

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ

*Системное лечение
BRCA-ассоциированного трижды
негативного рака молочной железы*

*Молекулярные механизмы полового
диморфизма в канцерогенезе*

*Механизмы цитотоксической
активности пиррол-карбоксамидов
в опухолевых клетках*

*Хроническое ультрафиолетовое
облучение и развитие
лекарственной устойчивости
клеток меланомы*

ТОМ 10 № 3
2023

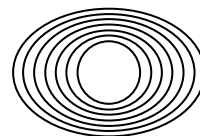


Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук. Журнал включен в Научную электронную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

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



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

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

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

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

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

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

3 ТОМ 10
'23

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

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

www.abvpress.ru

Прием статей:
онлайн на сайте
<http://umo.abvpress.ru/jour>

или по адресу
adv.mol.onc@ronc.ru

*Выпускающий редактор И.В. Пучкова
Корректор Е.С. Самойлова
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук*

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

*Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых*

*коммуникаций (ПИ № ФС77-57560
от 08.04.2014)*

**При полной или частичной
перепечатке материалов ссылка
на журнал «Успехи молекулярной
онкологии» обязательна.**

**Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых
рекламных материалов.**

**В статьях представлена точка
зрения авторов, которая может
не совпадать с мнением редакции.**

ISSN 2313-805X (Print)
ISSN 2413-3787 (Online)
Успехи молекулярной онкологии.
2023. Том 10. № 3. 1–104.

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2023.
Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562.
Отпечатано в типографии
«Лайдер принт».
105082, Москва, Переведеновский
пер., 13, стр. 16.
Тираж 1000 экз. Бесплатно.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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)

Карамышева Аида Фуадовна, д.б.н., главный научный консультант лаборатории генетики опухолевых клеток отдела молекулярной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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 клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

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

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

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

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

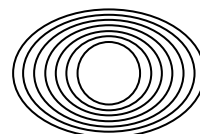
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

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

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

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

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



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

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

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

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

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

FOUNDED IN 2014

3 VOL. 10
'23

Founders:

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

Editorial Office:

Research Institute
of Carcinogenesis,
Floor 3, Bld. 15
24 Kashirskoe Shosse, Moscow
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19.
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Article submission:

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

Managing editor I.V. Puchkova
Proofreader E.S. Samoylova
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

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

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

*Technologies, and Mass Media
(III No. ΦC77-57560
dated 08 April 2014).*

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

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

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

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

Uspekhi molekulyarnoy onkologii.
2023. Vol. 10 No. 3. 1–104.

© PH "ABV-Press", 2023
Pressa Rossii catalogue
index: 93562.

Printed at the Leader Print Ltd
Bld. 16, 13 Perevedenovsky lane,
Moscow 105082.

1000 copies.

Free distribution.

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

EXECUTIVE EDITOR

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

EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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 N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)

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

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

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

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

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

1. Общие правила

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

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

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

Последняя страница должна содержать:

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

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

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

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

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

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

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

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

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

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

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

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

7. Иллюстративный материал

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

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

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

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

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

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

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

9. Список литературы

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

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

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

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

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

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

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

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

Общие положения:

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

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

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

- Д.А. Еналдиева, П.В. Криворотько, Е.Н. Имянитов, Е.К. Жильцова, Р.В. Донских,
Л.Ф. Шайхелисламова, Л.П. Гиголаева, В.Ф. Семиглазов*
**Современные подходы к системному лечению BRCA-ассоциированного трижды негативного
рака молочной железы**8
- Н.В. Павлова, С.С. Демин, М.И. Чурносов, И.В. Пономаренко*
Современное представление о факторах риска и механизмах развития рака молочной железы15
- Г.А. Белицкий, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, В.П. Максимова, Л.В. Кривошеева, М.Г. Якубовская*
Молекулярные механизмы полового диморфизма в канцерогенезе24
- М.А. Галямина, О.В. Побегуц, А.Ю. Горбачев*
Роль микоплазм в качестве инфекционного агента при канцерогенезе36

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

- Ю.Ю. Щеголев, М.А. Карпущина, Д.В. Сорокин, А.М. Щербаков, О.Е. Андреева, В.Е. Разуваева,
Т.А. Богуш, И.Н. Михайлова, Л.В. Демидов, М.В. Гудкова, М.А. Красильников*
**Хроническое ультрафиолетовое облучение индуцирует развитие устойчивой резистентности
клеток меланомы к противоопухолевым препаратам**50
- А.Р. Галембикова, П.Д. Дунаев, Ф.Ф. Бикиниева, И.Г. Мустафин, П.Б. Копнин,
С.С. Зыкова, Е.А. Сарбазян, С.В. Бойчук*
**Механизмы цитотоксической активности пиррол-карбоксамидов в отношении опухолевых
клеточных сублиний с множественной лекарственной устойчивостью**59
- Е.Н. Воропаева, Т.И. Поспелова, М.И. Чуркина, А.А. Гуражева, О.В. Березина, В.Н. Максимов*
**Механизмы нарушения экспрессии генов p53-респонсивных микроРНК при диффузной
В-крупноклеточной лимфоме**72
- Т.А. Богуш, И.Э. Мизаева, А.А. Башарина, А.Н. Гришанина, М.А. Барышникова, О.С. Бурова,
А.А. Рудакова, В.С. Косоруков*
**Экспрессия белков цитоскелета – цитокератинов и бета-III тубулина в клетках культур
меланомы человека из коллекции НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина**82
- В.А. Яровая, И.А. Левашов, А.Р. Зарецкий, Л.В. Чудакова, В.В. Назарова, А.Д. Матяева,
Л.В. Демидов, А.А. Яровой*
**Прогностическая тонкоигольная аспирационная биопсия увеальной меланомы:
молекулярно-генетические факторы риска развития метастазов**90
- Vaishak Jawahar, Sourjya Banerjee, Jyoti Kini, Saraswathy Sreeram, M.S. Athiyamaan,
J. Sunny, A. Krishna, C. Srinivas, D. Lobo, B. Sai Makkapatti*
**Prevalence of HPV/p16+ infection among oropharyngeal squamous cell carcinoma patients
in a tertiary care centre in Southern India**98

ЮБИЛЕЙ

- Надежде Викторовне Чердынцевой – 70 лет!**103

REVIEW

- D.A. Enaldieva, P.V. Krivorotko, E.N. Imyanitov, E.K. Zhiltsova, R.V. Donskikh, L.F. Shaikhelislamova, L.P. Gigolaeva, V.F. Semiglazov*
Current approaches to systemic treatment of BRCA-associated triple-negative breast cancer8
- N.P. Pavlova, S.S. Dyomin, M.I. Churnosov, I.V. Ponomarenko*
Modern understanding of risk factors and mechanisms of breast cancer development15
- G.A. Belitsky, K.I. Kirsanov, E.A. Lesovaya, V.P. Maksimova, L.V. Krivosheeva, M.G. Yakubovskaya*
Sexual dimorphism in cancer24
- M.A. Galyamina, O.V. Pobeguts, A.Yu. Gorbachev*
The role of mycoplasmas as an infectious agent in carcinogenesis36

EXPERIMENTAL REPORT

- Yu.Yu. Shchegolev, M.A. Karpukhina, D.V. Sorokin, A.M. Scherbakov, O.E. Andreeva, V.E. Razuvaeva, T.A. Bogush, I.N. Mikhailova, L.V. Demidov, M.V. Gudkova, M.A. Krasil'nikov*
Continuous ultraviolet irradiation induces the development of irreversible resistance of melanoma cells to anticancer drugs50
- A.R. Galembikova, P.D. Dunaev, F.F. Bikinieva, I.G. Mustafin, P.B. Kopnin, S.S. Zykhova, E.A. Sarbazyan, S.V. Boichuk*
Mechanisms of cytotoxic activity of pyrrole-carboxamides against multidrug-resistant tumor cell sublines59
- E.N. Voropaeva, T.I. Pospelova, M.I. Churkina, A.A. Gurazheva, O.V. Berezina, V.N. Maksimov*
Mechanisms of impaired expression of p53-responsive microRNA genes in diffuse B-large cell lymphoma72
- T.A. Bogush, I.E. Mizaeva, A.A. Basharina, A.N. Grishanina, M.A. Baryshnikova, O.S. Burova, A.A. Rudakova, V.S. Kosorukov*
Expression of the cytoskeletal proteins – cytokeratins and beta-III tubulin in human melanoma cell lines from the collection of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology82
- V.A. Yarovaya, I.A. Levashov, A.R. Zaretsky, L.V. Chudakova, V.V. Nazarova, A.D. Matyaeva, L.V. Demidov, A.A. Yarovoy*
Prognostic fine needle aspiration biopsy of uveal melanoma: Molecular and genetic factors of metastasis risk90
- Vaishak Jawahar, Sourjya Banerjee, Jyoti Kini, Saraswathy Sreeram, M.S. Athiyamaan, J. Sunny, A. Krishna, C. Srinivas, D. Lobo, B. Sai Makkapatti*
Prevalence of HPV/p16+ infection among oropharyngeal squamous cell carcinoma patients in a tertiary care centre in Southern India98

JUBILEE

- Nadezhda Viktorovna Cherdyntseva is 70 years old!**103

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-8-14



Современные подходы к системному лечению *BRCA*-ассоциированного трижды негативного рака молочной железы

Д.А. Еналдиева, П.В. Криворотко, Е.Н. Имянитов, Е.К. Жильцова, Р.В. Донских, Л.Ф. Шайхелисламова, Л.П. Гиголаева, В.Ф. Семиглазов

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

Контакты: Диана Артуровна Еналдиева dianaenaldieva932@gmail.com

BRCA-ассоциированный трижды негативный рак молочной железы (ТНПМЖ) характеризуется высокой чувствительностью к ДНК-повреждающим цитотоксическим препаратам. Применение известных *BRCA1/2*-специфических противоопухолевых средств – производных платины и PARP-ингибиторов – длительное время обсуждалось в контексте лечения метастатического *BRCA*-ассоциированного ТНПМЖ. Стандартом лекарственной терапии первичного *BRCA*-ассоциированного РМЖ является неoadъювантная химиотерапия с использованием антрациклинов и таксанов. В настоящее время имеется не так много данных о добавлении препаратов платины к антрациклин-таксановой неoadъювантной химиотерапии при лечении первичного *BRCA*-ассоциированного ТНПМЖ. В представленном обзоре подробно описаны различные способы терапии данного рака, как первичного, так и метастатического. Показано, что разработка новых стратегий неoadъювантной химиотерапии для пациенток с первичным *BRCA*-ассоциированным ТНПМЖ является насущной клинической необходимостью для снижения рисков рецидивирования и прогрессирования.

Ключевые слова: мутации *BRCA1/2*, неoadъювантная химиотерапия, патологический полный ответ, трижды негативный рак молочной железы, метастатический рак молочной железы

Для цитирования: Еналдиева Д.А., Криворотко П.В., Имянитов Е.Н. и др. Современные подходы к системному лечению *BRCA*-ассоциированного трижды негативного рака молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(3):8–14. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-8-14

Current approaches to systemic treatment of *BRCA*-associated triple-negative breast cancer

D.A. Enaldieva, P.V. Krivorotko, E.N. Imyanitov, E.K. Zhiltsova, R.V. Donskikh, L.F. Shaikhelislamova, L.P. Gigolaeva, V.F. Semiglazov

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

Contacts: Diana Arturovna Enaldieva dianaenaldieva932@gmail.com

BRCA-associated triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by high sensitivity to DNA-damaging cytotoxic drugs. The use of well-known *BRCA1/2*-specific antitumor agents – platinum derivatives and PARP inhibitors – has been discussed for a long time in the context of the treatment of metastatic *BRCA*-associated TNBC. Neoadjuvant regimens based on the use of anthracyclines and taxanes are the standard of drug therapy for primary *BRCA*-associated breast cancer. At present, there are few data regarding the addition of platinum drugs to anthracycline-taxane neoadjuvant chemotherapy in the treatment of primary *BRCA*-associated TNBC. This review details the various treatment options for both primary and metastatic *BRCA*-associated TNBC. It has been shown that the development of new strategies for the neoadjuvant chemotherapy of patients with primary *BRCA*-associated TNBC is an urgent clinical need to reduce the risks of recurrence and progression.

Keywords: *BRCA1/2* mutations, neoadjuvant chemotherapy, pathological complete response, triple-negative breast cancer, metastatic breast cancer

For citation: Enaldieva D.A., Krivorotko P.V., Imyanitov E.N. et al. Current approaches to systemic treatment of *BRCA*-associated triple-negative breast cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(3): 8–14. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-8-14

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (PMЖ) на протяжении многих лет сохраняет лидирующее место в структуре онкологических заболеваний среди женщин во всем мире. В 2021 г. в РФ число пациенток с диагнозом PMЖ составило около 70 тыс., что делает это заболевание ведущей онкопатологией среди женского населения страны [1].

Одним из ключевых факторов риска развития PMЖ является семейный анамнез заболевания [2]. Гипотеза о существовании наследственного PMЖ получила молекулярное подтверждение в лаборатории профессора М. Клэр-Кинг, где была выявлена зависимость между молодым возрастом манифестации PMЖ с семейным анамнезом и наличием патологии в локусе 17q21. Позже, в 1994 г., впервые был клонирован ген *BRCA1* [3], а спустя 2 года – ген *BRCA2*, который находится на длинном плече 13-й хромосомы в позиции 13q12.3 [4].

Риск развития PMЖ у женщин при наличии мутации генов *BRCA1/2* на протяжении жизни чрезвычайно высок. А. Antoniou и соавт. полагают, что кумулятивный риск возникновения данной патологии к 70 годам у женщин с патогенным вариантом *BRCA1* составляет 65 %, а у женщин с мутацией *BRCA2* – 45 % [5]. Одно из крупнейших проспективных исследований EMBRACE также продемонстрировало, что риск развития PMЖ к 70 годам для носительниц мутаций генов *BRCA1/2* составляет 60 %, а риск развития контралатеральной опухоли – 83 % [6].

