 77,1 % по сравнению с 64,2 % при G_3 ($p = 0,008$) [2].

В популяционном анализе среди 31 тыс. американских женщин с установленным диагнозом РШМ было показано, что степень дифференцировки РШМ не только влияет на показатели выживаемости, но и ассоциирована с другими параметрами: возрастом пациенток, распространением/стадией заболевания, размером опухоли и наличием метастазов в лимфатических узлах (для всех $p < 0,001$) [3].

В настоящее время продолжается поиск прогностических маркеров течения заболевания, причем в качестве доступных для мониторинга биологических образцов особый интерес представляют образцы крови пациенток с РШМ. Учитывая тот факт, что в инициации канцерогенеза и прогрессии опухоли важным фактором является воспаление, можно предположить, что определенные изменения некоторых гематологических маркеров воспалительного процесса прослеживаются в опухолевой прогрессии у больных РШМ [4].

Цель исследования – изучить уровень некоторых гематологических воспалительных маркеров у больных РШМ в зависимости от гистологических особенностей первичной опухоли.

Приоритетной задачей работы стал анализ выявленных воспалительных изменений, протекающих на системном уровне в процессе цервикального канцерогенеза, в целях определения возможных дифференциальных и прогностических маркеров РШМ разных морфологических вариантов.

Материалы и методы

Проведено нерандомизированное проспективное контролируемое исследование по изучению уровней некоторых гематологических воспалительных маркеров у больных РШМ.

Материалом для исследования служила сыворотка крови пациенток с инвазивным РШМ I–IV стадии, проходивших лечение в Забайкальском краевом онкологическом диспансере в 2018 г. Средний возраст больных составил $39 \pm 9,8$ года. Все обследуемые были

информированы о проводимой работе и дали письменное согласие на участие в ней. Исследование выполнено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki, 1964, 2013 ред.) с согласия Локального этического комитета Читинской государственной медицинской академии [5].

В соответствии с данными медицинской документации с учетом рекомендаций 3-го издания «Международной классификации болезней – онкология» выделены клинические группы, указанные в табл. 1 [6].

Образцы группы контроля были взяты у 15 гинекологически здоровых женщин-добровольцев, давших информированное согласие на участие в исследовании.

Таблица 1. Характеристика обследуемых лиц

Table 1. Characteristics of the examined subjects

Клиническая группа Clinical group	Число больных Number of patients	Средний возраст (Me \pm SD), лет Mean age (Me \pm SD), years
Веррукозный рак Verrucous cancer	4	46,5 \pm 2,5
G_1	20	34,0 \pm 7,0
G_2	6	44,5 \pm 8,2
G_3	10	45,0 \pm 12,5
Контроль Control	15	30,0 \pm 4,4

С помощью метода проточной цитофлуориметрии FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием набора реагентов, входящих в состав панели Human Vascular Inflammation Panel 1, изучали следующие гематологические показатели: миоглобин (myoglobin, MG), кальпротектин (calprotectin, CAL), липокалин А (lipocalin A, LCN2), матриксная металлопероксидаза 2 (matrix metalloperoxidase 2, MMP-2), остеопонтин (osteopontin, OPN), миелопероксидаза (myeloperoxidase, MPO), сывороточный амилоид А (serum amyloid A, SAA), белок 4, связывающий инсулиноподобный фактор роста (insulin-like growth factor-binding protein 4, IGFBP-4), молекула межклеточной адгезии 1 (inter-cellular adhesion molecule, ICAM-1), молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1), матриксная металлопероксидаза 9 (MMP-9), цистатин С (cystatin C, CC). Содержание воспалительных белков приведено как медиана (Me) (25-й; 75-й перцентили) в нг/мл.

Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы BioStat. Полученные результаты представлены как Me с указанием границ 25-го и 75-го перцентилей. Использовали методы непараметрической статистики с применением U-критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Статистически значимых различий между уровнями LCN2 в сыворотке крови у больных РШМ с разной степенью дифференцировки опухоли не выявлено. Однако наблюдалась тенденция к повышению уровня LCN2 при более агрессивных вариантах РШМ: при G_1 – 1444,26 нг/мл, при G_3 – 3111,35 нг/мл. Статистически значимые различия по величине LCN2 выявля-

ны между группами веррукозного РШМ и контроля: в группе больных показатель выше на 27,6 % ($p \leq 0,05$) (табл. 2).

У больных РШМ с низкой дифференцировкой опухолевых клеток концентрация MMP-2 была на 41,1 % меньше, чем в группе контроля ($p < 0,05$).

Уровень ОРН в крови у больных РШМ G_3 в 1,75 раза ниже, чем у больных с опухолями G_1 ($p < 0,05$),

Таблица 2. Уровень воспалительных факторов в сыворотке крови в зависимости от степени дифференцировки рака шейки матки (медиана (25-й; 75-й перцентили)), нг/мл

Table 2. Serum levels of inflammatory factors depending on cervical cancer differentiation grade (median (25th; 75th percentiles)), ng/ml

Показатель Characteristic	Группа контроля (n = 15) Control group (n = 15)	Веррукозный рак (n = 4) Verrucous cancer (n = 4)	G_1 (n = 20)	G_2 (n = 6)	G_3 (n = 10)
Миоглобин Myoglobin	285,81 (219,57; 423,86)	261,88 (255,47; 268,28)	275,48 (168,09; 367,62)	250,98 (154,72; 482,63)	259,45 (200,53; 330,88)
Кальпротектин Calprotectin	3637,39 (1492,65; 4908,39)	2669,58 (2386,94; 2952,23)	2394,71 (1090,81; 3960,48)	6641,82 (2157,52; 7275,50)	2705,09 (1528,65; 4588,89)
Липокалин А Lipocalin A	1683,21 (988,46; 2389,14)	2147,88* (2085,14; 2210,61)	1444,26 (868,24; 3184,53)	3111,35 (1731,82; 3599,93)	2419,43 (961,94; 3088,65)
Матриксная металлопероксидаза 2 Matrix metalloperoxidase 2	19,71 (13,15; 28,31)	16,01 (14,94; 17,07)	12,29 (10,92; 30,01)	14,75 (10,33; 15,67)	11,60* (9,39; 16,85)
Остеопонтин Osteopontin	16,88 (12,37; 28,67)	25,91* (23,95; 27,86)	17,30 (10,77; 26,51)	13,74 (12,09; 27,97)	30,40*# (26,84; 38,28)
Миелопероксидаза Myeloperoxidase	485,89 (370,78; 719,71)	505,19 (487,10; 523,27)	494,29 (374,82; 684,54)	810,68 (374,28; 1275,54)	364,87 (332,09; 404,77)
Сывороточный амилоид А Serum amyloid A	98,74 (73,39; 185,50)	253,73* (247,74; 259,71)	92,22 (49,66; 221,43)	391,97 (106,55; 800,80)	465,46*# (371,56; 791,61)
Белок 4, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-4) Insulin-like growth factor-binding protein 4 (IGFBP-4)	101,48 (59,13; 162,63)	176,35 (114,06; 238,64)	121,75 (64,88; 188,12)	57,37 (25,33; 128,32)	99,9 (58,16; 112,40)
Молекула межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) Inter-cellular adhesion molecule (ICAM-1)	4,55 (2,75; 18,40)	4,31 (3,38; 5,23)	4,84 (3,78; 9,14)	2,48 (1,52; 15,88)	3,35 (3,09; 5,62)
Молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 (VCAM-1) Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)	108,31 (61,81; 168,20)	63,0* (59,7; 66,29)	74,27 (60,384; 124,89)	78,26 (45,03; 100,05)	88,11 (62,29; 104,07)
Матриксная металлопероксидаза 9 Matrix metalloperoxidase 9	253,87 (188,26; 346,07)	348,81 (304,42; 393,19)	182,58 (151,42; 321,98)	286,77 (161,98; 502,77)	306,43 (250,61; 369,55)
Цистатин С Cystatin C	57,58 (40,40; 111,12)	60,89 (51,39; 70,38)	51,53 (38,58; 80,44)	58,79 (27,07; 114,87)	47,31 (44,52; 73,38)

*Уровень значимости различий между значениями клинических групп и контролем $\leq 0,05$.

*Significance level for differences between the clinical and control groups is ≤ 0.05 .

#Уровень значимости различий между значениями групп G_1 и G_3 $\leq 0,05$.

#Significance level for differences between the G_1 and G_3 groups is ≤ 0.05

и в 1,8 раза ниже, чем у здоровых ($p < 0,05$). Интересно отметить, что у больных веррукозным РШМ величина OPN в крови на 53,5 % меньше, чем в группе контроля ($p < 0,05$).

У больных РШМ с низкой дифференцировкой опухолевых клеток концентрация SAA статистически значимо ($p < 0,05$) превышала соответствующие величины в группе контроля и у пациенток с высококодифференцированными опухолями в 4,7 и 1,8 раза соответственно. Кроме этого, следует обратить внимание на выявленные отличия по уровню SAA у больных с веррукозным РШМ от соответствующей характеристики в контрольной группе ($p < 0,05$).

По мере уменьшения степени дифференцировки РШМ наблюдалась тенденция к снижению уровня МРО в сыворотке крови от 494,29 при G₁ до 364,87 при G₃, однако статистически значимых различий между этими величинами не получено.

Выявлены статистически значимые различия по величине VCAM-1 у больных веррукозным РШМ по сравнению с группой контроля: наблюдалось статистически значимое снижение на 41,8 % ($p < 0,05$).

При анализе полученных данных в зависимости от гистогенеза и степени дифференцировки опухоли установлено, что в крови больных РШМ не выявлено достоверных различий по уровням MG, CAL, IGFBP-4, ICAM-1, MMP-9 и цистатина С по сравнению с показателями группы контроля.

Обсуждение

Миоглобин – многофункциональный гемовый белок, играющий важную роль в транспорте кислорода. Кроме этого, он является акцептором свободных радикалов. Этот белок экспрессируется не только в поперечнополосатых мышцах, но и тканях внутренних органов [7]. Установлено, что трансформированные эпителиальные клетки, в частности рака молочной железы, предстательной железы, плоскоклеточных карцином головы и шеи, могут экспрессировать MG, что рассматривается как благоприятный прогностический признак [8].

В экспериментальной работе G. Kristiansen и соавт. определяли уровень экспрессии гена MG и содержание белка (MG) в клетках рака молочной железы в зависимости от биологического подтипа опухоли [9]. Авторы указали, что клетки рака молочной железы с низкой степенью дифференцировки реже экспрессируют MG (умеренная и выраженная экспрессия выявлена у 33,8 % больных по сравнению с 41,9 % при G₂ и 44,4 % при G₁; $p < 0,001$), при этом они чаще являются гормонорезистентными. Содержание MG в клетках рака молочной железы регулируется наличием гормональных рецепторов и, возможно, уровнями жирных кислот или факторов роста, а также содержанием CO₂ в микроокружении опухолевых клеток [9].

Данных по изучению сывороточного уровня MG у больных РШМ, а также работ по изучению корреля-

ций уровня MG в крови со степенью дифференцировки опухоли у онкологических больных в литературе найти не удалось. Известно, что сывороточный уровень MG повышается в острую фазу инфаркта миокарда [10], у больных острым панкреатитом [11], у беременных женщин с имеющейся внутриутробной гипоксией плода [12].

Результаты нашего исследования свидетельствуют об отсутствии изменений в уровне MG в крови пациенток с РШМ, что согласуется с результатами S.M. Nyasa-vajjala и соавт., не выявивших повышения исследуемого показателя у больных колоректальным раком [13].

Кальпротектин представляет собой белковый комплекс S100A8 и S100A9, обладающий провоспалительным действием, активирующий иммунный ответ при инфекционных заболеваниях, а также провоцирующий аутоиммунную агрессию, эндотелиальную дисфункцию и способствующий метастазированию [14]. CAL может высвобождаться фагоцитами, а также экспрессироваться опухолевыми клетками, что было установлено при раке легкого, молочной железы, предстательной железы, пищевода, толстой кишки [14].

Опубликованные данные по изучению экспрессии CAL при РШМ касаются лишь регистрации внутриклеточного уровня белка в процессе малигнизации цервикального эпителия, и при этом они весьма противоречивы.

Так, в одном исследовании показано, что экспрессия S100A9 в клетках плоскоклеточного РШМ снижена [15]. Статистически значимых различий по этому показателю между опухолевыми образцами разной степени дифференцировки не выявлено, что согласуется с полученными нами данными. При этом авторы исследования установили, что пациентки с низким уровнем экспрессии S100A9 имеют худшую общую выживаемость. Молекулярный механизм, обуславливающий действие CAL на клетку, связан с влиянием на MMP-9 и PI3K/Akt-сигнальный путь [15]. Однако противоположные результаты были представлены в работе X. Zhu и соавт. [16]. Экспрессия белка S100A9 увеличена в локусе цервикального рака по сравнению со смежными паранеопластическими биоптатами ткани, при этом при высококодифференцированных опухолях этот показатель значимо выше.