Изучение биологических особенностей PMЖ выявило связь между наличием мутаций *BRCA1/2* и развитием трижды негативного PMЖ (ТНPMЖ). Данная патология является одним из наиболее агрессивных подтипов PMЖ, который часто связан с неблагоприятными исходами вследствие быстрого развития отдаленных метастазов [7–10]. На долю ТНPMЖ приходится 1/4 часть всех случаев опухолей данной локализации [11]. По данным различных авторов, пациентки с ТНPMЖ с мутациями *BRCA1/2* имеют лучшие показатели общей выживаемости, чем пациентки без этих мутаций [4, 12].

В данном обзоре представлен анализ данных, начиная с 2003 г. по настоящее время.

НЕОАДЬЮВАНТНОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ ЛЕЧЕНИЕ *BRCA*-АССОЦИИРОВАННОГО ТРИЖДЫ НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В настоящее время все усилия направлены на минимизацию оперативного вмешательства и улучшение выживаемости у пациенток с PMЖ. С этой целью больным ТНPMЖ с мутациями *BRCA1/2* с учетом отсутствия возможности применения гормонотерапии или таргетной терапии рекомендовано проведение неоадьювантной химиотерапии (НАХТ). Дефицит функции *BRCA1/2* делает опухоли особо уязвимыми к химиотерапевтическим средствам, повреждающим

ДНК [13]. Предполагается, что пациентки с мутациями *BRCA1/2* в отличие от пациенток с люминальными подтипами PMЖ с большей вероятностью достигнут полного патоморфологического регресса (pCR) после прохождения НАХТ [14].

Существует небольшое количество исследований, в которых оценивалось применение стандартной антрациклин-таксановой НАХТ, приводящей к pCR у большей части больных с *BRCA*-ассоциированным ТНPMЖ [13, 15]. Антрациклины – одни из самых эффективных противоопухолевых препаратов. Механизм их цитотоксического действия заключается в интеркаляции между парами нуклеотидов ДНК, что вызывает нарушение ее матричных функций, и ингибировании топоизомеразы II, участвующей в процессах репликации и транскрипции [16]. Антрациклиновые агенты во всех внутриклеточных компартаментах циклически подвергаются восстановлению и окислению до химически активных соединений, которые в присутствии кислорода начинают индуцировать образование свободных радикалов. Возникающий при этом окислительный стресс оказывает повреждающее действие на липиды мембран, основания ДНК и транспортные белки. Известен факт, что антрациклины могут приводить опухолевые клетки к гибели не только путем апоптоза, но и посредством активации других типов запрограммированной гибели, включая иммуноопосредованную [12].

Паклитаксел – препарат таксанового ряда – имеет другой молекулярный эффект. Его действие заключается в усилении полимеризации тубулина и избыточном образовании микротрубочек. Последующее их неправильное расположение приводит к остановке клеточного цикла (в фазах митоза G2 и M) и ингибированию опухолевого роста. Также важным моментом является способность таксанов увеличивать продукцию фактора некроза опухоли (ФНО) и интерлейкина-1 (ИЛ-1), что обуславливает прямой цитотоксический эффект данной группы препаратов [17]. Наличие мутации генов *BRCA1/2* может оказывать негативное влияние на таксан-опосредованный апоптоз. По некоторым данным, у пациенток с мутацией гена *BRCA1* таксаны демонстрируют ограниченную эффективность химиотерапии [17, 18]. В то же время в исследовании M.L. Vigness и соавт. [14] сообщается о 8 % (2/25) случаев достижения pCR на фоне неоадьювантной монохимиотерапии паклитекселом у больных с *BRCA1*-ассоциированным PMЖ. Тем не менее некоторые аспекты цитотоксического действия таксанов при нарушении функции генов *BRCA1/2* до сих пор остаются неясными, что делает целесообразным дальнейшее изучение этого вопроса.

Для пациенток с ТНPMЖ – носительниц патогенных вариантов *BRCA1/2* характерны более высокие показатели pCR (59 %) при использовании антрациклин-таксанового режима НАХТ по сравнению с пациентками с ТНPMЖ без таких мутаций (22 %) [19].

Эти наблюдения подтверждены исследованиями L. Bignon [20] и S. Paluch-Shimon [16], в которых более высокая частота pCR (68 %) была продемонстрирована после антрациклин-таксановой НАХТ при *BRCA*-ассоциированном ТНПМЖ по сравнению с группой пациенток с ТНПМЖ без патогенной мутации (37 %).

Особый интерес представляют работы, оценивающие эффективность добавления препаратов платины к стандартным режимам НАХТ у больных с первичным ТНПМЖ и мутациями *BRCA1/2* [21, 22]. Цисплатин – первое платиновое соединение, играющее ключевую роль в лечении опухолей с наследственными мутациями [23]. Механизм его действия заключается в способности образовывать сшивки с пуриновыми основаниями ДНК, вызывая ее повреждение. Это в свою очередь индуцирует апоптоз в опухолевых клетках с нарушенной ДНК-репарацией. Высокая чувствительность опухолей с герминальными мутациями *BRCA1/2* к цисплатину была первоначально продемонстрирована в исследовании эффективности платиновой монотерапии у пациенток с первичным *BRCA*-ассоциированным ТНПМЖ: у 9 из 10 (90 %) больных был зарегистрирован pCR [24]. В аналогичной работе [25] частота pCR при применении цисплатина в качестве монотерапии составила 83 %. Дальнейшие исследования только повысили интерес к данному варианту химиотерапии, сопровождавшейся значимой частотой pCR [25–27].

Столь успешные результаты после применения цисплатина достойны особого внимания. Тем не менее нельзя не принимать во внимание тот факт, что данный препарат показал высокий риск развития нефротоксического эффекта. Это побудило исследователей к поиску столь же эффективного лекарственного средства, но характеризующегося меньшим риском развития токсических эффектов. Единственным платиновым агентом, прошедшим клинические испытания, имеющим практически такую же эффективность, что и цисплатин, и вызывающим меньше нежелательных явлений (особенно в устранении нефротоксичности), является карбоплатин.

Данные литературы подтверждают преимущество применения карбоплатина в сочетании с препаратами таксанового ряда, в частности с паклитакселом, у больных ТНПМЖ с мутациями *BRCA1/2*. Показано, что добавление платинового агента к таксанам после проведенного курса химиотерапии антрациклинами у пациенток с мутациями *BRCA1/2* ассоциировано с более высокой частотой pCR по сравнению со стандартным режимом НАХТ (58 % (92/160) против 31 % (49/158)) (табл. 1) [28, 29]. Кроме того, было установлено, что включение карбоплатина в стандартную схему НАХТ у пациенток с этими мутациями приводит к увеличению показателей выживаемости без прогрессирования [29].

Еще одним препаратом, биологическая активность которого проявляется в способности образовывать как межцепочечные, так и внутривещечные

поперечные связи ДНК, является противоопухолевый антибиотик митомицин (МС). Ранее он применялся для лечения метастатического РМЖ (мРМЖ) [30, 31]. Несмотря на высокую эффективность МС у больных мРМЖ, в литературе нет данных о его использовании у пациенток с местно-распространенным РМЖ и мутациями *BRCA1/2*. В настоящее время на базе Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Петрова проводится клиническое исследование эффективности неoadьювантной терапии с МС у больных местно-распространенным *BRCA*-ассоциированным ТНПМЖ.

АДЬЮВАНТНОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ ЛЕЧЕНИЕ *BRCA*-АССОЦИИРОВАННОГО МЕТАСТАТИЧЕСКОГО ТРИЖДЫ НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Для пациенток с мТНПМЖ – носительниц мутаций *BRCA1/2* и соединения платины, и PARP-ингибиторы являются подходящими вариантами послеоперационного лечения [33–36]. Не существует убедительных сведений для определения последовательности использования этих препаратов при мТНПМЖ, поэтому применение первого или второго вариантов в качестве 1-й линии терапии после проведения антрациклин-таксановой схемы НАХТ допустимо для данной когорты пациентов.

Соединения платины демонстрируют лучшие результаты по достижению высокой частоты объективных ответов у больных мТНПМЖ с наличием патогенной мутации (54,5 %) по сравнению с больными спорадическим мТНПМЖ (19,7 %) [37]. Кроме того, применение солей платины у пациенток с *BRCA1/2*-ассоциированным мТНПМЖ увеличивает не только частоту объективного ответа (68 % против 33 %), но и медиану выживаемости без прогрессирования (ВБП) (6,8 мес против 4,4 мес) по сравнению с монотерапией доцетакселом [38]. Т. Byrski и соавт. впервые продемонстрировали преимущество использования цисплатина в качестве неoadьювантной терапии у первичных больных с мутациями *BRCA1/2* [24–26]. Позднее этот коллектив авторов исследовал применение данного препарата у пациенток с мТНПМЖ, у которых полный регресс отдаленных очагов был достигнут в 50 % случаев [39].

Помимо генов *BRCA1/2*, которые обеспечивают репарацию двунитевых разрывов, еще одним важным путем восстановления повреждений ДНК является PARP-опосредованная репарация одноцепочечных разрывов [35]. Ингибиторы PARP нарушают репарацию одноцепочечных разрывов ДНК, которые конвертируются в двухцепочечные. Таким образом, при нарушении функции репарации двухцепочечных повреждений ДНК в *BRCA1/2*-дефицитных клетках возникает эффект синтетической летальности [40].

Ингибиторы PARP, а именно олапариб и талазопариб, были одобрены Управлением по санитарному

Таблица 1. Избранные клинические исследования по неoadъювантной терапии BRCA-ассоциированного трижды негативного рака молочной железы (ТНРМЖ)**Table 1.** Selected neoadjuvant clinical trials on neoadjuvant therapy of BRCA-associated triple-negative breast cancer (TNBC)

Исследование Trial	Число пациентов, включенных в исследование, <i>n</i> Number of patients included in the study, <i>n</i>	Режим химиотерапии Chemotherapy regimen	pCR, % (<i>n</i>)
Антрациклины и таксаны Anthracyclines and taxanes			
V. Arun и соавт., 2011 [19] B. Arun et al., 2011 [19]	80	A + T против A против T A + T versus A versus T	46 против 17 против 22 46 versus 17 versus 22
L. Bignon и соавт., 2018 [20] L. Bignon et al., 2018 [20]	53	A + T	42,6
S. Paluch-Shimon и соавт., 2016 [16] S. Paluch-Shimon et al., 2016 [16]	34	A + T	68 против 37* 68 versus 37*
M.L. Burness и соавт., 2016 [14] M.L. Burness et al. 2016 [14]	25	T	8 (2)
Платиносодержащая химиотерапия Platinum-based chemotherapy			
D. Silver и соавт., 2010 [27] D. Silver et al., 2010 [27]	28	Cis	22 (6)
S. Loibl и соавт., 2018 [28] S. Loibl et al., 2018 [28]	24	Cb + P → Dox + C	50 (12)
J. Zhang и соавт., 2021 [29] J. Zhang et al., 2021 [29]	102	A + TCb против A + T A + TCb versus A + T	40,9 против 21,5 40.9 versus 21.5
M. Holánek и соавт., 2018 [32] M. Holánek et al., 2018 [32]	37	Cis + A против A Cis + A versus A	56,7 против 43,4 56.7 versus 43.4
T. Byrski и соавт., 2010 [25] T. Byrski et al., 2010 [25]	12	Cis	83 (10)**
T. Byrski и соавт., 2009 [26] T. Byrski et al., 2009 [26]	107	Cis	61 (65)**

*BRCA-положительный ТНРМЖ против BRCA-отрицательного ТНРМЖ. **BRCA- и ER-положительный ТНРМЖ.

*BRCA-positive TNBC versus BRCA-negative TNBC. **BRCA- and ER-positive TNBC.

Примечание. pCR – полный патоморфологический регресс; Dox – доксорубин; A – схема на основе антрациклина; T – схема на основе таксана; Cb – карбоплатин; TCb – таксаны + карбоплатин; P – паклитаксел; C – циклофосфамид; Cis – цисплатин.

Note. pCR – pathological complete response; Dox – doxorubicin; A – anthracycline based regimen; T – taxane based regimen; Cb – carboplatin; TCb – taxane + carboplatin; P – paclitaxel; C – cyclophosphamide; Cis – cisplatin.

надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) и Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) для применения у пациенток с BRCA1/2-ассоциированным/HER2неотрицательным (HER2 – human epidermal growth factor receptor 2, рецептор эпидермального фактора роста, тип 2) статусом. В частности, олапариб одобрен FDA для лечения мРМЖ, а EMA одобрило применение данного препарата для лечения местно-распространенного/метастатического РМЖ. Талазопариб был рекомендован FDA и EMA для терапии местно-распространенного/метастатического РМЖ [41].

Применение олапариба у больных с мТНРМЖ – носительниц патогенных вариантов BRCA1/2 существ-

венно увеличивает ВБП (7,0 мес против 4,2 мес) и способствует достижению более высоких показателей частоты объективных ответов по сравнению со стандартной химиотерапией (59,9 % против 28,8 %), что может служить основой для достижения долгосрочной выживаемости [42]. Аналогичное увеличение медианы ВПБ по сравнению с химиотерапией (капецитабин, эрибулин, винорелбин или гемцитабин) продемонстрировал и талазопариб (5,6 мес против 8,6 мес) [43].

Еще одним PARP-ингибитором, показавшим устойчивое увеличение ВБП у пациенток с мТНРМЖ и наследственной мутацией, является велипариб [44]. Однако в рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании фазы II (S1416) по изучению цисплатина в сочетании либо с велипарибом,

Таблица 2. Избранные клинические исследования по системной терапии *BRCA1/2*-ассоциированного метастатического трижды негативного рака молочной железы (мТНПМЖ)

Table 2. Selected clinical trials and outcomes for systemic therapy of *BRCA1/2*-associated metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC)

Исследование Trial	Число пациентов, включенных в исследование, <i>n</i> Number of patients included in the trial, <i>n</i>	Режим химиотерапии Chemotherapy regimen	Частота объективных ответов, % Objective response rate, %	Выживаемость без прогрессирова- ния, мес Progression-free survival, months
Т. Byrski и соавт., 2019 [39] T. Byrski et al., 2019 [39]	14	Cis	50	17*
М.Е. Robson и соавт., 2019 [42] M.E. Robson et al., 2019 [42]	302	Олапариб против химиотерапии Olaparib versus chemotherapy	59,9 против 28,8 59.9 versus 28.8	7,0 против 4,2 7.0 versus 4.2
Ж.К. Litton и соавт., 2018 [43] J.K. Litton et al., 2018 [43]	431	Талазапариб против химиотерапии Talazoparib versus chemotherapy	62,6 против 27,2 62.6 versus 27.2	8,6 против 5,6 8.6 versus 5.6
Ж.П. Ayoub и соавт., 2018 [44] J.P. Ayoub et al., 2018 [44]	243	Велипариб + ТСб против плацебо + ТСб Veliparib + TCb versus placebo + TCb	77,5 против 77,5 77.5 versus 77.5	17,5 против 11,4 17.5 versus 11.4
Е. Rodler и соавт., 2023 [45] E. Rodler et al., 2023 [45]	101	Cis + велипариб против Cis + плацебо Cis + veliparib versus Cis + placebo	77,5 против 77,5 77.5 versus 77.5	5,9 против 4,2** 5.9 versus 4.2**

BRCA*- и *ER*-положительный ТНПМЖ. *BRCA*-положительный ТНПМЖ против *BRCA*-отрицательного ТНПМЖ.

BRCA*- and *ER*-positive TNBC. *BRCA*-positive TNBC versus *BRCA*-negative TNBC.

Примечание. ТСб – таксаны + карбоплатин; Cis – цисплатин.

Note. TCb – taxane + carboplatin; Cis – cisplatin.

либо с плацебо у больных с *BRCA1/2*-ассоциированным мТНПМЖ особых различий в продолжительности ВБП зарегистрировано не было (6,2 мес против 6,4 мес) [45].

Необходимо также отметить, что не только мутации, но и метилирование промотора *BRCA1* коррелирует с плохим прогнозом и низкими показателями выживаемости пациенток с ТНПМЖ. Метилирование промотора наряду с мутацией в этом гене может служить прогностическим фактором. Для таких опухолей также вероятна высокая эффективность PARP-ингибиторов [46–49].

W. Mo и соавт. в 2016 г. изучили возможность ингибиторов мишени рапамицина млекопитающих (mammalian target of rapamycin, mTOR) посредством модулирования репарации гомологичной рекомбинации оказывать терапевтический эффект в сочетании с ингибиторами PARP в доклинических моделях *BRCA*-ассоциированного ТНПМЖ. Согласно полученным данным ингибиторы mTOR подавляют восстановление гомологичной рекомбинации и усиливают цитотоксичность ингибиторов PARP в *BRCA*-дефицитных клетках ТНПМЖ *in vitro* и *in vivo*. Эти результаты

демонстрируют эффективный подход к терапевтическому сочетанию ингибиторов mTOR с ингибиторами PARP при *BRCA*-ассоциированном ТНПМЖ, однако мы не нашли исследований по применению данной комбинации препаратов в клинической практике [50].

Таким образом, производные платины, а также ингибиторы PARP являются эффективными препаратами при лечении мТНПМЖ у носительниц мутаций *BRCA1/2*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее десятилетие наблюдается эскалация лекарственной терапии пациенток с ТНПМЖ – носительниц мутаций *BRCA1/2*. Производные платины и PARP-ингибиторы, безусловно, способствуют повышению показателей ВБП у больных метастатическим РМЖ. Однако стоит отметить, что использование препаратов платины при лечении первичного ТНПМЖ у носительниц мутаций *BRCA1/2* пока не является повсеместной практикой. Разработка новых стратегий неoadъювантного лекарственного лечения больных первичным *BRCA1/2*-ассоциированным ТНПМЖ является насущной клинической необходимостью.

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

1. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старигородского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. 252 с. Malignant neoplasms in Russia in 2021 (morbidity and mortality). Moscow: P.A. Herzen Institute of Medical Research – branch of the Federal State Budgetary Institution “NMIC of Radiology” of the Ministry of Health of Russia, 2022. 252 p. (In Russ.).
2. Desai N.V., Tung N.M. Medical management of newly diagnosed breast cancer in a *BRCA1/2* mutation carrier. *Breast J* 2020; 26(8):1506–12. DOI: 10.1111/tbj.13972
3. Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D. et al. Strong candidate for the breast and ovarian cancer. *Science* 1994;266(5182):66–71. DOI: 10.1126/science.7545954
4. Wooster R., Neuhausen S.L., Mangion J. et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994;265(5181):2088–90. DOI: 10.1126/science.8091231
5. Antoniou A., Pharoah P.D., Narod S. et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with *BRCA1* or *BRCA2* mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003;72(5):1117–30. DOI: 10.1086/375033
6. Mavaddat N., Peock S., Frost D. et al. Cancer risks for *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst* 2013;105(11):812–22. DOI: 10.1093/jnci/djt095
7. Bianchini G., Balko J.M., Mayer I.A. et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13:674–90. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.66
8. Geyer F., Pareja F., Weigelt B. et al. The spectrum of triple-negative breast disease: high- and low-grade lesions. *Am J Pathol* 2017;187(10):2139–51. DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.03.016
9. Khosravi-Shahi P., Cabezón-Gutiérrez L., Custodio-Cabello S. Metastatic triple negative breast cancer: optimizing treatment options, new and emerging targeted therapies. *Asia Pac J Clin Oncol* 2018;14(1):32–9. DOI: 10.1111/ajco.12748
10. Zeichner S.B., Terawaki H., Gogineni K. A review of systemic treatment in metastatic triple-negative breast cancer. *Breast Cancer (Auckl)* 2016;10:25–36. DOI: 10.4137/BCBCR.S32783
11. Tsai J., Bertoni D., Hernandez-Boussard T. et al. Lymph node ratio analysis after neoadjuvant chemotherapy is prognostic in hormone receptor-positive and triple-negative breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2016;23(10):3310–6. DOI: 10.1245/s10434-016-5319-8
12. Copson E.R., Maishman T.C., Tapper W.J. et al. Germline *BRCA* mutation and outcome in young-onset breast cancer (POSH): a prospective cohort study. *Lancet Oncol* 2018;19(2):169–80. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30891-4
13. Tassone P., Tagliaferri P., Perricelli A. et al. *BRCA1* expression modulates chemosensitivity of *BRCA1*-defective HCC1937 human breast cancer cells. *Br J Cancer* 2003;88(8):1285–91. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600859
14. Burness M.L., Obeid E.I., Olopade O.I. Triple negative breast cancer in *BRCA1* mutation carriers with a complete radiologic response to neoadjuvant paclitaxel: a case report. *Clin Breast Cancer* 2015;15(2):e155-8. DOI: 10.1016/j.clbc.2014.08.006
15. Liedtke C., Mazouni C., Hess K.R. et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(8):1275–81. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.4147
16. Paluch-Shimon S., Friedman E., Berger R. et al. Neo-adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel in triple-negative breast cancer among *BRCA1* mutation carriers and non-carriers. *Breast Cancer Res Treat* 2016;157(1):157–65. DOI: 10.1007/s10549-016-3800-5
17. Weaver B.A. How taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell* 2014;25(18):2677–81. DOI: 10.1091/mbc.E14-04-0916
18. Gluz O., Liedtke C., Gottschalk N. et al. Triple-negative breast cancer – current status and future directions. *Ann Oncol* 2009;20(12):1913–27. DOI: 10.1093/annonc/mdp492
19. Arun B., Bayraktar S., Liu D.D. et al. Response to neoadjuvant systemic therapy for breast cancer in *BRCA* mutation carriers and noncarriers: a single-institution experience. *J Clin Oncol* 2011;29(28):3739–46. DOI: 10.1200/JCO.2011.35.2682
20. Bignon L., Fricker J., Nogues C. et al. Efficacy of anthracycline/taxane-based neo-adjuvant chemotherapy on triple-negative breast cancer in *BRCA1/BRCA2* mutation carriers. *Breast J* 2018;24(3):269–77. DOI: 10.1111/tbj.12887
21. Desai N.V., Tung N.M. Medical management of newly diagnosed breast cancer in a *BRCA1/2* mutation carrier. *Breast J* 2020;26(8):1506–12. DOI: 10.1111/tbj.13972
22. Fong P.C., Boss D.S., Yap T.A. et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from *BRCA* mutation carriers. *N Engl J Med* 2009;361(2):123–34. DOI: 10.1056/NEJMoa0900212
23. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007;7(8):573–84. DOI: 10.1038/nrc2167
24. Byrski T., Huzarski T., Dent R. et al. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in *BRCA1*-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2009;115(2):359–63. DOI: 10.1007/s10549-008-0128-9
25. Byrski T., Gronwald J., Huzarski T. et al. Pathologic complete response rates in young women with *BRCA1*-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2010;28(3):375–9. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.7019
26. Byrski T., Huzarski T., Dent R. et al. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in *BRCA1*-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2009;115(2):359–63. DOI: 10.1007/s10549-008-0128-9
27. Silver D.P., Richardson A.L., Eklund A.C. et al. Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(7):1145–53. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.4725
28. Loibl S., O’Shaughnessy J., Untch M. et al. Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrighTNess): a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2018;19(4):497–509. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30111-6
29. Zhang J., Yao L., Liu Y. et al. Impact of the addition of carboplatin to anthracycline-taxane-based neoadjuvant chemotherapy on survival in *BRCA1/2*-mutated triple-negative breast cancer. *Int J Cancer* 2021;148(4):941–9. DOI: 10.1002/ijc.33234
30. Mrozek E., Kolesar J., Young D. et al. Phase II study of sequentially administered low-dose mitomycin-C (MMC) and irinotecan (CPT-11) in women with metastatic breast cancer (MBC). *Ann Oncol* 2008;19(8):1417–22. DOI: 10.1093/annonc/mdn154
31. Maisano R., Caristi N., Mare M. et al. Mitomycin C plus capecitabine (mixe) in anthracycline- and taxane-pretreated metastatic breast cancer. A multicenter phase II study. *Anticancer Res* 2007;27(4C):2871–5.
32. Holánek M., Bílek O., Nenutil R. et al. Effectiveness of neoadjuvant therapy with platinum-based agents for patients with *BRCA1* and *BRCA2* germline mutations – a retrospective analysis of breast cancer patients treated at MMCI Brno. *Klin Onkol* 2019;32(Suppl. 2):31–5. DOI: 10.14735/amko2019S31
33. Banerjee S., Moore K.N., Colombo N. et al. Maintenance olaparib for patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer and a *BRCA* mutation (SOLO1/GOG 3004): 5-year follow-up of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [published correction appears. *Lancet Oncol* 2021;22(12):1721–31. DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00531-3
34. Arun B.K., Han H.S., Kaufman B. et al. Efficacy and safety of first-line veliparib and carboplatin-paclitaxel in patients with HER2-advanced germline *BRCA+* breast cancer: Subgroup analysis

- of a randomised clinical trial. *Eur J Cancer* 2021;154:35–45. DOI: 10.1016/j.ejca.2021.05.037
35. Diéras V., Han H.S., Kaufman B. et al. Veliparib with carboplatin and paclitaxel in *BRCA*-mutated advanced breast cancer (BROCADE3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2020;21(10):1269–82. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30447-2
 36. Han H.S., Diéras V., Robson M. et al. Veliparib with temozolomide or carboplatin/paclitaxel versus placebo with carboplatin/paclitaxel in patients with *BRCA1/2* locally recurrent/metastatic breast cancer: randomized phase II study. *Ann Oncol* 2018;29(1):154–61. DOI: 10.1093/annonc/mdx505
 37. Zhu Y., Wu J., Zhang C. et al. *BRCA* mutations and survival in breast cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(43):70113–27. DOI: 10.18632/oncotarget.12158
 38. Tutt A., Tovey H., Cheang M.C.U. et al. Carboplatin in *BRCA1/2*-mutated and triple-negative breast cancer *BRCA*ness subgroups: the TNT Trial. *Nat Med* 2018;24(5):628–37. DOI: 10.1038/s41591-018-0009-7
 39. Byrski T., Dent R., Blecharz P. et al. Results of a phase II open-label, non-randomized trial of cisplatin chemotherapy in patients with *BRCA1*-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2012;14(4):R110. DOI: 10.1186/bcr3231
 40. De Vos M., Schreiber V., Dantzer F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem Pharmacol* 2012;84(2):137–46. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.03.018
 41. Cortesi L., Rugo H.S., Jackisch C. An overview of PARP inhibitors for the treatment of breast cancer. *Target Oncol* 2021;16(3):255–82. DOI: 10.1007/s11523-021-00796-4
 42. Robson M.E., Tung N., Conte P. et al. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline *BRCA* mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2019;30(4):558–66. DOI: 10.1093/annonc/mdz012
 43. Litton J.K., Rugo H.S., Ettl J. et al. Talazoparib in patients with advanced breast cancer and a germline *BRCA* mutation. *N Engl J Med* 2018;379(8):753–63. DOI: 10.1056/NEJMoa1802905
 44. Ayoub J.P., Wildiers H., Friedlander M. et al. Safety and efficacy of veliparib plus carboplatin/paclitaxel in patients with HER2-negative metastatic or locally advanced breast cancer: subgroup analyses by germline *BRCA1/2* mutations and hormone receptor status from the phase-3 BROCADE3 trial. *Ther Adv Med Oncol* 2021;13:17588359211059601. DOI: 10.1177/17588359211059601
 45. Rodler E., Sharma P., Barlow W.E. et al. Cisplatin with veliparib or placebo in metastatic triple-negative breast cancer and *BRCA* mutation-associated breast cancer (S1416): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2023;24(2):162–74. DOI: 10.1016/S1470-2045(22)00739-2
 46. Stefansson O.A., Hilmarsdottir H., Olafsdottir K. et al. *BRCA1* promoter methylation status in 1031 primary breast cancers predicts favorable outcomes following chemotherapy. *JNCI Cancer Spectr* 2019;4(2):pkz100. DOI: 10.1093/jncics/pkz100
 47. Kawachi A., Yamashita S., Okochi-Takada E. et al. *BRCA1* promoter methylation in breast cancer patients is associated with response to olaparib/eribulin combination therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2020;181(2):323–9. DOI: 10.1007/s10549-020-05647-w
 48. Glodzik D., Bosch A., Hartman J. et al. Comprehensive molecular comparison of *BRCA1* hypermethylated and *BRCA1* mutated triple negative breast cancers. *Nat Commun* 2020;11(1):3747. DOI: 10.1038/s41467-020-17537-2
 49. Rice J.C., Ozcelik H., Maxeiner P. et al. Methylation of the *BRCA1* promoter is associated with decreased *BRCA1* mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis* 2000;21(9):1761–5. DOI: 10.1093/carcin/21.9.1761
 50. Mo W., Liu Q., Lin C.C. et al. mTOR inhibitors suppress homologous recombination repair and synergize with PARP inhibitors via regulating SUV39H1 in *BRCA*-proficient triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22(7):1699–712. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1772

Вклад авторов

Д.А. Еналдиева, П.В. Криворотко, Е.К. Жильцова: написание текста статьи, обзор литературы по теме статьи;
 Р.В. Донских: научное редактирование;
 Л.Ф. Шайхелисламова, Л.П. Гиголаева: анализ и интерпретация данных;
 В.Ф. Семиглазов, Е.Н. Имянитов: редактирование.