Опубликованных данных по исследованию уровня CAL в периферической крови у больных РШМ нами не найдено. Однако имеется ряд работ, свидетельствующих об изменении этого параметра у онкологических больных с опухолями других локализаций. A. Hermaniет и соавт. сообщили о более высоком сывороточном уровне CAL у больных, страдающих раком предстательной железы [17]. При этом на клеточном уровне экспрессия S100A8 и S100A9 была максимальна при опухолях высокой степени злокачественности, что может способствовать прогрессированию неоплазии.

S. Hiratsuka и соавт. доказали *in vitro*, что в метастатических нишах опухолевые клетки выделяют большое

количество S100A8 и S100A9, что индуцирует выброс SAA клетками иммунной системы и способствует привлечению и выживанию опухолевых клеток в метастатических депо через активацию NF-κB TLR4-зависимым образом [18].

P. Shu и соавт. опубликовали данные о существенном повышении уровня СА1 в сыворотке крови у больных колоректальным раком [19]. При этом данный показатель коррелировал со стадией опухолевого процесса, наличием отдаленных и регионарных метастазов, глубиной опухолевой инвазии и низкой степенью дифференцировки.

В нашей работе мы впервые демонстрируем статистически значимое увеличение данного показателя в группе больных верукозным раком.

Липокаины А представляют собой белки, секретируемые различными клетками (макрофагами, нейтрофилами, эпителиальными клетками), в том числе опухолевыми. Они регулируют клеточный метаболизм, иммунный ответ, синтез простагландинов, секрецию маркеров воспаления, а в процессе канцерогенеза — потенцируют клеточную пролиферацию и метастазирование [20]. LCN2 был идентифицирован как гликопротеин нейтрофилов, образующий комплекс с MMP-9, стабилизируя ее и увеличивая протеиназную активность [21]. LCN2 рассматривается как биомаркер некоторых видов опухолей (рака молочной железы, яичников, щитовидной железы, легкого и др.), активирующий эпителиально-мезенхимальный переход, многочисленные сигнальные митотические пути, стимулирующий патологический ангиогенез [21].

Имеются данные о более высоком уровне LCN2 в крови у больных раком молочной железы с низкой степенью дифференцировки, высоким риском рецидива и худшим прогнозом, что обусловлено его влиянием на образование VEGF, активацию сигнальных путей PI3K/Akt/NF-κB и HIF-1α/Erk [21].

Опубликованы и противоречивые результаты исследований. Уровень LCN2 в сыворотке при раке яичников выше, чем в группах сравнений ($p < 0,001$), и коррелировал с дифференцировкой опухоли, при этом высоко дифференцированные опухоли имели самый высокий показатель [22].

Выявленное нами повышение уровня LCN2 можно предложить в качестве дополнительного критерия дифференциальной диагностики высокодифференцированного плоскоклеточного и верукозного РШМ, однако требуется проведение исследования на больших когортах пациентов.

Матриксная металлопероксидаза — семейство цинк- и кальцийзависимых протеолитических ферментов, участвующих в деградации внеклеточного матрикса, способствующих лимфоваскулярной инвазии и метастазированию опухолей [23]. Известно, что секреция MMP происходит как опухолевыми клетками, так и клетками микроокружения [24].

Мы обнаружили снижение величины MMP-2 в сыворотке крови у больных РШМ G₃, что может являться

одним из механизмов опухолевой прогрессии. Известно, что MMP-2 участвует в образовании антиангиогенных (ангиостатин) и проапоптотических (тумстатин) факторов, а низкий сывороточный уровень MMP-2 является неблагоприятным прогностическим фактором у пациентов с генерализованным раком желудка [25].

Установленное нами отсутствие различий между уровнями MMP-9 при РШМ с разной степенью дифференцировки и гистогенезом опухоли согласуется с результатами исследований при раке эндометрия, молочной железы, яичников [26, 27].

Остеопонтин относится к классу матриксноклеточных белков, выполняет многообразные функции по remodelированию внеклеточной среды: регуляция процессов адгезии, миграции, дифференцировки клеток, формирование эффекторных ответов Т-клеток [28]. OPN выделяется эпителиальными, эндотелиальными клетками, клетками иммунной системы, может экспрессироваться различными злокачественными клетками, ассоциирован с неблагоприятным прогнозом и радиорезистентностью для некоторых опухолей [29].

Полученные нами данные о статистически значимом снижении сывороточного уровня OPN у больных РШМ G₃ согласуются с результатами других исследований, выявивших прямую корреляцию между высоким уровнем OPN, с одной стороны, и другими факторами прогрессирования РШМ — с другой (размер опухоли >4 см, стадия опухолевого процесса) [26]. По мнению некоторых ученых, OPN можно рассматривать в качестве неблагоприятного прогностического маркера плоскоклеточного РШМ и рака органов головы и шеи [30, 31].

Впервые нами было установлено, что сывороточный уровень OPN у больных верукозным РШМ на 53,5 % меньше, чем в группе контроля ($p < 0,05$).

Миелопероксидаза — член подсемейства пероксидаз, широко экспрессируется в иммунных клетках, таких как нейтрофильные полиморфноядерные лейкоциты, лимфоциты, моноциты и макрофаги, а также на эндотелиальных клетках [32]. Высокий уровень активности MPO рассматривается не только как маркер воспалительного и окислительного стресса, но и как перспективный онкомаркер при некоторых видах рака. Полиморфизм гена MPO приводит к нарушению экспрессии и функции соответствующего белка MPO, что может привести к формированию некоторых опухолей [32]. Нарушение структур ДНК, провоцирующее канцерогенез, также индуцируется окислителями, образуемыми под действием MPO [33]. MPO приводит к образованию генотоксических веществ и проканцерогенов [32], является фактором системной сосудистой дисфункции [34].

По мере уменьшения степени дифференцировки РШМ мы выявили тенденцию снижения уровня MPO в сыворотке крови при G₃, однако достоверных различий между этими величинами не получено ($p > 0,05$). Можно предположить, что изменение величины MPO при низкодифференцированных опухолях является

одним из механизмов для реализации опухолевой прогрессии.

Сывороточный амилоид А — белок острой фазы воспаления, синтезируемый, главным образом, в печени в ответ на провоспалительные цитокины. Кроме этого, синтез данного белка был выявлен как в ряде первичных опухолей, так и в их метастазах [35]. SAA, усиливая деградацию внеклеточного матрикса путем активации MMP, способствует адгезии опухолевых клеток и активации клеточной миграции. В то же время SAA индуцирует выброс цитокинов и хемокинов, стимулирует ангиогенез, а также активирует Erk1/2, p38 и JNK [36].

Высокий уровень SAA в крови у больных со злокачественными опухолями разных локализаций коррелирует со стадией опухолевого процесса, высокой степенью злокачественности, лимфоваскулярной инвазией, а также с худшим прогнозом [35]. Выявленное нами повышение уровня SAA в крови у больных РШМ с низкой дифференцировкой опухолевых клеток также указывает на его вовлеченность в процесс опухолевой прогрессии.

Кроме этого, выявленное нами впервые высокое содержание SAA в сыворотке у больных веррукозным РШМ может быть связано с особенностями данного морфологического варианта опухоли (выраженная локальная инвазия, радиорезистентность, склонность к рецидивированию).

IGFBP-4 относится к семейству IGFBP, связывающих инсулиноподобные факторы роста (IGF), регулируя их активность и подавляя опухолевый процесс [37]. Кроме этого, IGFBP имеют IGF-независимое действие: модуляция активности других факторов роста, транслокация в ядро и регуляция транскрипции белков, связывание с биомолекулами во внеклеточном пространстве, на поверхности клетки и внутриклеточно. IGFBP модулируют важные биологические процессы, включая пролиферацию клеток, выживание, миграцию, старение, аутофагию и ангиогенез [38]. Биологическая роль IGFBP разнообразна и определяется особенностями их клеточной экспрессии, возрастом, полом.

IGFBP-4 является важным ключевым членом семейства IGFBP, который может опосредовать свои основные функции посредством ингибирования IGF-индуцированного роста клеток и, таким образом, регулировать метаболические процессы в опухоли [38]. Уровень экспрессии IGFBP-4 связан с дифференцировкой и пролиферативной активностью опухоли: слабо-дифференцированные клетки часто теряют свою экспрессию IGFBP-4 и обладают более высоким митотическим индексом [39]. Однако полученные нами результаты свидетельствуют лишь о некоторой тенденции к снижению уровня IGFBP-4 в крови у больных РШМ по мере уменьшения степени дифференцировки опухолевых клеток.

ICAM-1 и VCAM-1 — молекулы межклеточной адгезии, регулирующие контакты между опухолевыми клетками, клетками иммунной системы и эндотелием сосудов [23].

Данных по изучению корреляции уровней ICAM-1 и VCAM-1 в сыворотке крови с морфологическими особенностями опухолей в литературе не найдено. Тем не менее были опубликованы данные об ассоциации уровня адгезивных молекул в крови у онкологических больных с другими нозологическими формами заболевания и стадии опухолевого процесса [23]. Этому соответствуют полученные нами статистически значимые различия по содержанию в крови VCAM-1 у больных веррукозным РШМ по сравнению с группой контроля.

Цистатин С относится к семейству ингибиторов цистеиновых протеиназ и в настоящее время рассматривается как эндогенный маркер скорости клубочковой фильтрации и ренальной дисфункции [40]. Цистеиновые протеиназы вызывают разрушение внутриклеточных белков и структур внеклеточного матрикса, активируют некоторые MMP, участвуют в регуляции пролиферации, апоптоза, тем самым способствуют диссеминации опухоли [40].

Дисбаланс между цистеиновыми протеазами и их ингибиторами способствует инвазии и метастазированию. Было продемонстрировано, что уровень этого дисбаланса ассоциирован с морфологическим вариантом опухолевых клеток метастазов [41]. По другим данным, цистатин С является проапоптотическим фактором и подавляет пролиферацию опухолевых клеток [42]. В нашей работе мы не обнаружили изменения уровня цистатина С в крови больных РШМ в зависимости от ее гистологического вида и степени дифференцировки.

Заключение

Увеличение уровней OPN, LCN2 и SAA на фоне снижения величины VCAM-1 в сыворотке крови может иметь значение в качестве дополнительного дифференциального (по степени распространения процесса) критерия веррукозного РШМ.

У пациенток с низкодифференцированным РШМ (G_3) в отличие от группы контроля характерны системные изменения в крови по маркерам воспаления: снижение уровней OPN, MMP-2 в 1,8 раза и на 41,1 % соответственно на фоне увеличения уровня SAA в 4,7 раза.