Authors' contribution

D.A. Enalдиеva, P.V. Krivorotko, E.K. Zhiltsova: article writing, review of the literature on the topic of the article;
 R.V. Donskikh: scientific editing;
 L.F. Shaikhelislamova, L.P. Gigolaeva: analysis and interpretation of data;
 V.F. Semiglazov, E.N. Imyanitov: editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.А. Еналдиева / D.A. Enalдиеva: <https://orcid.org/0000-0002-2773-3111>
 П.В. Криворотко / P.V. Krivorotko: <https://orcid.org/0000-0002-4898-9159>
 Е.Н. Имянитов / E.N. Imyanitov: <https://orcid.org/0000-0003-4529-7891>
 Е.К. Жильцова / E.K. Zhiltsova: <https://orcid.org/0000-0002-2029-4582>
 Р.В. Донских / R.V. Donskikh: <https://orcid.org/0000-0002-9391-5327>
 Л.Ф. Шайхелисламова / L.F. Shaikhelislamova: <https://orcid.org/0000-0001-9623-3877>
 Л.П. Гиголаева / L.P. Gigolaeva: <https://orcid.org/0000-0001-7654-4336>
 В.Ф. Семиглазов / V.F. Semiglazov: <https://orcid.org/0000-0003-0077-9619>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-0266).

Funding. This study was supported by the Russian Science Foundation (grand No. 22-15-0266).

Статья поступила: 09.03.2023. **Принята к публикации:** 07.07.2023.

Article submitted: 09.03.2023. **Accepted for publication:** 07.07.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-15-23



Современное представление о факторах риска и механизмах развития рака молочной железы

Н.В. Павлова^{1,2}, С.С. Демин^{1,2}, М.И. Чурносков², И.В. Пономаренко²

¹ОГБУЗ «Белгородский областной онкологический диспансер»; Россия, 308010 Белгород, ул. Куйбышева, 1;

²ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»; Россия, 308015 Белгород, ул. Победы, 85

Контакты: Сергей Сергеевич Демин doctor.dyomin@gmail.com

В данном обзоре литературы изложены современные данные об этиопатогенезе и факторах риска рака молочной железы (РМЖ). Поиск источников осуществлялся в системах PubMed, Medline, Cochrane Library, eLIBRARY, NHGRI-EBI Catalog of GWAS. В анализ включены публикации с января 2000 г. по декабрь 2022 г. Взаимодействие определенных факторов риска, эндокринных стимулов и генетических нарушений обуславливает активацию/инактивацию разнообразных сигнальных путей, которые прямо или косвенно влияют на канцерогенез. По современным генетическим оценкам вклад наследственного компонента в формирование РМЖ достигает 40 %. При взаимодействии разнообразных факторов риска происходит формирование нескольких молекулярных подтипов карцином молочной железы, отличающихся по рецепторному статусу, клиническому течению и терапевтическим подходам. Детали взаимодействия этиопатогенетических факторов РМЖ неясны и часто имеют разнонаправленный характер. Матриксные металлопротеиназы (ММПs) регулируют механизмы пролиферации и апоптоза, инвазии и метастазирования, формирования микроокружения опухоли, неоангиогенеза, а также межгенных сигнальных взаимодействий, являясь важным звеном патогенеза РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, факторы риска, биологические механизмы, матриксные металлопротеиназы, молекулярные подтипы рака молочной железы

Для цитирования: Павлова Н.В., Демин С.С., Чурносков М.И., Пономаренко И.В. Современное представление о факторах риска и механизмах развития рака молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(3):15–23. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-15-23

Modern understanding of risk factors and mechanisms of breast cancer development

N.P. Pavlova^{1,2}, S.S. Dyomin^{1,2}, M.I. Churnosov², I.V. Ponomarenko²

¹Belgorod Regional Oncological Dispensary; 1 Kuibyshev St., Belgorod 308010, Russia;

²Belgorod State National Research University; 85 Pobedy St., Belgorod 308015, Russia

Contacts: Sergey Sergeevich Dyomin doctor.dyomin@gmail.com

The article presents current data on the etiopathogenesis and risk factors of breast cancer (BC). The search for the sources was carried out in the PubMed, Medline, Cochrane Library, eLIBRARY, NHGRI-EBI Catalog of GWAS systems, publications from January 2000 to December 2022 were included. The interaction of definite risk factors, endocrine stimuli and genetic disorders causes activation/inactivation of various signaling pathways that directly or indirectly affect carcinogenesis. According to modern genetic evaluations, the contribution of the hereditary component to the formation of BC reaches 40 %. Interactions between various risk factors form several molecular subtypes of breast carcinomas, differing in receptor status and clinical course, as well as therapeutic approaches. The details of the interaction of etiopathogenetic factors of BC are not clear, and often have a multidirectional character. Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate the mechanisms of proliferation and apoptosis, invasion and metastasis, formation of the tumor microenvironment, neoangiogenesis, as well as intergenic signaling interactions, being an important link in the pathogenesis of BC.

Keywords: breast cancer, risk factors, biological mechanisms, matrix metalloproteinases, molecular subtypes of breast cancer

For citation: Pavlova N.P., Dyomin S.S., Churnosov M.I., Ponomarenko I.V. Modern understanding of risk factors and mechanisms of breast cancer development. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2023;10(3):15–23. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-15-23

ВВЕДЕНИЕ

Настоящий обзор литературы посвящен раку молочной железы (PMЖ). Поиск интересующих источников осуществлялся в системах PubMed, Medline, Cochrane Library, eLIBRARY, NHGRI-EBI Catalog of GWAS. В анализ включены публикации с января 2000 г. по декабрь 2022 г. Поисковые запросы включали в себя данные о роли различных факторов риска в патогенезе PMЖ, разнообразных молекулярно-генетических маркеров в формировании опухолей женской репродуктивной системы, а также о распространенности и особенностях клинического течения данного заболевания в различных популяциях.

Рак молочной железы — злокачественная опухоль, исходящая из эпителия ткани молочной железы. В течение одного года в мире PMЖ заболевают более 2 млн женщин, и данный показатель неуклонно возрастает [1]. В Российской Федерации отмечается тенденция, соответствующая общемировой: за период 2008–2018 гг. стандартизованный показатель заболеваемости PMЖ увеличился с 42,83 до 51,63 на 100 тыс. населения при среднегодовом темпе прироста в 1,97 % [2]. Пики заболеваемости PMЖ в России приходятся на возрастные категории 70–74 года (147,85 на 100 тыс. человек), 65–69 лет (145,35 на 100 тыс. человек) и 75–79 лет (135,76 на 100 тыс. человек) [2]. Велика доля этой патологии и в структуре смертности женского населения нашей страны, особенно в возрастных группах 45–49 лет (23,01 %), 35–39 лет (22,71 %), 40–44 года (22,60 %), 50–54 года (22,44 %). Рак молочной железы является непосредственной причиной смерти каждой 4–5-й женщины, умершей в возрастном промежутке 35–54 лет [2].

Исследования, посвященные этиопатогенезу PMЖ, многочисленны, однако при этом не существует единой теории возникновения и развития данного заболевания. Реализация злокачественного фенотипа становится возможной благодаря взаимодействию различных генетических и эпигенетических нарушений, эндокринных стимулов, а также внешнесредовых воздействий в присутствии факторов риска [3–6].

ВКЛАД ОСНОВНЫХ ФАКТОРОВ РИСКА В ПАТОГЕНЕЗ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Согласно данным American Cancer Society, Breast Cancer Facts & Figures 2019–2020 [7], выделяют более 20 факторов возникновения и развития PMЖ, большинство из которых включены в современные модели расчета рисков изучаемого заболевания (Gail, Tytgert-Cusick, Rosner Colditz BCRAT, BCPRO и BOADICEA) [8] (см. таблицу). Вклад разнообразных факторов в риск развития заболевания может существенно различаться. В связи с этим целесообразно рассмотреть значимые звенья патогенеза PMЖ, условно разделив их на несколько этиопатогенетических групп. Очевидным значимым фактором риска развития PMЖ является женский пол [9]. Данное обстоятельство определяет начальные этапы канцерогенеза, ключевым

образом зависящие от действия эстрогенов (ERs) и прогестерона (PG) [3, 10]. Рак молочной железы у мужчин составляет менее 1 % опухолей этой локализации и занимает 0,3 % в структуре заболеваемости [2].

Другим независимым фактором риска возникновения PMЖ, который изучается многими исследовательскими коллективами, является возраст заболевших. Так, согласно данным Cancer Statistics Review [11], в настоящее время около 80 % пациентов с PMЖ составляют лица старше 50 лет, более 40 % — старше 65 лет. При этом риск развития PMЖ у пациентов в возрасте 40 составляет 1,5 %, в возрасте 50 лет и более — 3 %, в возрасте 70 лет — 4 %. Третьи негативный подтип PMЖ (ТНPMЖ) чаще диагностируется в группах больных моложе 40 лет, в то время как у пациентов старше 70 лет в основном наблюдается люминальный подтип А PMЖ [5].

Существенную роль в формировании и течении PMЖ играют гормональные и эндокринные факторы. Ожирение вносит вклад в канцерогенез, увеличивая уровень циркулирующих ERs, модулируя сигнальные каскады инсулиноподобного фактора роста 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) и поддерживая локальное и системное воспаление на фоне изменения экспрессии провоспалительных цитокинов, лептина, адипонектина и прочих адипокинов. В результате этого развивается супрессия генов клеточной дифференцировки, а также происходит активация генов, ответственных за ангиогенез и клеточный рост, что способствует эпителиально-мезенхимальному переходу [12, 13]. Жировая ткань участвует в синтезе ERs и определяет их уровень в постменопаузе, который прямо коррелирует с индексом массы тела (ИМТ). Продолжают считать, что при ожирении у больных PMЖ летальность и риск развития рецидивов выше на 30 % по сравнению с пациентками, имеющими аналогичный диагноз, но с нормальным ИМТ. Тем не менее К. Liu и соавт. [14] в недавнем обширном метаанализе, основанном на 12 проспективных когортных исследованиях среди 22 728 674 индивидуумов, определили, что каждые 5 кг/м² увеличения ИМТ соответствовали повышению риска возникновения PMЖ у женщин на 2 % (относительный риск (ОР) 1,02; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,01–1,04; $p < 0,001$). Однако также продемонстрировано, что более высокий ИМТ может быть фактором предупреждения развития PMЖ у женщин в пременопаузе (ОР 0,98; 95 % ДИ 0,96–0,99; $p < 0,001$). В основе данных закономерностей могут лежать следующие процессы: в постменопаузе более высокий уровень ER обусловлен ароматизацией андростендиона в избыточном объеме жировой ткани у пациенток с более высоким ИМТ, и наоборот, отрицательная связь между более высоким ИМТ и риском развития PMЖ у женщин в пременопаузе, вероятно, обусловлена защитным эффектом увеличения массы тела в ранние годы пременопаузы и является предиктором

Основные факторы риска развития рака молочной железы (РМЖ) [7]
The main risk factors of breast cancer (BC) [7]

Фактор Factor	Величина риска Risk value
Возраст старше 65 лет. Age above 65 years. Атипичная гиперплазия молочной железы. Atypical breast hyperplasia. Дольковая карцинома <i>in situ</i> . Lobular carcinoma <i>in situ</i> . Патологически значимые мутации генов <i>BRCA1/2, PALB2, P53</i> и др. Pathologically significant mutations in <i>BRCA1/2, PALB2, P53</i> genes et al.	>4,0
Протоковая карцинома <i>in situ</i> . Ductal carcinoma <i>in situ</i> . Высокий уровень половых гормонов (в постменопаузе). High level of sex hormones (in post-menopause). Высокодозное облучение грудной клетки (например, терапия лимфомы Ходжкина). High-dose radiation of the thoracic cage (for example, Hodgkin's lymphoma therapy). Маммографическая плотность молочной железы. Mammography density of the breast. Два и более родственника 1-й линии родства, имеющих РМЖ Two and more 1 st line relatives having breast cancer	2,1–4,0
Употребление алкоголя/особенности диеты/курение. Alcohol consumption/dietary choices/smoking. Раннее менархе (ранее 11 лет). Early menarche (before 11 years of age). Избыточная масса тела/метаболический синдром. Overweight/metabolic syndrome. Высокий уровень эстрогенов или тестостерона (в пременопаузе). High level of estrogens or testosterone (in pre-menopause). Поздний возраст первой доношенной беременности (>30 лет). Late age of first complete pregnancy (>30 years). Поздняя менопауза (>55 лет). Late menopause (>55 years). Отсутствие периода кормления грудью. Absence of breast feeding period. Недоношенные беременности. Incomplete pregnancies. Единственный родственник первой степени родства с РМЖ. Single 1 st line relative with breast cancer. Ожирение (в постменопаузе). Obesity (in post-menopause). Рак яичников или эндометрия в анамнезе. History of ovarian and endometrial cancer. Отсутствие должной физической активности. Absence of sufficient physical activity. Пролиферативные заболевания молочной железы без признаков атипии (обычная протоковая гиперплазия, фиброаденома). Proliferative diseases of the breast without atypical signs (common ductal hyperplasia, fibroadenoma). Недавнее и долгосрочное применение заместительной гормонотерапии, содержащей прогестины Recent and long-term use of hormone-replacement therapy containing progestins	1,1–2,0

Недавнее и долгосрочное применение гормональных контрацептивов. Recent and long-term use of hormonal contraceptives.	1,1–2,0
Высокий рост Tallness	

более длительных ановуляторных циклов, а следовательно, более низких уровней PG и ER.