В качестве дополнительного критерия для дифференциальной диагностики между G_1 и G_3 при РШМ могут быть использованы такие показатели, как уровни содержания OPN и SAA в сыворотке крови. Для низкодифференцированных опухолей (G_3) характерно снижение уровня OPN в 1,75 раза на фоне повышения уровня SAA в 1,8 раза.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Siegel R., Naishadham D., Jemal Siegel A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018;68(1):7–30. DOI:10.3322/caac.21442
- Brambs C.E., Höhn A.K., Hentschel B. et al. The prognostic impact of grading in FIGO IB and IIB squamous cell cervical carcinomas. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2019;79(2):198–204. DOI: 10.1055/a-0828-7681.
- Matsuo K., Mandelbaum R.S., Machida H. et al. Association of tumor differentiation grade and survival of women with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *J Gynecol Oncol* 2018;29(6):e91. DOI: 10.3802/jgo.2018.29.e91.
- Murata M. Inflammation and cancer. *Environ Health Prev Med* 2018;23(1):50. DOI: 10.1186/s12199-018-0740-1.
- WMA declaration of helsinki – ethical principles for medical research involving human subjects, 2018
- International classification of diseases for oncology (ICD-O), 3rd edition, 1st revision, 2013.
- Flonta S.E., Arena S., Pisacane A. et al. Expression and functional regulation of myoglobin in epithelial cancers. *Am J Pathol* 2009;175(1):201–6. DOI: 10.2353/ajpath.2009.081124.
- Meller S., VAN Ellen A., Gevensleben H. et al. Ectopic myoglobin expression is associated with a favourable outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Res* 2016;36(12):6235–41. DOI: 10.21873/anticancer.11217.
- Kristiansen G., Rose M., Geisler C. et al. Endogenous myoglobin in human breast cancer is a hallmark of luminal cancer phenotype. *Br J Cancer* 2010;102(12):1736–45. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605702.
- Пархоменко А.Н., Иркин О.И., Лутай Я.М. Роль биологических маркеров в неотложной кардиологии. *Медицина неотложных состояний* 2011;7–8 (38–39): 46–54. [Parhomenko A.N., Irkin O.I., Lutaj Ya.M. The role of biological markers in emergency cardiology. *Meditsina neotlozhnykh sostoyaniy* = Emergency Medicine 2011;7–8(38–39):46–54. (In Russ.)].
- Заугольников В.С., Теплова Н.Н., Теплова Т.А. Специфический показатель повреждения скелетных мышц миоглобин как дополнительный критерий эндогенной интоксикации у больных панкреатитом. *Актуальные вопросы хирургической гепатологии, гастроэнтерологии и трансфузиологии: материалы межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, посвященной 80-летию В.А. Журавлева. Киров, 2011.* С. 85–86. [Zaugol'nikov V.S., Teplova N.N., Teplova T.A. The specific indicator of skeletal muscle damage myoglobin as an additional criterion for endogenous intoxication in patients with pancreatitis. *Actual issues of surgical hepatology, gastroenterology and transfusiology: materials of an interregional scientific-practical conference with international participation dedicated to the 80th anniversary of V.A. Zhuravlev. Kirov, 2011.* Pp. 85–86. (In Russ.)].
- Бапаева Г.Б. Биохимические маркеры преждевременных родов. *Журнал акушерства и женских болезней* 2005;3: 38–41. [Bapaeva G.B. Biochemical markers of premature birth. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney* = Journal of Obstetrics and Women's Diseases 2005;3:38–41. (In Russ.)].
- Nyasavajjala S.M., Phillips B.E., Lund J.N., Williams J.P. Creatinine and myoglobin are poor predictors of anaerobic threshold in colorectal cancer and health. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2015;6(2): 125–31. DOI: 10.1002/jcsm.12020.
- Blanco-Prieto S., Vázquez-Iglesias L., Rodríguez-Girondo M. et al. Serum calprotectin, CD26 and EGF to establish a panel for the diagnosis of lung cancer. *PLoS One* 2015;10(5):e0127318. DOI: 10.1371/journal.pone.0127318.
- Zhu H., Wu T.C., Chen W.Q. et al. Roles of galectin-7 and S100A9 in cervical squamous carcinoma: clinicopathological and *in vitro* evidence. *Int J Cancer* 2013;132(5):1051–9. DOI: 10.1002/ijc.27764.
- Zhu X., Jin L., Zou S. et al. Immunohistochemical expression of RAGE and its ligand (S100A9) in cervical lesions. *Cell Biochem Biophys* 2013;66(3):843–50. DOI: 10.1007/s12013-013-9515-x.
- Hermani A., Hess J., De Servi B. et al. Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(14):5146–52. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0352.
- Hiratsuka S., Watanabe A., Sakurai Y. et al. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol* 2008;10(11):1349–55. DOI: 10.1038/ncb1794.
- Shu P., Zhao L., Wagn J. et al. Association between serum levels of S100A8/S100A9 and clinical features of colorectal cancer patients. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2016;41(6):553–9. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2016.06.001.
- Vitkauskaitė A., Celiešūtė J., Paškauskas S. et al. Associations among serum lipocalin-2 concentration, human papilloma virus and clinical stage of cervical cancer. *Medicina (Kaunas)* 2019;55(6). DOI: 10.3390/medicina55060229.
- Hu C., Yang K., Li M. et al. Lipocalin 2: a potential therapeutic target for breast cancer metastasis. *Oncol Targets Ther* 2018;11:8099–106. DOI: 10.2147/OTT.S181223.
- Cho H., Kim J.H. Lipocalin2 expressions correlate significantly with tumor differentiation in epithelial ovarian cancer. *J Histochem Cytochem* 2009;57(5):513–21. DOI: 10.1369/jhc.2009.953257.
- Короленкова Л.И., Степанова Е.В., Барышникова А.Ю. Молекулярно-биологические маркеры адгезии, утраты межклеточных связей, инвазии и неоангиогенеза как факторы прогрессии цервикальных неоплазий и рака шейки матки. *Российский биотерапевтический журнал* 2011;10(2):13–7. [Korolenkova L.I., Stepanova E.V., Baryshnikova A.Yu. Molecular biomarkers of development and progression of cervical intraepithelial neoplasia. markers of adhesion, loss of intercellular connections, invasion and neoangiogenesis. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Biotherapeutic Journal 2011;10(2):13–7. (In Russ.)].
- Плиева Я.З., Ермилова В.Д., Алферов А.А. и др. Содержание матриксной металлопротеиназы 7 типа в сыворотке крови и опухоли больных раком яичников. *Онкогинекология* 2018;1(25):15–28. [Plieva Ya.Z., Ermilova V.D., Alferov A.A. et al. The content of matrix metalloproteinase-7 in blood serum and tumor in patients with ovarian cancer. *Onkoginekologiya* = Oncogynecology 2018;(25):15–28. (In Russ.)].
- Donizy P., Rudno-Rudzinska J., Kaczorowski M. et al. Disrupted balance of MMPs/TIMPs in gastric carcinogenesis-paradoxical low MMP-2 expression in tumor and stromal compartments as a potential marker of unfavorable outcome. *Cancer Investigation* 2015;33(7):286–93. DOI: 10.3109/07357907.2015.1024316.
- Гертшейн Е.С., Маштенко С.В., Левченко Н.Е. и др. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы в сыворотке крови больных раком эндометрия: клинико-морфологические корреляции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2018;165(1):75–9. DOI: 10.1007/s10517-018-4103-0. [Gershtein E.S., Mushtenko S.V., Ermilova V.D. et al. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in blood

- serum of patients with endometrial cancer: clinical and morphological correlations. *Bullyuten' eksperimental'noy biologii i meditsyny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2018;165(1):75–9. (In Russ.).
27. Wang R.X., Chen S., Huang L., Shao Z.M. Predictive and prognostic value of Matrix metalloproteinase (MMP)-9 in neoadjuvant chemotherapy for triple-negative breast cancer patients. *BMC Cancer* 2018;18(1):909. DOI: 10.1186/s12885-018-4822-7.
 28. Del Prete A., Scutera S., Sozzani S., Musso T. Role of osteopontin in dendritic cell shaping of immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2019. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2019.05.004.
 29. Huang X., Qian Y., Wu H. et al. Aberrant expression of osteopontin and E-cadherin indicates radiation resistance and poor prognosis for patients with cervical carcinoma. *J Histochem Cytochem* 2015;63(2):88–98. DOI: 10.1369/0022155414561329.
 30. Cho H., Hong S.W., Oh Y.J. et al. Clinical significance of osteopontin expression in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134(8):909–17. DOI: 10.1007/s00432-007-0351-5.
 31. Zhao Hongchun, Wang Yanfei, Zheng Tihua et al. Correlation of osteopontin expression and laryngeal squamous cell carcinoma infiltration and metastasis. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2015;29(17):1530–3.
 32. Khan A.A., Alsahli M.A., Rahmani A.H. Myeloperoxidase as an active disease biomarker: recent biochemical and pathological perspectives. *Med Sci (Basel)* 2018;6(2). DOI: 10.3390/medsci6020033.
 33. Van der Veen B.S., de Winther M.P.J., Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:2899–937. DOI: 10.1089/ars.2009.2538.
 34. Khalil A., Medfai H., Poelvoorde P. et al. Myeloperoxidase promotes tube formation, triggers Erk1/2 and Akt pathways and is expressed endogenously in endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 2018;654:55–69. DOI: 10.1016/j.abb.2018.07.011.
 35. Zhang Y., Zhang J., Sheng H. et al. Acute phase reactant serum amyloid A in inflammation and other diseases. *Adv Clin Chem* 2019;90:25–80. DOI: 10.1016/bs.acc.2019.01.002.
 36. Lin H.Y., Tan G.Q., Liu Y., Lin S.Q. The prognostic value of serum amyloid A in solid tumors: a meta-analysis. *Cancer Cell Int* 2019;19:62. DOI: 10.1186/s12935-019-0783-4. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6425599>.
 37. Hoeflich A., Pintar J., Forbes B. Editorial: Current Perspectives on Insulin-Like Growth Factor Binding Protein (IGFBP) research. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9:667. DOI: 10.3389/fendo.2018.00667.
 38. Yang B., Zhang L., Cao Y. et al. Overexpression of lncRNA IGFBP4-1 reprograms energy metabolism to promote lung cancer progression. *Mol Cancer* 2017; 16(1):154. DOI: 10.1186/s12943-017-0722-8.
 39. Sato H., Sakaeda M., Ishii J. et al. Insulin-like growth factor binding protein-4 gene silencing in lung adenocarcinomas. *Pathol Int* 2011;61(1):19–27. DOI: 10.1111/j.1440-1827.2010.02612.x.
 40. Leto G., Crescimanno M., Flandina C. On the role of cystatin C in cancer progression. *Life Sci* 2018;202:152–60. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.04.013.
 41. Kos J., Stabuc B., Cimerman N., Brünner N. Serum cystatin C, a new marker of glomerular filtration rate, is increased during malignant progression. *Clin Chem* 1998;44(12):2556–7.
 42. Završnik J., Butinar M., Prebenda M.T. et al. Cystatin C deficiency suppresses tumor growth in a breast cancer model through decreased proliferation of tumor cells. *Oncotarget* 2017;8(43):73793–809. DOI: 10.18632/oncotarget.17379.

Вклад авторов

Е.В. Каюкова: анализ полученных данных, написание текста статьи;
Т.Е. Белокриницкая: обзор публикаций по теме статьи;
Л.Ф. Шолохов: разработка дизайна исследования;
П.П. Терешков: выполнение лабораторной части исследования.

Authors' contributions

E.V. Kayukova: analysis of the obtained data, article writing;
T.E. Belokrinitskaya: reviewing of publications of the article's theme;
L.F. Sholokhov: developing the research design;
P.P. Tereshkov: laboratory part of the study.

ORCID авторов/ORCID of authors

Е.В. Каюкова/E.V. Kayukova: <https://orcid.org/0000-0001-5231-9273>
Т.Е. Белокриницкая/T.E. Belokrinitskaya: <https://orcid.org/0000-0002-5447-4223>
Л.Ф. Шолохов/L.F. Sholokhov: <https://orcid.org/0000-0003-3588-6545>
П.П. Терешков/P.P. Tereshkov: <https://orcid.org/0000-0002-8601-3499>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-6143.2018.7 (соглашение № 075-02-2018-547).

Financing. The study was supported by the grant from the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists МК-6143.2018.7 (agreement No. 075-02-2018-547).

Информированное согласие. Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

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

Статья поступила: 21.08.2019. **Принята в печать:** 26.09.2019.

Article received: 21.08.2019. **Accepted for publication:** 26.09.2019.

Исследование экспрессии цитокинов при подкожной имплантации онкогенных и неонкогенных миллипоровых фильтров

Е. Ю. Рыбалкина, О. Ю. Сусова, Т. Г. Мойжесс

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

Контакты: Екатерина Юрьевна Рыбалкина Kate_Rybalкина@mail.ru

Введение. Выяснение механизмов канцерогенеза, индуцируемого инородными телами, — одна из актуальных проблем современной онкологии. Это обусловлено тем, что есть взаимосвязь между процессами воспаления и канцерогенеза. Сегодня уже не вызывает сомнений факт, что цитокины и сигнальные молекулы в очаге воспаления (продукты воспаления) могут способствовать инициации канцерогенеза, а также стимулировать опухолевую прогрессию. В случае канцерогенеза, индуцированного инородными телами, ключевым вопросом является понимание различий в реакции организма на имплантацию инородных тел, способных вызывать образование опухоли и не обладающих этой способностью. Феномен данного вида канцерогенеза заключается в возникновении сарком при подкожной имплантации мышам гидрофильных миллипоровых фильтров с диаметром пор, не превышающим 0,1 мкм, и неспособности индуцировать опухоли фильтров с диаметром пор, превышающим или равным 0,22 мкм.

Цель исследования — изучение различий между опухолеродными и неопухолеродными фильтрами на молекулярном уровне.

Материалы и методы. Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени оценивали экспрессию генов различных цитокинов — продуктов клеток макрофагального происхождения, обитающих на поверхности имплантированных фильтров и в окружающей их капсуле. Сравнивали фильтры с диаметрами пор 0,025 мкм (канцерогенные) и 0,45 мкм (неканцерогенные) на сроках 8, 35 и 160 сут (5,5 мес) с момента имплантации.

Результаты и заключение. Через 8 сут мы получили достоверное ($p < 0,01$) превышение экспрессии гена цитокина интерлейкина 1 β (IL-1 β) клетками вокруг канцерогенных фильтров с порами 0,025 мкм по сравнению с неканцерогенными фильтрами с порами 0,45 мкм.