Установлено, что увеличение роста на 10 см сопряжено с возрастанием риска развития РМЖ на 17 %. В качестве причины такой закономерности обсуждается роль как гормональных, так и генетических факторов. При этом у высоких женщин преобладают положительные в отношении наличия рецепторов ER и PR варианты РМЖ [15].

Сахарный диабет 2-го типа часто сочетается с ожирением (метаболический синдром). В общий патогенетический каскад вовлечены инсулин, инсулиноподобные факторы роста и их рецепторы, фактор некроза опухоли-α (tumor necrosis factor α, TNF-α), интерлейкин-6 (IL-6), ERs и адипокины. У больных сахарным диабетом 2-го типа в пременопаузе достоверно чаще развиваются фенотипические варианты РМЖ с отрицательным PR- и HER-2-статусом (HER-2 – human epidermal growth factor receptor 2, рецептор эпидермального фактора роста человека 2), а также базальноподобные опухоли [16].

В литературе широко обсуждается роль оральных контрацептивов и заместительной гормонотерапии в возникновении РМЖ. В одном из последних метаанализов установлено, что при использовании большинства современных оральных контрацептивов риск развития РМЖ незначителен, его увеличение по сравнению с общей популяцией характерно для женщин, постоянно принимающих или недавно закончивших принимать оральные контрацептивы, с риском возникновения РМЖ 1,24 в течение 5–10 лет [17].

Метаанализ, выполненный Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer [18] среди 108647 женщин в менопаузе со средним возрастом 65 лет, продемонстрировал, что заместительная гормонотерапия в менопаузе обуславливает больший риск развития инвазивного РМЖ. Также отмечено, что повышенный риск возникновения РМЖ отмечается у женщин, принимающих заместительную гормонотерапию постоянно, по сравнению с пациентками, ранее прервавшими ее. При сравнении рецепторного статуса опухолей у больных с РМЖ фенотипически чаще регистрировались ER-позитивные новообразования. Интересно, что риск развития РМЖ выше у женщин, принимающих препараты, содержащие ERs и прогестины (ОР 1,60; 95 % ДИ 1,52–1,69), чем у женщин, принимавших только эстрогенные препараты (ОР 1,17; 95 % ДИ 1,10–1,26). Такие закономерности могут быть обусловлены тем, что синтетические прогестины стимулируют «спящие» премалигнизированные клетки через сигнальный путь рецепторов PR [9].

Многочисленной группой факторов, вносящих существенный вклад в развитие РМЖ, являются особенности репродуктивного цикла женщины. К ним относятся возраст менархе, периодичность менструального цикла, время наступления менопаузы, возраст первых родов, количество родов, длительность и осложнения беременности, длительность грудного вскармливания [2, 5].

Возраст менархе характеризует функционирование эндокринной системы женщины (включая уровень половых гормонов), влияет на ее репродуктивный потенциал, а также развитие пролиферативных заболеваний женской половой сферы, эндокринной и сердечно-сосудистой патологии [19]. При этом большинство исследовательских групп отмечают существенную роль раннего возраста менархе (раньше 11–13 лет) в формировании повышенного риска возникновения РМЖ в течение жизни. Для таких женщин характерны ER- и PR-негативные фенотипы опухолей, а также склонность к метастазированию, риску развития рецидивов и неблагоприятный прогноз заболевания [20].

В метаанализе F. Islami и соавт. [21] показано, что длительность кормления грудью существенно снижает риск развития ТНРМЖ, не влияя на манифестацию ER-, PR- и HER2-позитивных фенотипов. M. Lambertini и соавт. [22] в расширенном метаанализе, посвященном влиянию родов на риск развития определенных суррогатных подтипов РМЖ, сообщили, что риск возникновения люминальных А и В фенотипов в целом снижен (ОР 0,75; 95 % ДИ 0,70–0,81; $p < 0,0001$) у всех рожавших женщин. Поздние роды (возраст женщины более 25 лет) повышают риск развития люминальных молекулярных подтипов РМЖ (ОР 1,15; 95 % ДИ 1,00–1,32; $p = 0,05$), но не влияют на риск развития трижды негативного и HER2-позитивного фенотипов РМЖ. Однако, если возраст первых родов 30 лет и более, то риск возникновения и развития HER2+-фенотипа РМЖ значительно возрастает (ОР 1,83; 95 % ДИ 1,31–2,56; $p = 0,02$). Также считается, что первые и каждые последующие роды снижают ОР на 7 % (95 % ДИ 5,0–9,0; $p < 0,0001$) [2].

R. Troisi и соавт. [13] показали, что ранний возраст первых родов, ранняя менопауза, длительность грудного вскармливания, а также преэклампсия во время беременности являются протективными факторами в отношении возникновения РМЖ, что обусловлено антиканцерогенной активностью хорионического гонадотропина человека, а также каскадом антиангиогенных реакций, возникающих при увеличении среднего артериального давления (AD_{cp}) на фоне преэклампсии. По данным Committees of the American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG Committee) [23], аборты, как спонтанные, так и индуцированные, не являются фактором риска возникновения и развития РМЖ.

По данным H.L. Olsson и M.L. Olsson [8], начало, длительность, периодичность и регулярность менстру-

ального цикла зависят от экспрессии гена 17- α -гидроксилазы (*CYP17*) и его вариантов по локусу rs743572, при этом большее количество менструаций до первой доношенной беременности и также высокая менструальная активность в течение жизни являются значимыми факторами риска возникновения РМЖ, а нерегулярные циклы способствуют возникновению доброкачественной пролиферативной патологии молочных желез.

E. Ubago-Guisado и соавт. [24] в рамках исследования EPIC установили, что употребление пищи, богатой волокнами, служит протективным фактором в отношении РМЖ у лиц, употребляющих алкоголь; гормональный паттерн, при котором наблюдаются низкие уровни глобулина, связывающего половые гормоны, и имеются более высокие уровни эстрадиола и тестостерона в плазме, обуславливает статистически значимую ассоциацию алкоголизации с ER-позитивным РМЖ в постменопаузе. Потребление жиров, содержащих транс-изомеры жирных кислот, связано с их высоким уровнем в плазме крови, сочетающимся с повышенным риском развития фенотипических вариантов РМЖ, отрицательным ER-статусом, в то время как повышенный синтез пальмитолеиновой кислоты (маркера липогенеза *de novo*) обуславливал увеличение общего риска развития РМЖ. По данным авторов, употребление овощей и некоторых фруктов наряду с увеличением плазменной концентрации α - и β -каротинов является протективным фактором в отношении злокачественных новообразований (ЗНО) молочной железы, не экспрессирующих рецепторы ERs.

Интересно, что изменения микробиоты кишечника при ожирении активируют независимые от ER пути канцерогенеза. Однако микробиота кишечника при РМЖ также способна вмешиваться в метаболизм ERs и ксеноэстрогенов, деконъюгируя последние β -глюкуронидазами и обеспечивая механизм энтерогепатической циркуляции гормонов, благодаря чему они в активных формах связываются с тканью молочных желез [25].

По данным A. McTiernan и соавт. [26], нормальная или повышенная физическая активность существенно (на 10–20 %) уменьшает риск возникновения РМЖ вследствие ее оптимизирующего влияния на процессы системного воспаления, уровень гормонов и энергетический баланс и при этом действует независимо от влияния ИМТ.

В качестве важного биологического фактора, связанного с риском развития РМЖ, рассматривается нарушение циркадных ритмов. Так, J. Hansen [27] показал, что ночная работа в молодом возрасте в течение продолжительного времени связана с повышенным риском возникновения РМЖ на фоне измененной выработки мелатонина. Также показана прямая связь курения (пассивного или активного) с риском развития РМЖ, особенно в периоде между менархе и первой доношенной беременностью [28].

N. Rivkind и соавт. [29] показали, что пролонгированная экспозиция низких доз ионизирующей радиации увеличивала риск возникновения РМЖ до 3 % (95 % ДИ 1,3–7,0) среди жительниц Брянской области, проживающих в зоне радиоактивного заражения после аварии на Чернобыльской атомной электростанции. Согласно исследованию Q. Zhang и соавт. [30], основным фактором развития вторичного РМЖ является экспозиция ионизирующей радиации во время радиологического лечения ранее существовавшей у пациентки карциномы молочной железы или лимфопролиферативных заболеваний.

Рентгенографическая плотность молочной железы прямо коррелирует с высоким риском развития РМЖ у женщин в пре- и постменопаузе. При этом у пациенток с высокой плотностью молочных желез появление ЗНО рентгенологически может быть не зафиксировано [31].

В отношении доброкачественной гиперплазии отмечена ключевая роль гистологической структуры ткани или наличия семейного анамнеза доброкачественных новообразований с локализацией в молочной железе как факторов, увеличивающих риск развития РМЖ. Показательно, что в случаях как дольковых, так и протоковых гиперплазий молочной железы среди всех возрастных групп риск возникновения инвазивного РМЖ или карциномы *in situ* в течение 5 лет наблюдения от возраста манифестации гиперплазии составлял 7,6 % (95 % ДИ 5,9–9,3 %), в течение 10 лет – 25,1 % (95 % ДИ 20,7–29,2 %), в течение 15 лет – 40,1 % (ДИ 32,8–46,6 %) [32]. Доказан также крайне высокий риск возникновения рецидива РМЖ или контралатерального поражения вследствие имеющегося или излеченного ЗНО этой локализации [33].

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Многими авторами показано, что семейный анамнез существенно влияет на возникновение карцином молочной железы, при этом, чем больше заболевших индивидуумов первой степени родства в возрасте моложе 50 лет, тем выше риск манифестации заболевания. Данная закономерность может быть обусловлена рядом факторов. Разнообразные генетические дефекты на различных уровнях, а также эпигенетические изменения могут действовать относительно изолированно или сочетаться с экспозицией однотипных факторов окружающей среды, действующих в качестве потенциальных триггеров формирования РМЖ в условиях сходных внутрисемейных генотипов, с чем связано формирование так называемых «раковых семей» [34].

Очевидно, что размножение, дифференцировка и метаболизм клеток опухоли зависят от активности триггеров, в роли которых рассматриваются различные генетические и эпигенетические факторы, влияющие на сигнальные пути основных гормонов-регуляторов [2, 4]. При этом наследуемость при РМЖ

складывается из взаимодействий различных факторов. По современным генетическим оценкам вклад наследственного компонента в формирование РМЖ достигает 31 % [35].

Полногеномные ассоциативные исследования РМЖ (GWASs) демонстрируют, что более 180 различных однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNPs) имеют связь с этой патологией [36]. Следует отметить, что такие полиморфные локусы объясняют лишь 18 % наследуемости заболевания [37]. Очевидно, что, несмотря на активное изучение генетических основ РМЖ на протяжении последних десятилетий, значительная часть генетических детерминант (более 40 %), участвующих в возникновении заболевания, на сегодняшний день остаются неизвестными [38].

Прямо влияют на риск канцерогенеза генетические изменения в генах восприимчивости к РМЖ 1-го и 2-го типов (*BRCA1* и *BRCA2*) (40 и 20 % соответственно), которые являются высокопенетрантными опухолевыми супрессорами. Их мутации в подавляющем большинстве герминальные, наследуемые по аутосомно-доминантному типу, однако также существуют примеры спорадических мутаций и эпигенетические изменения их экспрессии (например, аномальное метилирование); все эти факторы ведут к потере гетерозиготности. Считается, что *BRCA*-ассоциированный РМЖ составляет 5–10 % всех случаев заболевания, 15–20 % случаев семейного и до 25 % наследственно-го РМЖ [39, 40].

Показано, что потеря функции гена *BRCA1* обуславливает развитие опухолей молочной железы высокой степени злокачественности, ТНРМЖ, а мутации в гене *BRCA2* ведут к развитию ER+/PR+-рака с частым развитием III и IV стадий. По сравнению с женщинами в общей популяции, у которых риск развития РМЖ к 80 годам составляет 10 %, у женщин с патогенными вариантами *BRCA1* и *BRCA2* он оценивается до 70 % [33].

Моногенные мутации в других локусах также связаны с повышенным риском развития РМЖ, например, локализующиеся в генах *TP53* (ассоциирован с синдромом Ли–Фраумени), *PTEN* (синдром Каудена), *STK11* (синдром Пейтца–Егерса) и *CDH1* (ассоциирован с синдромом диффузного рака желудка и долькового РМЖ) [7].

Эпигенетический профиль опухолевой клетки также рассматривается как один из важных факторов опухолевой прогрессии РМЖ. Так, S. Karsli-Cerpioglu и соавт. [41] показали, что гиперметилирование генов *BRCA1*, *p16*, *GSTP1* и *CHD1* является значимым в инвазии и метастазировании РМЖ, а аналогичные изменения промотера гена *ADAM23* выявлены в опухолях у пациентов с III и IV стадиями РМЖ.

Метилирование в гистонах H3K9, H3K27 и H4K20 связано со снижением экспрессии или выключением данных генов и увеличивает вероятность метастазирования РМЖ [42]. Установлено, что многие гистоны

(H3K9ac, H4K16ac, H4K16ac, H3K18ac) связаны с транскрипционно активными промоторными регионами различных генов (*CD324*, *p53*, *ERBB2*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR*, *BRCA1*).

Глобальное гипoaцетилирование H3K18Ac ассоциировано с формированием базальноподобных и HER2-позитивных опухолей, а его высокие уровни связаны с формированием карцином молочной железы с повышенной экспрессией ER/PR, E-кадгерина и BRCA1, а также с низкой экспрессией клеточного опухолевого антигена (p53) и HER-2. Таким образом, низкий уровень ацетилирования H3K18Ac коррелирует с неблагоприятным исходом, а повышенный — с высокими показателями безрецидивной выживаемости и отсутствием отдаленного метастазирования [43].

Процессы фосфорилирования гистонов также детерминируют канцерогенез. Установлено, что у больных РМЖ с высокой экспрессией гистона phosphoH3 наблюдаются низкие показатели выживаемости за счет раннего метастазирования [44].

Согласно данным А. Asiaf и соавт. [45], в клетках опухолевой ткани существуют различия экспрессии микроРНК и их белков-мишеней по сравнению с нормальными структурами. В частности, гиперэкспрессия miR-21 активирует онкогены *BCL2*, *TPM1*, *PDCD4*, *PTEN*; снижение экспрессии miR-206 приводит к увеличению плотности рецепторов ER α ; miR-193b, напротив, ингибирует синтез ER α ; экспрессия miR-205 влияет на гены *ERBB3*, *VEGF-A*, *ZEB1*, *ZEB2*, регулируя эпителиально-мезенхимальный переход; мишенью miR-146a и miR-146b является эпителиальный фактор роста (epidermal growth factor, EGF), активация которого в опухолевой ткани снижает метастатический потенциал; гиперэкспрессия miR-204 и miR-510 увеличивает синтез простатзависимого фактора E-26 (PDEF).

В связи с тем что РМЖ является гетерогенным заболеванием, имеющим несколько патогенетических разновидностей, большое значение для развития определенного типа опухоли, ее клинических проявлений, течения и прогноза имеют рецепторный статус ЗНО и активация определенных сигнальных путей различными стимулами [46].

Согласно Н.Н. Hilton и соавт. [10], ER/PR-опосредованные сигнальные пути обуславливают превосходство пролиферативных сигналов, направленных на выживание клетки, над стимулами апоптоза и клеточной смерти, в том числе благодаря увеличению экспрессии рецепторов протеина В-клеточной лимфомы 2-го типа (*BCL2*), являющегося антиапоптотическим протоонкогеном. Н.Б. Чагай и А.М. Мкртумян [3] указывают, что патогенез РМЖ зависит от изменения биологических эффектов ERs с собственно гормонального на генотоксический, в частности при процессах метилирования.

Гормональнозависимые ЗНО составляют до 80 % в популяции заболевших, тем не менее оставшаяся часть неоплазий молочной железы экспрессирует разнооб-

разные рецепторы эстроген-независимых сигнальных путей, обеспечивая персистенцию и пролиферацию опухолевых клеток при ингибировании сигнальных путей ERs и PG [47].

Многими исследователями показано, что 15–20 % ЗНО молочной железы демонстрируют повышенную экспрессию HER2, что связано с ранним метастазированием и снижением показателей выживаемости [48].

Различными авторами обсуждается патогенетическая роль IGF-1. Отмечено увеличение на 30 % риска развития РМЖ у женщин с повышенными уровнями IGF-1 в сыворотке крови по сравнению с женщинами, имевшими нормальные или низкие его концентрации, при этом продемонстрированы значимые ассоциации между концентрацией IGF-1 и повышенным риском развития РМЖ для всех суррогатных подтипов [49].

Фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) является основным регулятором ангиогенеза, активируя свой сигнальный путь с помощью трансмембранных рецепторов VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Он связан с экстрацеллюлярным матриксом (ЭЦМ) и высвобождается путем MMP-протеолиза. При этом экспрессия VEGF зависит от результирующего влияния ERs, оксида азота (NO) и других факторов роста (фактора роста фибробластов 2 (fibroblast growth factor 2, FGF-2), фактора роста фибробластов 4 (fibroblast growth factor 4, FGF-4), фактора роста тромбоцитов (platelet-derived growth factor, PDGF), TNF- α , EGF, трансформирующего фактора роста β (transforming growth factor β , TGF- β), фактора роста кератиноцитов (keratinocyte growth factor, KGF), IL-6, интерлейкина-1 β (IL-1 β) и IGF-1) на фоне пониженного синтеза генов-супрессоров опухоли (*p53* и *pVHL*) [50].

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С МИКРООКРУЖЕНИЕМ ОПУХОЛИ

Н. Mahmood и соавт. [51] указали на значимую роль системы активатора плазминогена в разрушении ЭЦМ посредством активации плазмина или MMPs; при этом деградация ЭЦМ высвобождает различные факторы роста, а также влияет на процессы метастазирования.

Микроокружение опухоли включает ЭЦМ, стромальные клетки (эндотелиальные и иммунные), фибробласты и адипоциты. Основными ферментами, регулирующими состояние ЭЦМ, являются матриксные металлопротеиназы (MMPs) и их тканевые ингибиторы (TIMP) [52].

Проведенные зарубежные исследования показали значимую роль MMPs в канцерогенезе РМЖ [53, 54]. Семейство MMPs — это пул эндопептидаз, содержащих ионы Zn²⁺ и Ca²⁺ в своих активных сайтах. Значимыми их представителями являются неспецифические коллагеназы (MMP-1, -8, -13); желатиназы, или специфические

коллагеназы коллагена 4-го типа (MMP-2 и MMP-9), стромелизины (MMP-3 и MMP-10), матрилизины (MMP-7 и MMP-26) и мембранные MMPs (MMP-14, -15, -16, -24) [55, 56].

Тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ (TIMP-1–4) связываются с Zn²⁺-связывающими сайтами активных MMPs в эквимольном соотношении. С этими процессами ассоциированы MMP-опосредованное высвобождение и активация факторов роста, TNF- α , TNF- β , IL-6, IL-10 и других цитокинов, а также VEGF [52].

Дисбаланс MMPs вызывает повреждение ДНК и нестабильность генома [57]. Рассматривают несколько функций MMPs, ответственных за канцерогенез: регуляция клеточной пролиферации и апоптоза; формирование микроокружения опухоли; обеспечение инвазии и метастазирования; некаталитическое влияние на межгенные взаимодействия в качестве сигнальных молекул; активация неоангиогенеза и эпителиально-мезенхимального перехода [53].

Было показано, что MMP-3, -9, -7 и -15 индуцируют эпителиально-мезенхимальный переход в различных типах клеток посредством деградации E-кадгерина, а их активация находится под контролем TGF- β . Экспрессия MMP-14 опухолевыми клетками может запускать эпителиально-мезенхимальный переход в рядом расположенных клетках посредством паракринного действия TGF- β . Интересно, что мезенхимоподобные опухолевые клетки возвращаются к стабильному эпителиальному фенотипу, когда стромальная активация TGF- β , регулируемая MMP-14, ингибируется, несмотря на эндогенную экспрессию прочих MMPs в опухолевых клетках [55].

Гиперэкспрессия MMP-1 влияет на синтез протеинов с-Мус, р-АКТ, АКТ и Vcl-2, а также ВАХ и каспазы-3, что подразумевает раннее метастазирование и развитие ТНРМЖ [56]. Участие MMP-2 в деструкции базальной мембраны приводит к развитию инвазивных карцином молочной железы, так как фермент секретируется и активируется на границе нормальной и опухолевой тканей [54].

В работе S. Quintero-Fabián и соавт. [58] показано, что MMP-3, разрушая плазминоген, запускает выде-

ление ангиостатина, который ингибирует ангиогенез и способен влиять на синтез FGF, являющегося мощным эндотелиальным митогеном, одновременно активируя MMP-9. Также авторы продемонстрировали, что MMP-8 под активирующим влиянием TNF- α и IL-6 обеспечивает ангиогенез.

Матриксная металлопротеиназа 9 является триггером активации неоангиогенеза путем стабилизации капилляров, сформированных *de novo*, что модулирует сосудистую проницаемость и функции эндотелиоцитов [55]. При этом значимое увеличение экспрессии MMP-9 в клетках карцином молочной железы по сравнению с нормальными структурами позволяет считать эту матриксную металлопротеиназу значимым прогностическим маркером во всех суррогатных подтипах. Например, ее гиперэкспрессия в опухоли является однозначным признаком ТНРМЖ и HER2-позитивного РМЖ. Также повышенный уровень MMP-9 в сыворотке крови в совокупности с другими биомаркерами (нейрон-специфическая енолаза и белок внеклеточного домена HER2) является показателем метастатического поражения головного мозга при РМЖ [59]. В очаге поражения повышенная экспрессия MMPs (MMP-1, -2, -9 и др.) индуцирует рост опухолевой ткани и инициирует ее инвазию и метастазирование. Имеются убедительные данные о связи MMPs с выживаемостью пациентов с РМЖ [60].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, согласно анализу данных о действии различных этиопатогенетических факторов РМЖ существуют многочисленные пути развития канцерогенеза на различных уровнях. Детали взаимодействия упомянутых механизмов неясны, а их влияние на канцерогенез часто носит разнонаправленный характер. Таким образом, важной задачей является поиск универсальных путей канцерогенеза (инвазии, метастазирования, эпителиально-мезенхимального перехода и лизиса опухолей). В качестве значимых регуляторов могут рассматриваться MMPs, глубоко влияющие на основные этапы опухолевой прогрессии. В связи с этим изменение экспрессии MMPs может считаться важным фактором развития различных типов карцином молочной железы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview. *Int J Cancer* 2021. DOI: 10.1002/ijc.33588
2. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. Malignant neoplasms in Russia in 2018 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, G.V. Petrova. Moscow: P.A. Herzen Moscow State Medical Research Institute – branch of the Federal State Budgetary Institution “NMIC of Radiology” of the Ministry of Health of Russia, 2019. (In Russ.).
3. Портной С.М. Основные риски развития рака молочной железы и предложения по его профилактике. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2018;14(3):25–39. Portnoy S.M. The main risks of breast cancer and suggestions for its prevention. *Opuholi zhenskoj reproduktivnoj sistemy = Tumors of the female reproductive system* 2018;14(3):25–39. (In Russ.).
4. Чагай Н.Б., Мкртумян А.М. Метаболизм эстрогенов, прижизненные нарушения процессов метилирования и рак молочной

- железы. Проблемы эндокринологии 2019;65(3):161–73. DOI: 10.14341/probl10070
- Chagai N.B., Mkrtumayn A.M. Estrogen metabolism, lifetime methylation disorders, and breast cancer. Problemy Endokrinologii = Problems of endocrinology 2019;65(3):161–73. (In Russ.). DOI: 10.14341/probl10070
5. Lukasiewicz S., Czezelewski M., Forma A. et al. Breast cancer – epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies – an updated review. *Cancers* 2021;13(17):4287. DOI: 10.3390/cancers13174287
 6. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57–70. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9
 7. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2019–2020. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2019.
 8. Olsson H.L., Olsson M.L. The menstrual cycle and risk of breast cancer: a review. *Front Oncol* 2020;10:21. DOI: 10.3389/fonc.2020.00021
 9. Hilton H.N., Clarke C.L. Impact of progesterone on stem/progenitor cells in the human breast. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2015;20(1–2):27–37. DOI: 10.1007/s10911-015-9339-y
 10. Hilton H.N., Clarke C.L., Graham J.D. Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development. *Mol Cell Endocrinol* 2018;466:2–14. DOI: 10.1016/j.mce.2017.08.011
 11. Howlader N., Noone A.M., Krapcho M. et al. SEER cancer statistics review, 1975–2016, National Cancer Institute. Bethesda. Available at: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/.
 12. Gallagher E.J., LeRoith D. Obesity and diabetes: the increased risk of cancer and cancer-related mortality. *Physiol Rev* 2015;95(3):727–48. DOI: 10.1152/physrev.00030.2014
 13. Troisi R., Bjørge T., Gissler M. et al. The role of pregnancy, perinatal factors and hormones in maternal cancer risk: a review of the evidence. *J Intern Med* 2018;283(5):430–45. DOI: 10.1111/joim.12747
 14. Liu K., Zhang W., Dai Z. et al. Association between body mass index and breast cancer risk: evidence based on a dose-response meta-analysis. *Cancer Manag Res* 2018;10:143–51. DOI: 10.2147/CMAR.S144619
 15. Elands R.J.J., Offermans N.S.M., Simons C.C.J.M. et al. Associations of adult-attained height and early life energy restriction with postmenopausal breast cancer risk according to estrogen and progesterone receptor status. *Int J Cancer* 2019;144(8):1844–57. DOI: 10.1002/ijc.31890
 16. Kang C., LeRoith D., Gallagher E.J. Diabetes, obesity, and breast cancer. *Endocrinology* 2018;159(11):3801–12. DOI: 10.1210/en.2018-00574
 17. Marsden J. Hormonal contraception and breast cancer, what more do we need to know? *Post Reproductive Health* 2017;23(3):116–27. DOI: 10.1177/2053369117715370
 18. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence. *Lancet* 2019;394(10204):1159–68. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)31709-X
 19. Johnatty S.E., Stewart C.J.R., Smith D. et al. Co-existence of leiomyomas, adenomyosis and endometriosis in women with endometrial cancer. *Sci Rep* 2020;10(1):3621. DOI: 10.1038/s41598-020-59916-1
 20. Minami Y., Nishino Y., Kawai M. et al. Reproductive history and breast cancer survival: a prospective patient cohort study in Japan. *Breast Cancer* 2019;26(6):687–702. DOI: 10.1007/s12282-019-00972-5
 21. Islami F., Liu Y., Jemal A. et al. Breastfeeding and breast cancer risk by receptor status – a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol* 2015;26(12):2398–407. DOI: 10.1093/annonc/mdv379
 22. Lambertini M., Del Mastro L., Pescio M.C. et al. Cancer and fertility preservation: international recommendations from an expert meeting. *BMC Med* 2016;14:1. DOI: 10.1186/s12916-015-0545-7
 23. ACOG committee opinion. Breast-ovarian cancer screening. Number 239, August 2000. American College of Obstetricians and Gynecologists. Committee on genetics. *Int J Gynaecol Obstet* 2001;75(3):339–40.
 24. Ubago-Guisado E., Rodríguez-Barranco M., Ching-López A. et al. Evidence update on the relationship between diet and the most common cancers from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study: a systematic review. *Nutrients* 2021;13(10):3582. DOI: 10.3390/nu13103582
 25. Laborda-Illanes A., Sanchez-Alcoholado L., Dominguez-Recio M.E. et al. Breast and gut microbiota action mechanisms in breast cancer pathogenesis and treatment. *Cancers (Basel)* 2020;12(9):2465. DOI: 10.3390/cancers12092465
 26. McTiernan A., Friedenreich C.M., Katzmarzyk P.T. et al. Physical activity in cancer prevention and survival: a systematic review. *Med Sci Sports Exerc* 2019;51(6):1252–61. DOI: 10.1249/MSS.0000000000001937
 27. Hansen J. Night shift work and risk of breast cancer. *Curr Environ Health Rep* 2017;4(3):325–39. DOI: 10.1007/s40572-017-0155-y
 28. Dossus L., Boutron-Ruault M.C., Kaaks R. et al. Active and passive cigarette smoking and breast cancer risk: results from the EPIC cohort. *Int J Cancer* 2014;134(8):1871–88. DOI: 10.1002/ijc.28508
 29. Rivkind N., Stepanenko V., Belukha I. et al. Female breast cancer risk in Bryansk Oblast, Russia, following prolonged low dose rate exposure to radiation from the Chernobyl power station accident. *Int J Epidemiol* 2020;49(2):448–56. DOI: 10.1093/ije/dyz214
 30. Zhang Q., Liu J., Ao N. et al. Secondary cancer risk after radiation therapy for breast cancer with different radiotherapy techniques. *Sci Rep* 2020;10(1):1220. DOI: 10.1038/s41598-020-58134-z
 31. Kim E.Y., Chang Y., Ahn J. et al. Mammographic breast density, its changes, and breast cancer risk in premenopausal and postmenopausal women. *Cancer* 2020;126(21):4687–96. DOI: 10.1002/cncr.33138
 32. Mazzola E., Coopey S.B., Griffin M. et al. Reassessing risk models for atypical hyperplasia: age may not matter. *Breast Cancer Res Treat* 2017;165(2):285–91. DOI: 10.1007/s10549-017-4320-7
 33. Almansour N.M. Triple-negative breast cancer: a brief review about epidemiology, risk factors, signaling pathways, treatment and role of artificial intelligence. *Front Mol Biosci* 2022;9:836417. DOI: 10.3389/fmolb.2022.836417
 34. Shiyabola O.O., Arao R.F., Miglioretti D.L. et al. Emerging trends in family history of breast cancer and associated risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2017;26(12):1753–60. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-17-0531
 35. Mucci L.A., Hjelmborg J.B., Harris J.R. et al. Familial risk and heritability of cancer among twins in nordic countries. *JAMA* 2016;315(1):68–76. DOI: 10.1001/jama.2015.17703
 36. Buniello A., MacArthur J.A.L., Cerezo M. et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D1005–12. DOI: 10.1093/nar/gky1120
 37. Michailidou K., Hall P., Gonzalez-Neira A. et al. Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat Genet* 2013;45(4):353–361e3612. DOI: 10.1038/ng.2563
 38. Pavlova N., Demin S., Churnosov M. et al. The modifying effect of obesity on the association of matrix metalloproteinase gene polymorphisms with breast cancer risk. *Biomedicines* 2022;10(10):2617. DOI: 10.3390/biomedicines10102617
 39. Tung N., Lin N.U., Kidd J. et al. Frequency of germline mutations in 25 cancer susceptibility genes in a sequential series of patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2016;34(13):1460–8. DOI: 10.1200/JCO.2015.65.0747
 40. Павлова Н.В., Орлова В.С., Батлуцкая И.В. и др. Роль высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2* в характере ассоциаций полиморфизма генов матричных металлопротеиназ с раком молочной железы. Научные результаты биомедицинских исследований 2022;8(2):180–97. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-4
 - Pavlova N.V., Orlova V.S., Batlutskaya I.V. et al. The role of highly penetrant mutations in *BRCA1* and *CHEK2* genes in the pattern