Через 35 дней показано достоверное ($p < 0,01$) превышение экспрессии IL-1 β , Tnf- α (фактора некроза опухоли α), iNOS (индуцируемой синтазы оксида азота) и IL-6 клетками вокруг фильтров 0,025 мкм по сравнению с 0,45 мкм. Количественной разницы в экспрессии Nf- κ B1 и Nf- κ B2 (транскрипционного фактора κ -B1 и κ -B2), Tgf- β (трансформирующего фактора роста β) и IL-10 не обнаружено.

Через 5,5 мес превышение экспрессии IL-1 β клетками на 0,025-фильтрах по-прежнему значимо. Для генов Tnf- α , iNOS, IL-6 и IL-10 разницы в экспрессии практически нет; для генов Nf- κ B1 и Nf- κ B2 и Tgf- β и COX-2 (циклооксигеназы 2) разница значима, при этом экспрессия этих генов была в клетках на неонкогенных фильтрах (0,45 мкм) выше, чем на онкогенных (0,025 мкм).

Ключевые слова: имплантированный миллипоровый фильтр, цитокин, саркома

Для цитирования: Рыбалкина Е. Ю., Сусова О. Ю., Мойжесс Т. Г. Исследование экспрессии цитокинов при подкожной имплантации онкогенных и неонкогенных миллипоровых фильтров. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(3):57–62.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-3-57-62

Differences in the profile of cytokine expression induced by implantation of oncogenic and non-oncogenic millipore filters

E. Yu. Rybalkina, O. Yu. Susova, T. G. Moizhess

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

Background. Clarification of the mechanisms of carcinogenesis induced by foreign bodies is one of the urgent problems of modern oncology. This is due to the fact that there is a relationship between the processes of inflammation and carcinogenesis. Today, there is no doubt the fact that cytokines and signal molecules in the focus of inflammation (products of inflammation) can contribute to the initiation of carcinogenesis, as well as stimulate tumor progression. In the case of carcinogenesis induced by foreign bodies, the key issue is understanding the differences in the body's response to the implantation of foreign bodies that can cause tumor formation and do not have this ability. One of the phenomena of this type of carcinogenesis is the occurrence of sarcoma after the subcutaneous implantation in mice of hydrophilic millipore filters with a pore diameter not exceeding 0.1 μ m and the inability to induce tumors of one's with a pore diameter greater than or equal to 0.22 μ m.

The objective of our work was to study the differences between oncogenic and non-oncogenic filters at the molecular level.

Materials and methods. Reverse transcription polymerase chain reaction method was used to study the expression of a number of cytokines that are products of macrophage cells that live on the surface of implanted filters and in the surrounding capsule. Filters with pore diameters of 0.025 μ m (carcinogenic) and 0.45 μ m (non-carcinogenic) were compared in 8, 35 days and 5.5 months after implantation.

Results and conclusion. After 8 days we observed significant ($p < 0.01$) excess of expression of two cytokines interleukin 1β ($IL-1\beta$) by cells around oncogenic filters (with pore of $0.025 \mu\text{m}$) compared to non-oncogenic one's (with pore of $0.45 \mu\text{m}$) After 35 days, significant ($p < 0.01$) excess of expression of $IL-1\beta$, $Tnf-\alpha$, iNOS (induced nitric oxide synthase), and $IL-6$ by cells around the oncogenic filters ($0.025 \mu\text{m}$) compared to non-oncogenic one's ($0.45 \mu\text{m}$) was observed. There was no quantitative difference in the expression of $Nf-\kappa B1$ and $Nf-\kappa B2$ (nuclear factor $\kappa-B1$, $\kappa-B2$), $Tgf-\beta$ (transforming growth factor β), $IL-10$. After 5.5 months the expression of $IL-1\beta$ by cells on oncogenic filters was still significant; for $Tnf-\alpha$, iNOS, $IL-6$ and $IL-10$ there was no practically difference in expression. For $Nf-\kappa B1$ and $Nf-\kappa B2$, $Tgf-\beta$ and $COX-2$ (cyclooxygenase 2) the difference was significant, cells on non-oncogenic filters are expressed more then on oncogenic one's.

Key words: implantation of millipore filter, cytokine, sarcoma

For citation: Rybalkina E. Yu., Susova O. Yu., Moizhess T. G. Differences in the profile of cytokine expression induced by implantation of oncogenic and non-oncogenic millipore filters. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(3):57–62.

Введение

Старая, но не решенная до конца проблема канцерогенеза, индуцируемого имплантацией инородных тел, вновь приобретает актуальность, а внимание исследователей все более привлекают вопросы воспаления, являющегося причиной индукции злокачественных опухолей. Моделью канцерогенеза, индуцированного инородным телом, служит обычно подкожная имплантация пластинок из различных пластмасс мышам или крысам. Длительный срок (>12 мес) пребывания пластинки под кожей животного часто приводит к образованию сарком, берущих начало из клеток соединительно-тканной капсулы вокруг импланта [1].

Одним из феноменов данного вида канцерогенеза является возникновение сарком при подкожной имплантации мышам гидрофильных нитроцеллюлозных миллипоровых фильтров. При имплантации таких фильтров мышам было обнаружено, что их канцерогенность сильно зависит от размера пор [2]. В частности, имплантация фильтров с порами $\geq 0,22 \mu\text{m}$ не вызывала опухолей (неканцерогенные фильтры), а при размере пор $\leq 0,1 \mu\text{m}$ опухоли всегда возникали в большом количестве (канцерогенные фильтры). В той же работе было показано, что основным типом клеток на поверхности и вокруг всех видов фильтров были клетки макрофагального типа. Кроме этого, отмечено, что поры неканцерогенных фильтров в отличие от канцерогенных были пронизаны тонкими цитоплазматическими отростками. Преобладание макрофагов вокруг имплантатов заставило заподозрить, что именно эти клетки играют ключевую роль в данном виде канцерогенеза. В настоящее время много внимания уделяется взаимосвязи реакции воспаления (где ведущая роль принадлежит макрофагам) с канцерогенезом, а также роли провоспалительных цитокинов в инициации опухолевых клеток [3–5].

Цель исследования — выяснить, имеются ли различия в экспрессии цитокинов клетками, заселившимися опухолеродные и неопухолеродные фильтры.

Материалы и методы

Имплантация фильтров. Трехмесячным мышам, самкам линии BALb/c, под кожу спины имплантировали под эфирным наркозом гидрофильные целлюлозные

миллипоровые фильтры (Millipore corporation, США) диаметром 2 см с порами 0,45 и 0,025 мкм на срок 8, 35 и 160 сут. По достижении срока планируемого забоя мышей умерщвляли с применением цервикальной дислокации. Подрежая со всех сторон соединительную ткань, фильтры извлекали вместе с капсулой. Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени исследовали экспрессию ряда цитокинов в клетках на поверхности фильтров.

Выделение РНК из ткани. Извлеченный из мыши фильтр вместе с окружающей капсулой быстро измельчали и помещали в 2–3 мл Trizol-Reagent (Invitrogen, США). Тотальную РНК выделяли по протоколу производителя. Качество выделенной РНК проверяли с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле, содержащем 0,01 % бромистого этидия. Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoVue Plus (GE Healthcare, США).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реагентов ОТ-1 (Синтол, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили с помощью набора реагентов компании «Синтол» (Кат. № R412) с интеркалирующим флуоресцентным агентом EvaGreen (Синтол, Россия) в соответствии с протоколом производителя. На 1 реакцию брали 50 нг комплементарной ДНК. Реакцию ставили в амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Шаги амплификации: $95^\circ\text{C} - 5 \text{ мин}; (95^\circ\text{C} - 13 \text{ с}, 60^\circ\text{C} - 20 \text{ с}, 72^\circ\text{C} - 15 \text{ с}) \times 39$.

Нормализацию результатов проводили по экспрессии гена $\beta\text{-actin}$. Уровень экспрессии генов оценивался по значению $R = 2^{\Delta Ct}$. Последовательности пар праймеров представлены в табл. 1.

Статистический анализ. Для определения достоверности различий экспрессии цитокинов клетками на фильтрах с разными порами пользовались критерием Манна–Уитни. Брали 8–12 мышей на каждую точку.

Результаты и обсуждение

Через 8 сут после имплантации мы получили достоверное ($p < 0,01$) превышение экспрессии цитокина интерлейкина 1β ($IL-1\beta$) клетками вокруг опухолеродных фильтров (рис. 1).

Таблица 1. Праймеры, использованные для оценки экспрессии генов

Table 1. Primers used for evaluation of gene expression

Название гена Gene name	Последовательность Sequence	Длина фрагмента Fragment length	Статьи, в которых опубликованы праймеры Reference to publication on the primer
<i>β-actin</i>	For: 5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3' Rev: 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'	154	[6]
<i>iNOS</i>	For: 5'-GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA-3' Rev: 5'-GTGGACGGGTGCATGTCAC-3'	127	[6]
<i>COX-2</i>	For: 5'-TTCCAATCCATGTCAAAACCGT-3' Rev: 5'-AGTCCGGGTACAGTCACACTT-3'	75	[6]
<i>IL-1β</i>	For: 5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3' Rev: 5'-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3'	116	[6]
<i>Nf-κB1</i>	For: 5'-TTTTTCGACTACGCAGTGACG-3' Rev: 5'-GTCCAGAAGGCTCAGGTCAG-3'	290	[7]
<i>Nf-κB2</i>	For: 5'-GCAGATAGCCACGTCATTT-3' Rev: 5'-CAGGCATGTGCAATATTTGG-3'	275	[7]
<i>Tnf-α</i>	For: 5'-GGCCAACGGCATGGATCTCAA-3' Rev: 5'-TGTGGGTGAGGAGCACGTAGT-3'	121	[8]
<i>Tgf-β</i>	For: 5'-GCTGGTGAAACGGAAGCGCA-3' Rev: 5'-AGATGGCGTTGTTGCGGTCCA-3'	244	[8]
<i>IL-6</i>	For: 5'-TGATGCTGGTGACAACCAGGC-3' Rev: 5'-AGCCTCCGACTTGTGAAGTGGTA-3'	131	[8]
<i>IL-10</i>	For: 5'-TGCTCCTAGAGCTGCGGACT-3' Rev: 5'-TTCTGGGCCATGCTTCTCTGCC-3'	193	[8]

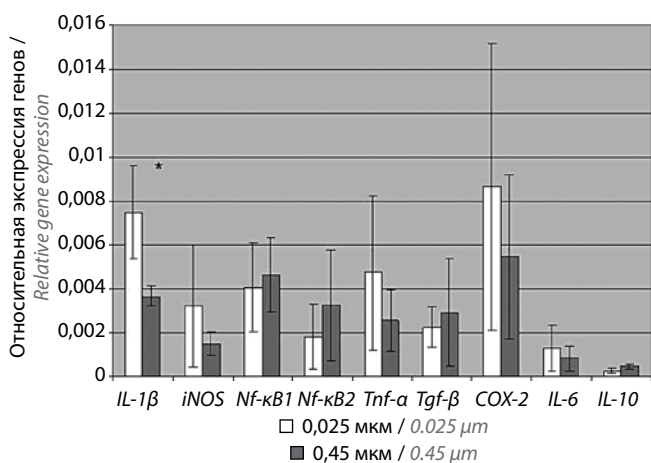


Рис. 1. Экспрессия цитокинов клетками комплекса «фильтр–капсула» через 8 суток после имплантации миллипорных фильтров с разными размерами пор (по 8 фильтров для каждого размера пор). Здесь и на рис. 2, 3 звездочкой помечены значения, для которых показаны достоверные различия по критерию Манна–Уитни ($p < 0,01$)

Fig. 1. Cytokine expression by cells of the “filter–capsule” complex 8 days after implantation of millipore filters with varying pore sizes (8 filters per every pore size). *Here and in Fig. 2, 3: values with significant differences per the Mann–Whitney test ($p < 0.01$)

Через 35 суток нахождения имплантатов под кожей мышей наблюдали значимое превышение экспрессии

генов нескольких цитокинов клетками, заселившими опухолеродные фильтры, по сравнению с неопухолеродными: превышение экспрессии касается 4 провоспалительных цитокинов – *Tnf-α* (фактора некроза опухоли α) в 2,2 раза, *IL-1β* в 9 раз, *IL-6* в 3 раза, а также *iNOS* (индуцируемой синтазы оксида азота) в 3 раза.

На сроке 160 суток превышение уровня экспрессии *IL-1β* клетками на фильтрах 0,025 мкм по-прежнему значимо, для остальных провоспалительных цитокинов – утрачено (рис. 3).

Полученные в наших опытах результаты согласуются с гипотезой, по которой саркомы в месте имплантации инородного тела могут быть инициированы воздействием продуктов, образующихся в очаге воспаления в острой фазе, когда при участии макрофагов происходит активное образование свободных радикалов кислорода и оксида азота (NO), которые оказывают цитотоксическое и мутагенное действие на клетки, вызывая их инициацию и в дальнейшем развитие опухолей [9–11]. Основным источником активных форм кислорода при воспалении является НАДФН-оксидаза (NOX). Имеются исследования, в которых показана взаимная регуляция активности ключевых ферментов НАДФН-оксидазы и *IL-1β* в макрофагах и хондроцитах [12, 13].

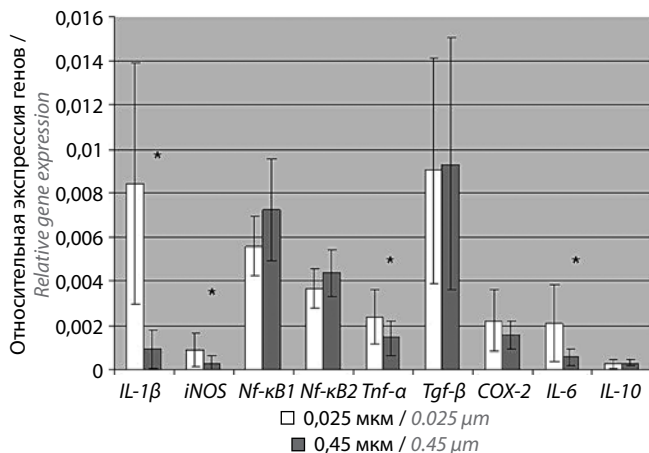


Рис. 2. Экспрессия цитокинов клетками комплекса «фильтр–капсула» через 35 сут после имплантации миллипоровых фильтров с разными размерами пор (11 фильтров 0,45 мкм и 12 фильтров 0,025 мкм)
Fig. 2. Cytokine expression by cells of the “filter–capsule” complex 35 days after implantation of millipore filters with varying pore sizes (11 filters with 0.45 μm pores and 12 filters with 0.025 μm pores)

Аналогичного образования активного кислорода можно ожидать и в случае превышения экспрессии iNOS клетками вокруг фильтров 0,025 мкм на сроке 35 сут.

Цитокины IL-1β и IL-6 считаются главными медиаторами воспаления, влияющими на ключевые параметры онкогенного процесса [3]. Эти цитокины участвуют в регуляции многих сигнальных путей, в том числе JAK/STAT3, CREB и C/EBPβ, и индуцируют экспрессию c-Мус [14–16].

Таким образом, в наших опытах онкогенные фильтры с диаметром пор 0,025 мкм показали достоверное превышение экспрессии *IL-1β* по сравнению с фильтрами неонкогенными во всех временных точках эксперимента. Предшествующие опыты показали, что уже через 1,5–3,5 мес после имплантации инициированные клетки присутствуют в капсуле вокруг инородного тела и развиваются в опухоли спустя определенный латентный период при замене канцерогенного инородного тела на неканцерогенное (в том числе это может быть миллипоровый фильтр 0,45 мкм), которое оказывается промотором [17]. Из этого следует, что для инициации опухоли не требуется длительного временного периода. Определение значения разницы в экспрессии других цитокинов в наших экспериментах требует дополнительного изучения.

В 1997 г. М.М. Iomhair и S.M. Lavelle показали, что увеличение площади имплантируемых миллипоровых неканцерогенных фильтров с порами 0,45 мкм в 2 и 3 раза (имплантировались двойные и тройные фильтры) приводит к образованию опухолей в достаточно большом количестве (7/30 и 16/30 соответственно) [18]. С учетом наших данных возможна следующая интерпретация этой работы. Можно допустить, что при увеличении площади имплантированных фильтров соответственно увеличивается количество заселяющих их макрофагов. Это, по-видимому, означает соответствующее увеличение дозы экспрессируемых этими клет-

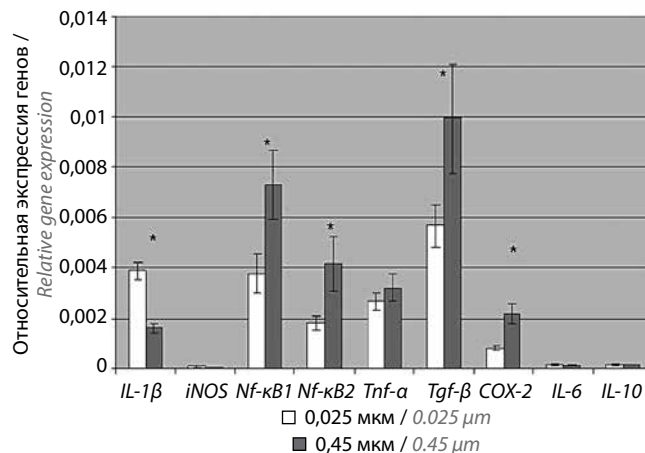


Рис. 3. Экспрессия цитокинов клетками комплекса «фильтр–капсула» через 160 сут после имплантации миллипоровых фильтров с разными размерами пор (7 фильтров 0,45 мкм и 8 фильтров 0,025 мкм)
Fig. 3. Cytokine expression by cells of the “filter–capsule” complex 160 days after implantation of millipore filters with varying pore sizes (7 filters with 0.45 μm pores and 8 filters with 0.025 μm pores)

ками цитокинов по крайней мере до уровня одинарных канцерогенных фильтров с порами 0,025 мкм в наших опытах. В связи с этим можно предположить важность уровня экспрессии цитокинов для развития опухолей.

Относительно неканцерогенных фильтров с порами 0,45 мкм интересно отметить, что для генов *Nf-κB1*, *Nf-κB2*, *Tgf-β*, *COX-2* (циклооксигеназа 2) на сроке 160 дней наблюдается обратная зависимость: эти молекулы экспрессируются значительно сильнее клетками вокруг фильтров с порами 0,45 мкм по сравнению с 0,025 мкм (табл. 2, см. рис. 3). Этот факт, возможно, имеет отношение к промоторным свойствам неканцерогенного фильтра.

Nf-κB играет важную роль в патогенезе и прогрессии злокачественных опухолей. Другие белки этого семейства могут иметь отличные свойства. Nf-κB2 принимает участие в развитии колита, который потенциально, вероятно, может переродиться в колитассоциированный рак. Мыши *Nf-κB2*–/– устойчивы к раку, связанному с колитом; развитие колита сопровождается меньшим числом полипов по сравнению с мышами дикого типа [19]. Есть данные, которые показывают, что отдельные белки этого семейства имеют супрессорные свойства, – так, Nf-κB1 прямо супрессирует воспаление и рак. Показано, что мыши *Nf-κB1*–/– *in vivo* проявляют повышенную степень воспаления и чувствительность к некоторым формам повреждения ДНК, приводящим к раку [20]. Возможно, что повышенная экспрессия этого гена клетками на неонкогенных фильтрах защищает клетки от трансформации.

Tgf-β – многофункциональный регуляторный полипептид. Известно, что он может служить как опухолевым супрессором, так и проонкогенным фактором [21, 22].

COX-2 – фермент, участвующий в образовании простагландинов из арахидоновой кислоты. К настоящему времени накоплено достаточно данных о вовлеченности его в процесс канцерогенеза [23]. Показано

Таблица 2. Различия в экспрессии цитокинов на канцерогенных и неканцерогенных фильтрах при имплантации под кожу мышам**Table 2.** Differences in cytokine expression on cancerogenic and non-cancerogenic filters after subcutaneous implantation in mice

Время нахождения фильтров под кожей, сут Time of filters being under skin, days	<i>IL-1β</i>	<i>iNOS</i>	<i>Tnf-α</i>	<i>Nf-κB1</i>	<i>Nf-κB2</i>	<i>Tgf-β</i>	<i>COX-2</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-10</i>
8	+	–	+ / –	–	–	–	–	–	–
35	+	+	+	–	–	–	–	+	–
160	+	–	–	*	*	*	*	–	–

*Значимая разница, где экспрессия на фильтре 0,45 мкм превышает экспрессию на фильтре 0,025 мкм; (+) – значимая разница, где экспрессия на фильтре 0,025 мкм превышает экспрессию на фильтрах 0,45 мкм; (–) – нет значимых различий.

*Significant difference with expression on the 0.45 μ m filter being higher than on the 0.025 μ m filter; (+) – significant difference with expression on the 0.025 μ m filter is higher than on the 0.45 μ m filter; (–) – no significant difference.

Примечание. Для определения достоверности различий экспрессии цитокинов между клетками на фильтрах пользовались автоматическим расчетом U-критерия Манна–Уитни.

Note. Significance of differences in cytokine expression in cells on filters was determined using automatic calculation of the Mann–Whitney U test.

защитное действие ингибиторов COX-2 в колитассоциированном опухолегенезе и при ряде других локализаций [24].

Заключение

Мы полагаем, что эффект различной экспрессии цитокинов, индуцированной разными фильтрами, связан в наших экспериментах с размерами пор имплантированных нитроцеллюлозных фильтров, с которыми взаимодействуют и на которые реагируют макрофагальные клетки. От свойств имплантированного материала зависит уровень экспрессии продуктов. Сходная картина наблюдалась в работе W.G. Brodbeck и соавт.,

где показаны различия в уровнях экспрессии ряда цитокинов лейкоцитами на поверхности имплантов различного качества [25]. Импланты из одного и того же биоматериала различались только модифицированными поверхностями (гидрофильные, гидрофобные, анионные и катионные). В нашем случае возможность или невозможность образования клетками отростков, инвазирующих поры фильтра, может влиять на уровень экспрессии цитокинов.

Таким образом, мы имеем дело с 2 видами хронического воспаления разного свойства: злокачественного и доброкачественного, механизмы которых нуждаются в дальнейшем изучении.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Мойжесс Т.Г. О канцерогенезе, индуцируемом инородными телами. Биохимия 2008;73(7):949–63. [Moizhess T.G. Carcinogenesis induced by foreign bodies. Biokhimiya = Biochemistry 2008;73(7): 949–63. (In Russ.)].
2. Karp R.D., Johnson K.H., Buoen L.C. et al. Tumorigenesis by Millipore filters in mice: histology and ultrastructure of tissue reactions as related to pore size. J Natl Cancer Ins 1973;51(4):1275–85. DOI: 10.1093/jnci/51.4.1275.
3. Дмитриева О.С., Шиловский И.П., Хайтов М.Р., Гривенников С.И. Интерлейкин 1 и интерлейкин 6 как главные медиаторы воспаления при развитии рака. Биохимия 2016;2:166–78. [Dmitrieva O.S., Shilovskiy I.P., Khaitov M.R. et al. Interleukins 1 and 6 as main mediators of inflammation and cancer. Biokhimiya = Biochemistry 2016;2:166–78. (In Russ.)].
4. Grivennikov S., Karin M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. Curr Opin Genet Dev 2010;20(1):65–71. DOI: 10.1016/j.gde.2009.11.004.
5. Korneev R.V., Atretkhany K.N., Drutskaya M.S. et al. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. Cytokine 2017;89:127–35. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.01.021.
6. Wei J., Zhang X., Bi Y. et al. Anti-inflammatory effects of cumin essential oil by blocking JNK, ERK, and NF- κ B signaling pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Evid Based Complement Alternat Med 2015;2015:474509. DOI: 10.1155/2015/474509.
7. Dvorianchikova G., Ivanov D. Tumor necrosis factor- α mediates activation of NF- κ B and JNK signaling cascades in retinal ganglion cells and astrocytes in opposite ways. Eur J Neurosci 2014;40:3171–8. DOI: 10.1111/ejn.12710.
8. Cao W., Chen W., Liang X. et al. All-trans-retinoic acid ameliorates the inflammation by inducing transforming growth factor beta 1 and interleukin 10 in mouse epidermitis. Am J Reprod Immunol 2014;(4): 312–21. DOI: 10.1111/aji.12197.
9. Grisham M.B., Jourdeuil D., Wink D.A. Review article: chronic inflammation and reactive oxygen and nitrogen metabolism – implications in DNA damage and mutagenesis. Aliment Pharmacol Ther 2000;14(Suppl 1):3–9. DOI: 10.1046/j.1365-2036.2000.014s1003.x.
10. Kawanishi S., Ohnishi S., Ma N. et al. Crosstalk between DNA damage and inflammation in the multiple steps of carcinogenesis. Int J Mol Sci 2017;18(8). DOI: 10.3390/ijms18081808.
11. Ohnishi S., Ma N., Thanan R. et al. DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells. Oxid Med Cell Longev 2013;2013:387014. DOI: 10.1155/2013/387014.
12. Hsieh L.T., Frey H., Nastase M.V. et al. Bimodal role of NADPH oxidases in the regulation of biglycan-triggered IL-1 β synthesis. Matrix Biol 2016;49:61–81. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.12.005.