- of associations of matrix metalloproteinase gene polymorphisms with breast cancer. *Nauchnye rezultaty biomedicinskih issledovanij = Research Results in Biomedicine* 2022;8(2): 180–97. (In Russ.). DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-4
41. Karli-Çeppioglu S., Dagdemir A., Judes G. et al. Epigenetic mechanisms of breast cancer: an update of the current knowledge. *Epigenomics* 2014;6(6):651–64. DOI: 10.2217/epi.14.59
 42. Romagnolo D.F., Daniels K.D., Grunwald J.T. et al. Epigenetics of breast cancer: Modifying role of environmental and bioactive food compounds. *Mol Nutr Food Res* 2016;60(6):1310–29. DOI: 10.1002/mnfr.201501063
 43. Hałasa M., Wawruszak A., Przybyszewska A. et al. H3K18Ac as a marker of cancer progression and potential target of anti-cancer therapy. *Cells* 2019;8(5):485. DOI: 10.3390/cells8050485
 44. Cui X., Harada S., Shen D. et al. The utility of phosphohistone H3 in breast cancer grading. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2015;23(10):689–95. DOI: 10.1097/PAI.000000000000137
 45. Asiaf A., Ahmad S.T., Arjumand W., Zargar M.A. MicroRNAs in breast cancer: diagnostic and therapeutic potential. *Methods Mol Biol* 2018;1699:23–43. DOI: 10.1007/978-1-4939-7435-1_2
 46. Имянитов Е.Н. Биология рака молочной железы. *Практическая онкология* 2017;18(3):221–31. DOI: 10.31917/1803221
Imyanitov E.N. Biology of breast cancer. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology* 2017;18(3):221–31. (In Russ.). DOI: 10.31917/1803221
 47. Ianza A., Sirico M., Bernocchi O., Generali D. Role of the IGF-1 axis in overcoming resistance in breast cancer. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:641449. DOI: 10.3389/fcell.2021.641449
 48. Borgquist S., Zhou W., Jirstrom K. et al. The prognostic role of HER2 expression in ductal breast carcinoma in situ (DCIS); a population-based cohort study. *BMC Cancer* 2015;15:468. DOI: 10.1186/s12885-015-1479-3
 49. Murphy N., Knuppel A., Papadimitriou N. et al. Insulin-like growth factor-1, insulin-like growth factor-binding protein-3, and breast cancer risk: observational and Mendelian randomization analyses with 430 000 women. *Ann Oncol* 2020;31(5):641–9. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.01.066
 50. Shibuya M., Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006;312(5):549–60. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.11.012
 51. Mahmood N., Mihalciou C., Rabbani S.A. Multifaceted role of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): diagnostic, prognostic, and therapeutic applications. *Front Oncol* 2018;8:24. DOI: 10.3389/fonc.2018.00024
 52. Zajkowska M., Gacuta E., Kozłowska S. et al. Diagnostic power of VEGF, MMP-9 and TIMP-1 in patients with breast cancer. A multivariate statistical analysis with ROC curve. *Adv Med Sci* 2019;64(1):1–8. DOI: 10.1016/j.advms.2018.07.002
 53. Radisky E.S., Radisky D.C. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2015;20(7):1144–63. DOI: 10.2741/4364
 54. Kaczorowska A., Miękus N., Stefanowicz J., Adamkiewicz-Drożyńska E. Selected matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-7) and their inhibitor (TIMP-2) in adult and pediatric cancer. *Diagnostics (Basel)* 2020;10(8):547. DOI: 10.3390/diagnostics10080547
 55. Conlon G.A., Murray G.I. Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 2019;247(5):629–40. DOI: 10.1002/path.5225
 56. Wang Q.M., Lv L., Tang Y. et al. MMP-1 is overexpressed in triple-negative breast cancer tissues and the knockdown of MMP-1 expression inhibits tumor cell malignant behaviors in vitro. *Oncol Lett* 2019;17(2):1732–40. DOI: 10.3892/ol.2018.9779
 57. Москаленко М.И. Вовлеченность генов матриксных металлопротеиназ в формирование артериальной гипертензии и ее осложнений (обзор). *Научные результаты биомедицинских исследований* 2018;4(1):53–69. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-1-53-69
Moskalenko M.I. The involvement of genes of matrix metalloproteinases in the development of arterial hypertension and its complication (review). *Nauchnye rezultaty biomedicinskih issledovanij = Research Results in Biomedicine* 2018; 4(1):53–69. (In Russ.). DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-1-53-69
 58. Quintero-Fabián S., Arreola R., Becerril-Villanueva E. et al. Role of matrix metalloproteinases in angiogenesis and cancer. *Front Oncol* 2019;9:1370. DOI: 10.3389/fonc.2019.01370
 59. Huang H. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances. *Sensors (Basel)* 2018;18(10):3249. DOI: 10.3390/s18103249
 60. Pavlova N., Demin S., Churnosov M. et al. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms are associated with breast cancer in the caucasian women of Russia. *Int J Mol Sci* 2022;23(20):12638. DOI: 10.3390/ijms232012638

Вклад авторов

Н.В. Павлова: обзор публикаций по теме статьи, анализ данных;
С.С. Демин: написание текста статьи, обзор публикаций по теме статьи;
М.И. Чурносков: анализ данных;
И.В. Пономаренко: обзор публикаций по теме статьи, анализ данных.

Authors' contribution

N.V. Pavlova: review of publications on the topic of the article, data analysis;
S.S. Dyomin: article writing, review of publications on the topic of the article;
M.I. Churnosov: data analysis;
I.V. Ponomarenko: review of publications on the topic of the article, data analysis.

ORCID авторов / ORCID authors

Н.В. Павлова / N.P. Pavlova: <https://orcid.org/0000-0002-7754-5231>
С.С. Демин / S.S. Dyomin: <https://orcid.org/0000-0002-9956-4775>
М.И. Чурносков / M.I. Churnosov: <https://orcid.org/0000-0003-1254-6134>
И.В. Пономаренко / I.V. Ponomarenko: <https://orcid.org/0000-0002-5652-0166>

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

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

Статья поступила: 29.04.2023. **Принята к публикации:** 08.08.2023.
Article submitted: 29.04.2023. **Accepted for publication:** 08.08.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-24-35



Молекулярные механизмы полового диморфизма в канцерогенезе

Г.А. Белицкий¹, К.И. Кирсанов^{1,2}, Е.А. Лесовая^{1,3}, В.П. Максимова¹, Л.В. Кривошеева¹, М.Г. Якубовская^{1,2}

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

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

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

Контакты: Марианна Геннадиевна Якубовская mgyakubovskaya@mail.ru

Заболеваемость злокачественными новообразованиями непродуктивных органов, как карциномами, так и саркомами, и смертность от них у мужчин в 1,5 раза выше, чем у женщин. В основе этого лежат генетические различия, на которые накладываются закономерности эпигенетической регуляции экспрессии генов половых хромосом, определяющие половые различия в процессах дифференцировки тканей и гормонального статуса организма. По сравнению с Y-хромосомой на X-хромосоме млекопитающих находится в несколько десятков раз больше генов, кодирующих основные регуляторы пролиферации, метаболизма, иммунитета и ингибирования опухолевого роста, а также X-сцепленных микроРНК, влияющих на транскрипционные факторы и перекрестную регуляцию другими некодирующими РНК. В результате образуется профиль экспрессии генов по женскому и мужскому типам, обуславливающий фенотипические различия. Этот факт наряду с тем, что в женских клетках в некоторых важнейших генах второй инактивированной X-хромосомы происходит снятие эпигенетической репрессии и, соответственно, удвоение уровня экспрессии, может в значительной степени объяснить «половое неравенство» в канцерогенезе. Существенный вклад в это различие вносят влияние половых гормонов и неравенство в выраженности противоопухолевого иммунитета. Детальное исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе полового диморфизма в канцерогенезе, будет существенным вкладом в фундаментальную онкологию, практику диагностики, прогноза и персонализированного лечения злокачественных новообразований с учетом особенностей их течения у мужчин и женщин. Особенно актуальны такие исследования в отношении недостаточно изученных сарком мягких тканей, соотношение частоты возникновения которых у мужчин и женщин сильно варьирует в зависимости от гистологического подтипа опухоли.

Ключевые слова: канцерогенез, половой диморфизм, X-хромосома, Y-хромосома, микроРНК, половые гормоны, противоопухолевый иммунитет

Для цитирования: Белицкий Г.А., Кирсанов К.И., Лесовая Е.А. и др. Молекулярные механизмы полового диморфизма в канцерогенезе. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(3):24–35. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-24-35

Sexual dimorphism in cancer

G.A. Belitsky¹, K.I. Kirsanov^{1,2}, E.A. Lesovaya^{1,3}, V.P. Maksimova¹, L.V. Krivosheeva¹, M.G. Yakubovskaya^{1,2}

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

²I.P. Pavlov Ryazan State Medical University; 9 Vysokovol'tnaya St., Ryazan 390026, Russia;

³Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

Contacts: Marianna Gennadievna Yakubovskaya mgyakubovskaya@mail.ru

The incidence and mortality of malignant neoplasms of non-reproductive organs both carcinomas and sarcomas in men is one and a half times higher than in women. This is based on genetic differences, which are superimposed by patterns of epigenetic regulation of the expression of sex chromosome genes that determine sex differences in the processes of tissue differentiation, which, in turn, mediates the formation of the hormonal status of the body. Compared to the Y chromosome, the mammalian X chromosome contains several dozen times more genes encoding major regulators of proliferation, metabolism, immunity, and tumor growth inhibitors, as well as X-linked microRNAs affecting transcription factors and cross-regulation by other non-coding RNAs. This results in a female or male gene expression profile that accounts for phenotypic differences. This peculiarity, along with the fact that in female cells on the second inactivated

X chromosome epigenetic repression of the most important genes is reversed and, accordingly, their expression level is doubled, may largely explain the sex disparity in carcinogenesis. The influence of sex hormones and disparity in the expression of antitumor immunity contribute significantly to this difference. A detailed study of the mechanisms underlying sex dimorphism in carcinogenesis will be an essential contribution to fundamental oncology and to the practice of diagnosis, prognosis and personalized treatment of malignancies with regard to their gender-specific course. These studies are especially relevant in relation to insufficiently studied soft tissue sarcomas, the ratio of the frequencies of which in men and women varies greatly depending on the histological subtype of the tumor.