13. Rousset F, Hazane-Puch F, Pinoso C. et al. IL-1beta mediates MMP secretion and IL-1beta neosynthesis via upregulation of p22(phox) and NOX4 activity in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2015;23(11):1972–80. DOI: 10.1016/j.joca.2015.02.167.
14. Resende C., Regalo G., Durães C., et al. Interleukin-1B signalling leads to increased survival of gastric carcinoma cells through a CREB-C/EBPβ-associated mechanism. *Gastric Cancer* 2016;19(1):74–84. DOI: 10.1007/s10120-014-0448-x.
15. Lemos D.R., McMurdo M., Karaca G. et al. Interleukin-1β activates a myc-dependent metabolic switch in kidney stromal cells necessary for progressive tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2018;29(6):1690–705. DOI: 10.1681/ASN.2017121283.
16. Subramaniam K.S., Omar I.S., Kwong S.C. et al. Cancer-associated fibroblasts promote endometrial cancer growth via activation of interleukin-6/STAT-3/c-Myc pathway. *Am J Cancer Res* 2016;6(2):200–13.
17. Moizhess T.G., Vasiliev J.M. Early and late stages of foreign-body carcinogenesis can be induced by implants of different shapes. *Int J Cancer* 1989;44(3):449–53. DOI: 10.1002/ijc.2910440312.
18. Iomhair M.M., Lavelle S.M. Effect of film size on production of foreign body sarcoma by perforated film implants. *Technol Health Care* 1997;5(4):331–4.
19. Burkitt M.D., Hanedi A.F., Duckworth C.A. et al. NF-κB1, NF-κB2 and c-Rel differentially regulate susceptibility to colitis-associated adenoma development in C57BL/6 mice. *J Pathol* 2015;236(3):326–36. DOI: 10.1002/path.4527.
20. Cartwright T., Perkins N.D., Wilson C.L. NFκB1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer. *FEBS J* 2016;283(10):1812–22. DOI: 10.1111/febs.13627.
21. Hong S., Lee H.J., Kim S.J., Hahm K.B. Connection between inflammation and carcinogenesis in gastrointestinal tract: focus on TGF-beta signaling. *World J Gastroenterol* 2010;16(17):2080–93.
22. Huang J.J., Blobe G.C. Dichotomous roles of TGF-β in human cancer. *Biochem Soc Trans* 2016;44(5):1441–54. DOI: 10.1042/BST20160065.
23. Telliez A., Furman C., Pommery N., Hénichart J.P. Mechanisms leading to COX-2 expression and COX-2 induced tumorigenesis: topical therapeutic strategies targeting COX-2 expression and activity. *Anticancer Agents Med Chem* 2006;6(3):187–208.
24. Carullo G., Galligano F., Aiello F. Structure-activity relationships for the synthesis of selective cyclooxygenase 2 inhibitors: an overview (2009–2016). *Medchemcomm* 2016;8(3):492–500. DOI: 10.1039/c6md00569a.
25. Brodbeck W.G., Voskerician G., Ziats N. et al. *In vivo* leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry. *J Biomed Mater Res A* 2003;64(2):320–9. DOI: 10.1002/jbm.a.10425.

Вклад авторов

Е.Ю. Рыбалкина: получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 О.Ю. Сусова: получение данных для анализа;
 Т.Г. Мойжес: разработка дизайна исследования, проведение подкожной имплантации на мышцах, написание текста рукописи.

Authors' contributions

E.Yu. Rybalkina: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing;
 O.Yu. Susova: obtaining data for analysis;
 T.G. Moizhess: developing the research design, subcutaneous implantation in mice, article writing.

ORCID авторов/ORCID of authors

Е.Ю. Рыбалкина/E.Yu. Rybalkina: <https://orcid.org/0000-0002-3068-0233>
 О.Ю. Сусова/O.Yu. Susova: <https://orcid.org/0000-0001-8192-7913>

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 фонда фундаментальных исследований (грант № 18-54-16006).
 Financing. The reported research was funded by Russian Foundation for Basic Research (grant No. 18-54-16006).

Соблюдение правил биоэтики. 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 was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 10.06.2019. Принята к публикации: 17.09.2019.

Article received: 10.06.2019. Accepted for publication: 17.09.2019.

Эпидемиологический мониторинг онкологического риска у работников онкологического центра

Л. Г. Соленова

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

Контакты: Лия Геннадьевна Соленова lsolenova@mail.ru

По результатам мониторинга злокачественных новообразований (ЗНО) в контингенте сотрудников крупного онкологического центра проведено исследование онкологического риска методом «случай–контроль» внутри когорты. В когорте численностью 7269 человек, прослеженной по его канцер-регистру, выявлены 484 человека (139 мужчин и 345 женщин) с диагнозом ЗНО. К заболевшему лицу случайным способом было подобрано контрольное лицо по полу, году рождения из числа сотрудников, у которых отсутствовал диагноз ЗНО на 1 января 2019 г. Статистически незначимое повышение общего онкологического риска отмечено у мужского операционного персонала (отношение шансов (ОШ) 1,14; 95 % доверительный интервал (ДИ) 0,64–2,05) и в группе других врачей-клиницистов (ОШ 1,36; 95 % ДИ 0,68–2,73). В объединенной группе мужчин-клиницистов и экспериментаторов выявлено 4 случая рака щитовидной железы при отсутствии лиц этой группы в контроле. У них также отмечено незначимое повышение риска гемобластозов, опухолей кожи, головного мозга. У женщин повышение риска ЗНО наблюдалось в группах операционного (ОШ 1,28; 95 % ДИ 0,58–2,87) и среднего (ОШ 1,21; 95 % ДИ 0,85–1,72) медицинского персонала, а также у работниц экспериментальных научных подразделений (ОШ 1,31; 95 % ДИ 0,90–1,92). Незначимое повышение риска рака молочной железы отмечалось у женщин-клиницистов и экспериментаторов, экспонированных к действию производственных факторов. У работниц экспериментальных научных подразделений выявлено статистически значимое повышение риска ЗНО органов пищеварения (ОШ 2,95; 95 % ДИ 1,14–7,67) и гемобластозов (ОШ 5,71; 95 % ДИ 1,05–31,07). Результаты исследования показали необходимость эпидемиологического мониторинга и накопления данных по онкологическому риску в различных группах работников-онкологов.

Ключевые слова: злокачественное новообразование, мониторинг, онколог, профессиональная группа, онкологический риск

Для цитирования: Соленова Л. Г. Эпидемиологический мониторинг онкологического риска у работников онкологического центра. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(3):63–70.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-3-63-70

Epidemiological monitoring of cancer risk in cancer center workers

L. G. Solenova

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

Based on the results of cancer monitoring in the staff of a large Cancer Center cancer risk research was performed using the method of nested “case–control” study within a cohort. The cohort comprised 7269 persons who were followed up through the cancer-register of the Cancer Center. Four hundred eighty-four (139 male and 345 female) cancer cases were revealed. For every case a control individual of the same sex and age was randomly selected from the staff who had no cancer as of January 1, 2019. A statistically insignificant increase in the overall cancer risk was observed in male operational staff (odds ratio (OR) being 1.14, 95 % confidence interval (CI) 0.64–2.05) and other doctors-clinicians (OR 1.36; 95 % CI 0.68–2.73). In a combined group of male clinicians and experimenters 4 cases of thyroid cancer were revealed and no members of this group were present in controls. An insignificantly increased risk of hemoblastoses, skin and brain cancer were also observed in this group. In the female staff an insignificantly increased risk of all cancer sites combined was recorded in operational group (OR 1.28; 95 % CI 0.58–2.87) and nurses (OR 1.21; 95 % CI 0.85–1.72), as well as in the female staff of experimental scientific units (OR 1.31; 95 % CI 0.90–1.92). An insignificant increase in breast cancer risk was observed in women clinicians and experimenters, exposed to the occupational factors. Female employees of experimental scientific units demonstrated a statistically significant increased risk of digestive organs cancer (OR 2.95; 95 % CI 1.14–7.67) and hemoblastoses (OR 5.71; 95 % CI 1.05–31.07). The results of the study demonstrate the need for epidemiological monitoring and data accumulation on cancer risk in different groups of medical workers.

Key words: malignancie, monitoring, oncologist, occupational group, cancer risk

For citation: Solenova L. G. Epidemiological monitoring of cancer risk in cancer center workers. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2019;6(3):63–70.

В России численность врачей в 2017 г. составила 548414, среднего медицинского персонала — 1266181 человек [1, 2]. Многочисленные контингенты работников, занятых в сфере здравоохранения, могут подвергаться воздействию вредных факторов различной природы, так как больничная среда больше, чем любая другая производственная среда, характеризуется широким набором физических, химических и биологических факторов, опасных для человека. В полной мере это относится к медицинским учреждениям онкологического профиля, в лечебном арсенале которых радиологические методы и химиотерапевтические средства, обладающие доказанными канцерогенными для человека свойствами, действие которых сочетается с высокими психоэмоциональными нагрузками. Воздействие факторов различной природы, действующих в комплексе, может повышать онкологический риск у медицинских работников, о чем свидетельствуют данные, полученные в широкомасштабных зарубежных эпидемиологических исследованиях медицинских работников [3, 4]. Актуальность отечественных эпидемиологических исследований медицинских работников не подлежит сомнению. Анализ профессиональной заболеваемости в России за 2002–2014 гг. (13 лет), проведенный по материалам Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора группой профилактики канцерогенных воздействий НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, выявил только 3 случая профессиональных злокачественных новообразований (ЗНО) у медицинских работников среди 497 случаев, зарегистрированных за этот период. Принимая во внимание весь спектр неблагоприятных производственных воздействий, влияющих на состояние здоровья работников, нельзя исключить недоучет случаев профессионального рака в этой профессиональной группе. Необходимо мониторинг онкологического риска в ней на постоянной основе, так как проецировать оценки, полученные в других странах, на производственные условия, имеющие место в отечественных онкологических учреждениях, неправомерно.

НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (онкоцентр) является научно-исследовательским и лечебным учреждением, в котором осуществляются все виды онкологической помощи больным со ЗНО, разрабатываются фундаментальные и прикладные аспекты проблемы канцерогенеза, синтезируются и изучаются противоопухолевые препараты. В нем представлены все профессиональные группы, работающие в области онкологии, что делает многочисленный контингент его сотрудников репрезентативным объектом для изучения онкологического риска в разных профессиональных группах лиц, работающих в учреждениях онкологического профиля. Работающие и уволившиеся сотрудники онкоцентра в случае возникновения у них ЗНО обычно проходят обследование и лечение в его клинике с внесением данных в канцер-регистр онкоцентра. В поликлинике онкоцентра амбулаторные карты

заболевших сотрудников хранятся отдельным массивом. Нахождение в одном учреждении верифицированных данных онкологической заболеваемости и профессиональной занятости большого контингента его сотрудников предоставляет уникальную возможность проведения исследования связей между ними.

Материалы и методы

Для выявления ЗНО среди работников онкоцентра их контингент дважды был прослежен по канцер-регистру, архиву клиники и картотеке поликлиники онкоцентра в 2005–2006 гг. и 2016–2018 гг. Первоначально в 2004 г. на основании текущей картотеки и архива отдела кадров онкоцентра была составлена база данных, включающая сведения о 5122 сотрудниках, работавших в 1985–2004 гг., в том числе о 1850 сотрудниках со стажем работы в онкоцентре не менее 5 лет, уволенных за этот период. В ходе прослеживания среди них было выявлено 193 сотрудника с диагнозом ЗНО (58 мужчин и 135 женщин).

Сопоставление списков сотрудников, работавших на 1 января 2005 г. и 1 января 2016 г., показало, что за период с 2005 по 2015 г. из числа работавших на 1 января 2004 г. уволились 1807 работников. Таким образом, на 2-м этапе исследования в контингент для прослеживания были включены 3612 работающих сотрудников и 3657 сотрудников, уволившихся за период 1985–2015 гг. Всего 7269 человек, которые рассматривались как когорты. Внутри нее было проведено исследование методом «случай–контроль».

В течение 2-го этапа прослеживания был выявлен 291 сотрудник с диагнозом ЗНО. Общая численность заболевших сотрудников, выявленных за оба этапа прослеживания, составила 484 человека (139 мужчин и 345 женщин). Число ЗНО составило 519 (150 у мужчин и 369 у женщин). У 35 человек были диагностированы 2 первично-множественные опухоли — 7,2 % всех сотрудников с диагнозом ЗНО. В исследование не были включены сотрудники, которым диагноз ЗНО был поставлен до поступления на работу в онкоцентр ($n = 17$).

На каждое лицо с диагнозом ЗНО заполнена индивидуальная карта, в которую включены следующие сведения: фамилия, имя, отчество, дата рождения, дата поступления на работу в онкоцентр, локализация ЗНО с указанием шифра по Международной классификации болезней 10-го пересмотра, дата постановки диагноза, номер амбулаторной карты или карты стационарного больного, возраст на момент постановки диагноза ЗНО, стаж работы в онкоцентре на момент постановки диагноза. Данные внесены в компьютер с использованием программы Excel.

Характер работы и производственных воздействий, которым подвергались лица, включенные в исследование (заболевшие ЗНО и контрольные), уточнялся по материалам санитарно-гигиенической паспортизации онкоцентра, проведенной в 2002 г., а также путем

опроса руководителей и сотрудников подразделений, в которых они работали.

На 1-м этапе исследования значимо повышенный онкологический риск был выявлен в группе операционного персонала (хирурги, анестезиологи, реаниматологи): у мужчин отношение шансов (ОШ) 3,4 (95 % доверительный интервал (ДИ) 1,5–7,8), у женщин – ОШ 3,1 (95 % ДИ 1,08–9,3). В группах сотрудников, работающих с противоопухолевыми препаратами, канцерогенами, гистологов, аптечных работников и др., повышение риска не достигало уровня статистической значимости. Производственная экспозиция в отдельных группах среднего медицинского персонала существенно различается, но расчет показателей ОШ в соответствии с характером производственных обязанностей и возможного вредного воздействия профессиональных факторов не выявил в них повышения общего онкологического риска. Он был или на уровне 1,0, или понижен [5]. С учетом этих данных на 2-м этапе исследования по характеру профессионального воздействия или должностных обязанностей среди лиц с диагнозом ЗНО были выделены следующие группы:

- операционный персонал (хирурги, анестезиологи, реаниматологи), подвергающийся воздействию анестетиков и дезинфицирующих веществ на фоне нервно-эмоционального напряжения;
- сотрудники, подвергающиеся воздействию ионизирующего излучения;
- врачи других специальностей;
- средний обслуживающий персонал: медицинские сестры, лаборанты клинических лабораторий;
- младший обслуживающий персонал клинических подразделений (санитарки, уборщицы);
- сотрудники научных подразделений, занимающиеся экспериментальными исследованиями;
- работники инженерно-технической службы (ИТС): водители, лифтеры, уборщики, слесари-ремонтники, слесари-сантехники и др.;
- административный персонал и другие лица (регистраторы, работники библиотеки и др.), не подвергающиеся воздействию вредных производственных факторов.

К заболевшему лицу случайным способом подбиралось контрольное лицо по полу, году рождения из числа сотрудников, у которых отсутствовал диагноз ЗНО или доброкачественного новообразования на 1 января 2019 г. Были рассчитаны показатели ОШ и их 95 % ДИ общего онкологического риска и риска отдельных локализаций ЗНО в выделенных профессиональных группах.

Результаты

Проведен анализ объединенных данных 1-го и 2-го этапов исследования. В нозологической структуре распространенности ЗНО у мужчин 1-е место занимают ЗНО органов пищеварения, среди которых лидирует рак толстой и прямой кишки (18 % всех ЗНО), далее

следуют рак предстательной железы (14 %), рак желудка (13 %), рак мочевыводящих путей (11 %), гемобласты (6 %). У женщин треть всех ЗНО составил рак молочной железы (РМЖ) – 34 %, следующими по частоте были опухоли репродуктивных органов (22 %), органов пищеварения (19 %), гемобласты (6 %).

Расчет общего онкологического риска в исследуемых профессиональных группах показал незначимое его повышение у работников обоих полов в группе операционного персонала, медицинских сестер, работниц экспериментальных научных подразделений, у мужского персонала ИТС (табл. 1).

Расчеты риска отдельных локализаций ЗНО показали статистически незначимое повышение риска ЗНО органов пищеварения в группе мужского операционного персонала, обусловленное повышенным риском развития рака толстой и прямой кишки (ОШ 2,88; 95 % ДИ 0,76–10,87). Риск ЗНО других органов пищеварительной системы был ниже 1,0. В этой группе отмечено также незначимое повышение риска ЗНО половых органов и мочевыводящих путей.

У мужского персонала, работающего с источниками ионизирующего излучения, отмечено 2 случая гемобластозов при отсутствии лиц этой профессиональной группы в соответствующей контрольной группе. В группе других врачей наблюдалось незначимое повышение риска ЗНО органов дыхания, пищеварения и лейкозов (табл. 2).

В объединенной группе персонала клиники и экспериментальных подразделений, в экспозиции которой присутствуют те или иные канцерогенные факторы, у мужчин общий онкологический риск был незначимо понижен (88/93; ОШ 0,87; 95 % ДИ 0,55–1,38), у женщин – незначимо повышен (290/287; ОШ 1,05; 95 % ДИ 0,74–1,49).

В группе мужчин, объединяющей клиницистов и экспериментаторов, было 4 случая рака щитовидной железы при отсутствии лиц этой группы в контроле. У них также диагностировано 8 из 9 случаев гемобластозов (ОШ 6,4; 95 % ДИ 0,55–74,89), 5 из 6 случаев опухолей кожи (ОШ 2,5; 95 % ДИ 0,16–18,6), 3 из 5 случаев опухолей головного мозга (ОШ 2,25; 95 % ДИ 0,18–28,26). Риск ЗНО органов пищеварения был понижен, половых и мочевых органов – равен 1.

В группе мужского персонала ИТС незначимо был повышен риск представленных в табл. 2 локализаций ЗНО, кроме гемобластозов, риск которых был понижен.

У женщин изученных профессиональных групп наблюдалось повышение риска опухолей отдельных локализаций, которое в основном было статистически незначимым. Значимое превышение риска ЗНО органов пищеварения и гемобластозов наблюдалось в группе работниц экспериментальных научных подразделений (табл. 3).

В объединенной группе женского персонала клинических и экспериментальных подразделений был

Таблица 1. Общий онкологический риск в профессиональных группах работников НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина

Table 1. Total cancer risk in occupational groups of employees of the N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology

Профессиональная группа Occupational group	Мужчины Males		Женщины Females	
	Число случаев/число контролей Number of cases/number of controls	Отношение шансов (95 % доверительный интервал) Odds ratio (95 % confidence interval)	Число случаев/число контролей Number of cases/number of controls	Отношение шансов (95 % доверительный интервал) Odds ratio (95 % confidence interval)
Операционный персонал Surgical staff	29/26	1,14 (0,64–2,05)	14/11	1,28 (0,58–2,87)
Персонал, работающий с ионизирующим излучением Personnel working with ionizing radiation	14/21	0,63 (0,31–1,30)	26/35	0,72 (0,43–1,22)
Другие врачи-клиницисты Other clinicians	21/16	1,360,68–2,73)	56/61	0,91 (0,61–1,35)
Средний медицинский персонал Middle medical staff	–	–	86/74	1,21 (0,85–1,72)
Младший медицинский персонал Junior medical staff	–	–	34/47	0,70 (0,44–1,11)
Персонал экспериментальных научных подразделений Personnel of experimental scientific departments	24/30	0,76 (0,42–1,38)	74/59	1,31 (0,90–1,92)
Персонал инженерно-технической службы Personnel of engineering and technical services	57/49	1,26 (0,79–2,03)	22/30	0,72 (0,41–1,27)
Административный и другой персонал, не имеющий контакта с вредными производственными факторами Administrative and other personnel unexposed to harmful occupational factors	5/8	0,61 (0,20–1,92)	57/52	1,11 (0,74–1,67)

статистически незначимо повышен риск РМЖ (ОШ 1,41; в границах 0,79–2,52), ЗНО органов пищеварения (ОШ 1,10; в границах 0,47–2,54), эндокринных органов (ОШ 1,30; в границах 0,31–5,39), гемобластозов (ОШ 4,67; в границах 0,47–45,62), ЗНО кожи (ОШ 1,88; в границах 0,39–9,01), понижен риск опухолей женской половой сферы (ОШ 0,51; в границах 0,31–5,39). В группе работниц, не имевших контакта с производственными вредностями, также отмечено незначимое повышение риска ЗНО органов пищеварения и женской половой сферы.

Обсуждение

При анализе полученных данных неизбежен вопрос, насколько репрезентативна группа лиц с диагнозом ЗНО для всего контингента сотрудников онкоцентра. Сравнение профессиональной структуры группы сотрудников с диагнозом ЗНО с профессиональной структурой всего контингента работников онкоцентра показало, что они близки в процентном соотношении. Так, врачи-мужчины всех специальностей составляют 42 % среди мужчин-работников онко-

центра, а среди лиц с диагнозом ЗНО – 44 %, среди врачей-женщин – 26 и 20,5 % соответственно. Среди мужчин 31,2 % заболевших были работниками ИТС, на долю которых в кадровой структуре онкоцентра приходится 37,3 %. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена между профессиональными структурами в группе лиц с диагнозом ЗНО и всего контингента работающих составил для мужчин 1, для женщин – 0,986 ($p < 0,05$). Соотношение полов (29 % мужчин и 71 % женщин) среди заболевших близко к половой структуре всего контингента работников онкоцентра (на 1 января 2017 г. 24 % составляли мужчины и 76 % женщины). Эти сопоставления свидетельствуют о том, что в группу заболевших лиц не было отбора по половому и профессиональному признакам.

Подавляющее большинство заболевших сотрудников (80 %) к моменту постановки диагноза ЗНО проработали в онкоцентре более 10 лет. У половины заболевших стаж работы в нем превышал 20 лет. В группе работников с малым стажем в основном сконцентрировались работники вспомогательных служб (лифтеры, уборщики, охранники, слесари и др.).

Таблица 2. Онкологический риск в профессиональных группах работников НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (мужчины)
Table 2. Oncological risk in professional groups of employees at the N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (males)

Профессиональная группа Occupational group	Органы пищеварения C15–C26* (n = 60) Digestive tract C15–C26* (n = 60)		Органы дыхания C32–C34* (n = 19) Respiratory system C32–C34* (n = 19)		Половые органы C61–C62* (n = 23) Genital system C61–C62* (n = 23)		Мочевыводящие пути C64–C67* (n = 16) Urinary tract C64–C67* (n = 16)		Гемобластозы C81–C96* (n = 9) Hematological malignancies C81–C96* (n = 9)	
	Число случаев/число контролей Number of cases/number of controls	ОШ (95 % ДИ) OR (95 % CI)	Число случаев/число контролей Number of cases/number of controls	ОШ (95 % ДИ) OR (95 % CI)	Число случаев/число контролей Number of cases/number of controls	ОШ (95 % ДИ) OR (95 % CI)	Число случаев/число контролей Number of cases/number of controls	ОШ (95 % ДИ) OR (95 % CI)	Число случаев/число контролей Number of cases/number of controls	ОШ (95 % ДИ) OR (95 % CI)
Операционный персонал Surgical staff	12/1	1,42 (0,55–3,69)	1/3	0,30 (0,03–3,14)	7/3	2,92 (0,65–3,12)	4/2	2,33 (0,36–15,05)	2/4	0,36 (0,05–2,73)
Персонал, работающий с ионизирующим излучением Personnel working with ionizing radiation	2/9	0,19 (0,04–0,94)	3/4	0,70 (0,13–3,68)	2/3	0,64 (0,10–4,21)	3/2	1,62 (0,23–11,26)	2/0	
Другой врачебный персонал Other doctor	8/6	1,39 (0,45–4,26)	3/1	3,38 (0,32–35,79)	1/5	0,16 (0,02–1,58)	1/1	1 1	3/1	4,0 (0,33–48,66)
Персонал экспериментальных научных подразделений Personnel of experimental scientific departments	12/16	0,69 (0,29–1,61)	1/2	0,47 (0,04–5,70)	6/5	1,27 (0,33–4,95)	0/3		1/0	
Персонал инженерно-технической службы Personnel of engineering and technical services	23/17	1,73 (0,79–3,76)	10/7	1,91 (0,2–2,23)	7/6	1,24 (0,34–4,49)	8/6	1,67 (0,41–6,82)	1/4	0,16 (0,01–1,83)
Административный и другой персонал, не имеющий контакта с вредными производственными факторами Administrative and other personnel unexposed to harmful occupational factors	3/2	1,53 (0,25–9,49)	1/2	0,47 (0,04–5,7)	0/1		0/2		0/0	

* Шифр по Международной классификации болезней 10-го пересмотра.

Примечание. ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал; n – число случаев.

*Code of the International Classification of Diseases, 10th revision.
 Note. OR – odds ratio; CI – confidence interval; n – number of cases.

Таблица 3. Онкологический риск в профессиональных группах работников НИИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина (женщины)
Table 3. Oncological risk in professional groups of employees at the N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (females)

Профессиональная группа Occupational group	Органы пищеварения C15–C26* (n = 69) Digestive tract C15–C26* (n = 69)		Молочная железа C50* (n = 124) Breast C50* (n = 124)		Женские половые органы C51–C56* (n = 83) Genital system C51–C56* (n = 83)		Эндокринные железы C73–C75* (n = 18) Endocrine glands C73–C75* (n = 18)		Гемобласты C81–C96* (n = 22) Hematological malignancies C81–C96* (n = 22)	
	Число случаев/контролей Number of cases/number of controls	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)	Число случаев/контролей Number of cases/number of controls	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)	Число случаев/контролей Number of cases/number of controls	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)	Число случаев/контролей Number of cases/number of controls	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)	Число случаев/контролей Number of cases/number of controls	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)
Операционный персонал Surgical staff	5/4	1,27 (0,33–4,94)	4/2	2,03 (0,37–1,31)	0/0		0/0		0/1	
Персонал, работающий с ионизирующим излучением Personnel working with ionizing radiation	6/11	0,50 (0,18–1,45)	11/8	1,41 (0,55–3,64)	4/7	0,55 (0,16–1,95)	2/2	1,0	2/4	0,45 (0,07–2,76)
Другой врачевный персонал Other doctor	6/14	0,37 (0,14–1,04)	21/16	1,38 (0,68–2,78)	12/17	0,66 (0,29–1,48)	2/1	2,13 (0,18–25,8)	5/3	1,86 (0,39–8,99)
Средний медицинский персонал Middle medical staff	11/10	1,12 (0,44–2,84)	32/29	1,14 (0,64–2,03)	20/14	1,57 (0,73–3,35)	5/7	0,60 (0,15–2,45)	3/5	0,53 (0,11–2,59)
Младший медицинский персонал Junior medical staff	11/9	1,26 (0,49–3,28)	6/19	0,28 (0,11–0,73)	9/12	0,72 (0,29–0,81)	2/0		3/3	1,0
Персонал экспериментальных научных подразделений Personnel of experimental scientific departments	17/7	2,95 (1,14–7,67)	23/15	1,66 (0,82–3,35)	16/20	0,75 (0,36–1,58)	2/2	1,0	8/2	5,71 (1,05–31,07)
Персонал инженерно-технической службы Personnel of engineering and technical services	3/6	0,48 (0,11–1,99)	5/9	0,54 (0,18–1,65)	9/5	1,90 (0,61–5,92)	0/2		1/2	0,48 (0,04–5,67)
Административный и другой персонал, не имеющий контакта с вредными производственными факторами Administrative and other personnel unexposed to harmful occupational factors	10/8	1,29 (0,48–3,50)	22/26	0,81 (0,43–1,53)	13/8	1,74 (0,68–4,44)	5/4	1,35 (0,35–6,13)	0/2	

* Шифр по Международной классификации болезней 10-го пересмотра.

Примечание. ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал; n – число случаев.

*Code of the International Classification of Diseases, 10th revision.

Note. OR – odds ratio; CI – confidence interval; n – number of cases.

Анализ совокупных данных 1-го и 2-го этапов исследования выявил повышение риска ряда локализаций ЗНО в изученных профессиональных группах. Несмотря на то что его показатели в большинстве случаев не достигают уровня статистической значимости, их нельзя игнорировать. У мужчин с экспозицией к специфичным производственным факторам выявлено повышение риска гемобластозов, опухолей щитовидной железы, кожи, головного мозга, т.е. опухолей локализаций, повышение риска которых наблюдалось в зарубежных исследованиях медицинских работников [6–8]. У женщин во всех экспонированных группах, кроме младшего медицинского персонала (санитарок, уборщиц), наблюдалось повышение риска РМЖ, что также прослеживается в масштабных эпидемиологических работах, посвященных медицинским работникам [9, 10]. Предполагается, что определенную роль в этом могут играть занятость в ночных сменах и в связи с этим снижение выработки мелатонина — естественного антиоксиданта [11]. Повышенный риск РМЖ может быть связан с характером репродуктивного поведения (поздние первые роды, малодетность), на который может накладываться отпечаток профессия. При отсутствии информации о репродуктивном поведении, важной для оценки риска РМЖ, невозможно обоснованно утверждать о влиянии профессиональных воздействий на изученные группы женщин, но следует заметить, что у работниц ИТС и тех, кто не имел контакта со специфическими профессиональными факторами, риск РМЖ был незначимо понижен.

Обращает на себя внимание статистически значимое повышение риска ЗНО пищеварительной системы и гемобластозов у работниц экспериментальных научных подразделений, экспонированных к широкому спектру канцерогенных воздействий разной природы: физических, химических и биологических факторов. Результаты санитарно-гигиенической паспортизации онкоцентра, проведенной в 2002 г., показали, что на тот момент 265 сотрудников его научно-исследовательских подразделений имели производственный контакт с различными химическими канцерогенами [5]. По данным зарубежных исследований, проведенных в Финляндии, Швеции, США и Израиле, у работников биомедицинских учреждений наблюдается пониженный общий риск возникновения ЗНО по сравнению с населением и статистически незначимое повышение риска ряда локализаций за исключением значимого повышения риска РМЖ [12–14]. У работников этих лабораторий наблюдается широкий диапазон риска рака поджелудочной железы (0,5–6,3), головного мозга (0,7–9,4) и неходжкинской лимфомы (0,6–51,5). В большинстве исследований обнаруживается низкая статистическая значимость показателей риска и неопределенность оценки экспозиции [15].

Данное исследование, проведенное методом «случай–контроль» внутри когорты, имеет свои ограничения при интерпретации результатов, обусловленные

тем, что заболевшие и контрольные лица не были опрошены по таким факторам риска, как образ жизни, вредные привычки, характер репродуктивного поведения и другие факторы, которые могут выступать как мешающие при оценке онкологического риска, связанного с профессией. Это объясняется наличием сложностей технического характера. Изучение всего спектра онкологических нозологий потребовало бы создания чрезвычайно объемного опросника, учитывающего широкий диапазон факторов, этиологически значимых в их возникновении. Получение таких сведений для большого числа заболевших сотрудников было бы сопряжено с существенными затратами времени и сил. Часть из них к моменту проведения исследования скончались и следовало бы разыскивать и опрашивать их родственников. При этом не исключены потеря и искажение информации. Некоторые заболевшие сотрудники уволились по состоянию здоровья, часть продолжают работать. Исходя из этого, не мог быть выполнен стандартный подход к интервью всех респондентов. И несмотря на то что отсутствие информации по бытовым факторам риска в равной степени относится как к опытной, так и контрольной группам, их роль нельзя отрицать. Это иллюстрируют результаты, относящиеся к группе мужчин-работников ИТС, чей образовательный уровень, надо полагать, значительно ниже, чем у врачей и научных сотрудников, что может отражаться на большей распространенности среди них вредных привычек. Их доля среди заболевших мужчин составила 31,2 %, а доли ЗНО, этиологически связанных с вредными привычками (курение, злоупотребление алкоголем), существенно выше — 50 % и более. Так, 5 из 7 случаев опухолей полости рта и глотки, выявленных во всем контингенте больных, были диагностированы в этой группе (ОШ 1,88; 95 % ДИ 0,20–17,27), у них же выявлены 5 из 10 опухолей печени и поджелудочной железы (ОШ 9,00; 95 % ДИ 0,81–100,14) и 10 из 19 случаев рака органов дыхания (ОШ 1,91; 95 % ДИ 0,2–2,23).

Проведенная работа — первое в России аналитическое эпидемиологическое исследование онкологического риска у медицинских работников. Результаты его тем более важны, что воздействию таких вредных профессиональных факторов, как ионизирующее излучение, химиопрепараты, вирусы, несущие опасность трансмиссивного заражения, ночные смены, психоэмоциональные нагрузки, подвергается не только персонал онкологических клиник, но и работники других медицинских учреждений. Следует также подчеркнуть, что нет отечественных эпидемиологических исследований онкологического риска у работников, занятых научными исследованиями в области медицины и экспонированных к широкому спектру вредных производственных факторов, включая канцерогенные. Вместе с тем полученные данные о повышенном онкологическом риске у женщин, занятых экспериментальной работой, свидетельствуют о необходимости

изучения этой многочисленной профессиональной группы.

Результаты проведенного исследования показали необходимость эпидемиологического мониторинга и накопления данных по онкологическому риску в различных группах медицинских работников с учетом широкого внедрения в медицинскую практику методов интервенционной радиологии, расширения спектра

химиопрепаратов, роста числа лиц, инфицированных вирусом иммунодефицита человека, что вовлекает в сферу их воздействия многочисленные контингенты работников здравоохранения. Такие данные нужны для оценки истинного положения дел в профессиональных группах медицинских работников в нашей стране и разработки адекватных мер профилактики возможных рисков для их здоровья.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ресурсы и деятельность медицинских организаций здравоохранения. 2-я часть. Медицинские кадры. М., 2018. 278 с. [Resources and activities of health care organizations. 2nd part. Medical staff. Moscow, 2018. 278 p. (In Russ.)].
2. Ресурсы и деятельность медицинских организаций здравоохранения. 2-я часть. Средний медицинский персонал. М., 2018. 148 с. [Resources and activities of health care organizations. 2nd part. Middle medical staff. Moscow, 2018. 148 p. (In Russ.)].
3. Соленова Л.Г., Якубовская М.Г. Химиотерапия: возможные риски при обращении с противоопухолевыми препаратами. Успехи молекулярной онкологии 2017;4(3):10–20. DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-10-20. [Solenova L.G., Yakubovskaya M.G. Chemotherapy: some potential risks under antineoplastic drugs handling. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2017;4(3): 10–20. (In Russ.)].
4. Соленова Л.Г., Некрасова Е.А. Медицинские работники: профессиональные канцерогенные факторы и онкологический риск. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(3):25–39. DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-25-39. [Solenova L.G., Nekrasova I.A. Healthcare workers: occupational carcinogenic factors and cancer risk. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2018;5(3):25–39. (In Russ.)].
5. Соленова Л.Г. Производственные факторы и онкологический риск у онкологов. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2009;20(2):41–7. [Solenova L.G. Occupational factors and cancer risk in oncologists. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN* = *Journal of N.N. Blokhin CRC of the Russian Academy of Medical Sciences* 2009;20(2):41–7. (In Russ.)].
6. Pukkala E., Martinsen J.I., Lynge E. et al. Occupation and cancer – follow-up of 15 million people in five Nordic countries. *Acta Oncol* 2009;48(5):646–790. DOI: 10.1080/02841860902913546.
7. Klein-Kremer A., Liphshitz I., Hakl Z. et al. Cancer incidence among physicians in Israel. *Isr Med Assoc J* 2014;16(7):412–7.
8. Maitre A., Colonna M., Gressin C. et al. Increased incidence of haematological cancer among physicians in a University Hospital. *Int Arch Occup Environ Health* 2003;76(1):24–6. DOI: 10.1007/s00420-002-0378-5.
9. Schernhammer E.S., Laden F., Speizer F.E. et al. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1563–8. DOI: 10.1093/jnci/93.20.1563.
10. Schernhammer E.S., Kroenke C.H., Laden F., Hankinson S.E. Night work and risk of breast cancer. *Epidemiology* 2006;17(1):108–11. DOI: 10.1097/01.ede.0000190539.03500.c1.
11. IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Painting, Firefighting, and Shiftwork. Lyon, 2010. P. 98.
12. Gustavsson P., Reuterwall C., Sadigh J., Soderholm M. Mortality and cancer incidence among laboratory technicians in medical research and routine laboratories (Sweden). *Cancer Causes Control* 1999;10(1):59–64.
13. Shaham J., Gurvich R., Kneshet Y. Cancer incidence among laboratory workers in biomedical research and routine laboratory in Israel: Part I – the cohort study. *Am J Ind Med* 2003;44(6):600–10. DOI: 10.1002/ajim.10311.
14. Shaham J., Gurvich R., Kneshet Y. Cancer incidence among laboratory workers in biomedical research and routine laboratory in Israel: Part II – nested case-control study. *Am J Ind Med* 2003;44(6):611–26. DOI: 10.1002/ajim.10312.
15. Racht B., Partanen T., Kauppinen T., Sasco A.J. Cancer risk in laboratory workers: an emphasis on biological research. *Am J Ind Med* 2000;38(6):651–65. DOI: 10.1002/1097-0274(200012)38:6<651::aid-ajim6>3.0.co;2-j.

ORCID авторов/ORCID of authors

Л.Г. Соленова/L.G. Solenova: <https://orcid.org/0000-0002-4443-8376>

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

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

Статья поступила: 18.07.2019. **Принята к публикации:** 17.09.2019.
Article received: 18.07.2019. Accepted for publication: 17.09.2019.