Keywords: carcinogenesis, sexual dimorphism, X chromosome, Y chromosome, microRNA, sex hormones, antitumor immunity

For citation: Belitsky G.A., Kirsanov K.I., Lesovaya E.A. et al. Sexual dimorphism in cancer. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2023;10(3):24–35. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-24-35

ВВЕДЕНИЕ

С эволюционной точки зрения половой диморфизм в патологии можно рассматривать как подмножество более общего явления количественной разницы в таких всеобъемлющих фенотипических проявлениях, как старение и продолжительность жизни. Половые различия наблюдаются при многих заболеваниях человека. Помимо злокачественных новообразований (ЗНО) и аутоиммунных заболеваний к ним относятся психические расстройства, эндокринные, сердечно-сосудистые и другие патологии. Кроме того, мужчины и женщины по-разному переносят действие токсических соединений и даже последствия вакцинации.

Обобщенные данные мировой статистики свидетельствуют о том, что мужчины по сравнению с жен-

щинами в 1,5 раза чаще заболевают ЗНО органов, не относящихся к половой сфере, и почти в 2 раза чаще умирают от них [1–3]. Эти различия наиболее резко выражены в отношении опухолей пищевода, печени, головы и шеи и мочевого пузыря (рис. 1).

Тенденция к более частой заболеваемости ЗНО у мужчин не связана ни с этнической принадлежностью, ни с другими параметрами, поскольку она сохраняется и после стандартизации по всем известным факторам риска. Данная тенденция характерна также для большинства ЗНО детского возраста, когда нет профессиональных рисков и вредных привычек [4]. Исключениями является рак щитовидной железы, желчного пузыря и ануса, который чаще возникает у женщин. При этом, однако, у мужчин рак щитовидной

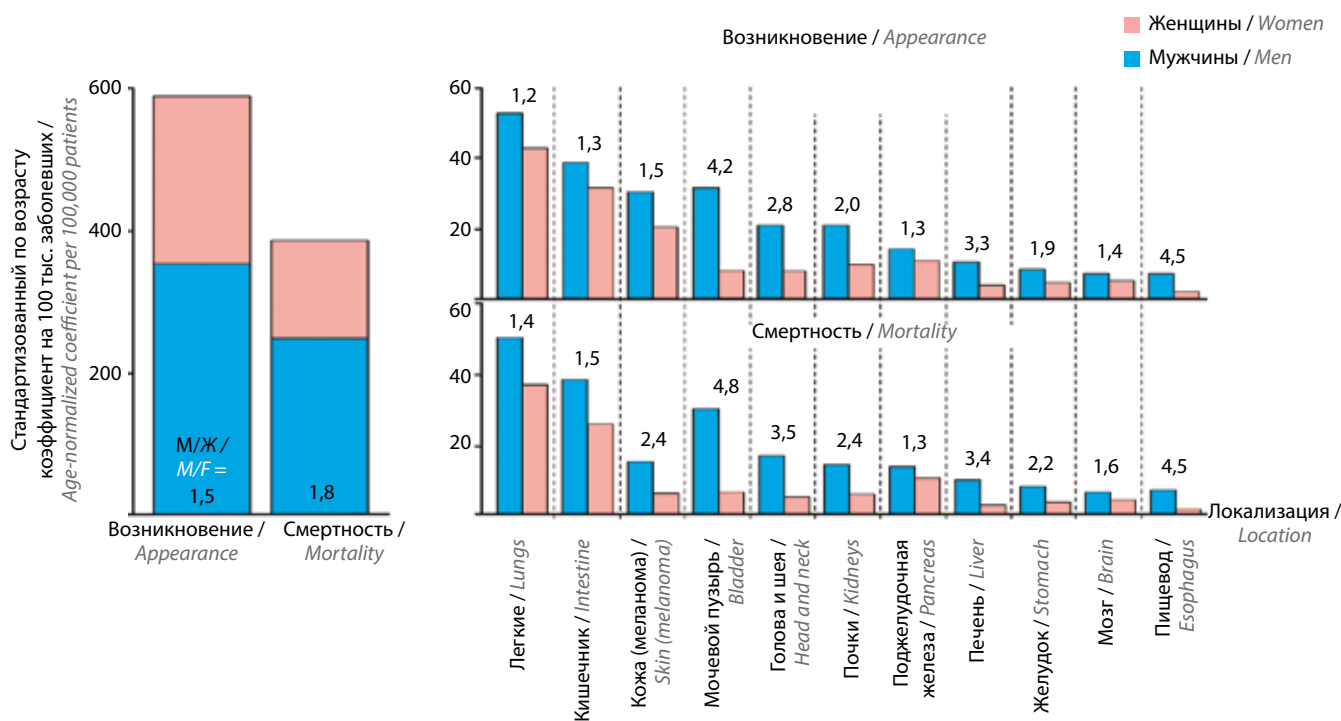


Рис. 1. Сравнение частоты возникновения опухолей нерепродуктивных органов на 100 тыс. случаев у мужчин и женщин: а – заболеваемость и смертность от рака всех нерепродуктивных органов с поправкой на возраст на 100 тыс. заболевших; б – скорректированные по возрасту показатели заболеваемости и смертности для опухолей различной локализации [1]. М – мужчины; Ж – женщины
Fig. 1. Comparative incidence of tumors of non-reproductive organs per 100,000 cases in men and women: а – age-adjusted cancer morbidity and mortality per 100,000 cases for all non-reproductive organs; б – age-adjusted morbidity and mortality rates for tumors of different localization [1]. М – men; W – women

железы протекает более злокачественно и чаще возникает метастазирование [5].

Опухоли соединительной ткани также значительно чаще поражают мужчин. В США среди 4253 пациентов со всеми гистологическими формами мягкотканых сарком головы и шеи, зарегистрированных в 2000–2018 гг., мужчин было в 5 раз больше, чем женщин. При этом выраженность полового диморфизма различалась в зависимости от гистологических подтипов заболевания. Злокачественные фиброзные гистиоцитомы возникали у мужчин чаще в 4,7 раза, лейомиосаркомы – в 3,7 раза, ангиосаркомы – в 2 раза, а дерматофибросаркомы столь же часто [6, 7].

В то же время существует одна из разновидностей мягкотканых сарком, которая поражает почти исключительно женщин. Эти опухоли развиваются в случае герминального синдрома DICER1, при котором инактивирован один из аллелей гена эндорибонуклеазы, расщепляющей молекулы-предшественники до зрелых микроРНК, которые затем гибридизируются с целевыми матричными РНК (мРНК), что приводит к посттранскрипционному нокдауну ряда генов, в том числе онкосупрессоров. Это предрасполагает к канцерогенезу по аутосомно-доминантному механизму. Поражаются преимущественно женщины в возрасте до 30 лет. Саркомы у таких больных локализируются в основном в области гениталий, которые развиваются из мюллерова протока, регрессирующего у мужчин вскоре после его образования под влиянием антимюллерова гормона, вырабатываемого клетками Сертоли семенников [8–10]. Отмечено также, что у женщин чаще развиваются дефицитные по сукцинатдегидрогеназе саркомы желудка [11].

Данные экспериментальных исследований подтверждают универсальный характер полового диморфизма в канцерогенезе. При изучении 278 химических канцерогенов в хроническом опыте на грызунах в рамках Национальной токсикологической программы США (National Toxicology Program, NTP) было показано, что канцерогенный эффект изученных соединений у самцов в среднем в 1,69 раза выше, чем у самок ($p < 0,001$). При этом выраженные половые различия в действии этих канцерогенов проявили 72 % проанализированных соединений. Помимо этого, в органах, не относящихся к половой сфере, 68 соединений вызвали опухоли только у самцов и не были канцерогенны для самок. Обратная зависимость обнаружена при действии 19 других канцерогенов [12].

В условиях растущего загрязнения биосферы эндокринными дизрапторами в комбинации с канцерогенными ксенобиотиками изучение роли половых факторов в канцерогенезе становится актуальным, поскольку она может быть одной из важных составляющих в комплексе событий, обуславливающих рост заболеваемости ЗНО в глобальном масштабе. Кроме того, понимание механизмов, лежащих в основе полового диморфизма в патогенезе злокачественного

роста, существенно и для персонального подхода к профилактике и терапии онкологических заболеваний у женщин и мужчин [13].

ХРОМОСОМНЫЙ ФАКТОР ПОЛОВОГО ДИМОРФИЗМА

Как известно, количество генов половых хромосом различается у мужских и женских особей, поскольку женские наследуют по одной X-хромосоме от обоих родителей, а мужские – одну X-хромосому матери и Y-хромосому отца, которая почти в 3 раза меньше X-хромосомы (59 Мб против 154 Мб). При этом X-хромосома содержит, по разным данным, более 800–1000 генов, а Y-хромосома – около 90, которые кодируют не более 78 белков [14–16] (рис. 2).

В течение жизни у особей женского пола полностью экспрессируется только одна из X-хромосом. Другая превращается в X-неактивный транскрипт (XCI) в результате эпигенетического сайленсинга, включающего метилирование ДНК и уплотнение хроматина с помощью длинной некодирующей РНК (lncRNA) гена *Xist*, который локализован на инактивируемой X-хромосоме. В механизме этой инактивации (XI) существенную роль играют триметилирование гистонов H3K27 и сдвиг времени репликации относительно остальной части ядра [15–18].

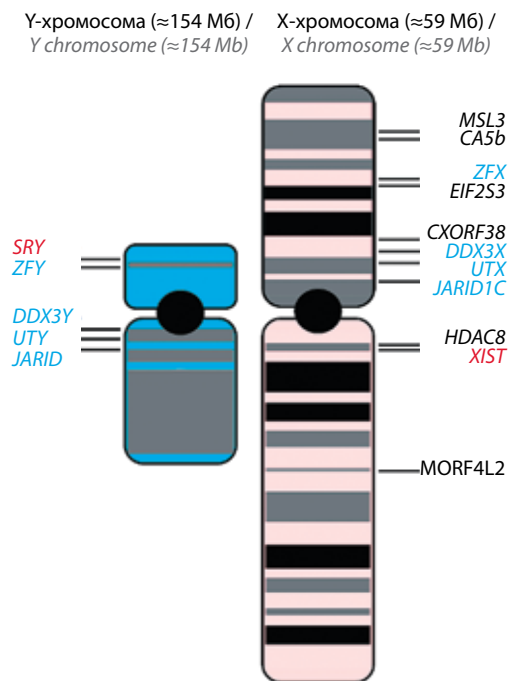


Рис. 2. Относительный размер хромосом X и Y человека. Гены, экспрессирующиеся только в клетках женских или мужских особей, обозначены красным цветом; гены, избегающие XCI и имеющие гомологи на Y-хромосоме, – синим, гены, избегающие XCI, но не имеющие очевидного Y-гомолога, – черным (адаптировано из [16])

Fig. 2. Relative size of human X and Y chromosomes. Genes expressed only in female or male cells are shown in red, genes that avoid XCI and have homologues on the Y chromosome – blue, genes that avoid XCI but do not have an obvious Y homologue are shown in black (adapted from [16])

Таблица 1. Локализованные на X-хромосоме кодирующие последовательности микроРНК, для которых была показана ассоциация с канцерогенезом (Канцер) и/или с регуляцией иммунитета (Иммун) [15, 16]

Table 1. MicroRNA coding sequences localized on the X chromosome for which an association with carcinogenesis (Cancer) and/or immunity regulation (Immun) has been shown [15, 16]

Локус на X-хромосоме X chromosome locus	МикроРНК MicroRNA	Канцер Cancer	Иммун Immune	Примечание Comment
p11.3	Hsa-MiR-221	+	+	—
	Hsa-MiR-222	+	+	
p11.23	Hsa-MiR-532	+	—	Локализованы во внутригенной области <i>CLCN5</i> (ген, кодирующий белок потенциалзависимого хлоридного канала) Located in the <i>CLCN5</i> intragene part (gene coding voltage-gated chloride channel)
	Hsa-MiR-188	+	—	
	Hsa-MiR-502	+	—	
p11.23	Hsa-MiR-98	+	+	Локализованы во внутригенной области <i>HUWE1</i> (ген, кодирующий фермент убиквитинлигазу) Located in the <i>HUWE1</i> intragene part (gene coding ubiquitin ligase enzyme)
	Hsa-Let-7f-2	+	—	
q12	Hsa-MiR-223	+	—	—
q13.1	Hsa-MiR-421	+	—	Локализованы внутри области длинной некодирующей РНК FTX, которая является компонентом центра инактивации X-хромосомы Located inside long RNA non-coding fragment FTX which is a component of X-inactivation center
	Hsa-MiR-374a	+	—	
q26.2	Hsa-MiR-363	—	+	—
	Hsa-MiR-19b-2	+	+	
	Hsa-MiR-20b	+	+	
	Hsa-MiR-18b	+	+	
	Hsa-MiR-106a	+	+	
q26.3	Hsa-MiR-503	+	+	—
	Hsa-MiR-424	—	+	
q27.3	Hsa-MiR-513a	—	+	—
	Hsa-MiR-513b	—	+	
	Hsa-MiR-513c	—	+	
q28	Hsa-MiR-224	+	—	Локализована во внутригенной области <i>GABRE</i> (ген, кодирующий субъединицу эпсилон рецептора гамма-аминомасляной кислоты типа А) Located in the <i>GABRE</i> intragene part (gene coding epsilon subunit of the gamma-aminobutyric acid type A receptor)
	Hsa-MiR-105-1	—	+	Локализована во внутригенной области <i>GABRA3</i> (ген, кодирующий субъединицу альфа рецептора гамма-аминомасляной кислоты типа А) Located in the <i>GABRA3</i> intragene part (gene coding alpha subunit of the gamma-aminobutyric acid type A receptor)

РНК *Xist*, относящаяся к длинным некодирующим РНК и осуществляющая дозовую компенсацию генов, является мощным антиканцерогенным фактором. Ее нокаут в стволовых клетках кроветворного ростка вызывает у мышей развитие миелодиспластического синдрома со 100 % пенетрантностью, а также миелолейкоз и гистиоцитарную саркому [19]. У человека анеуплоидия X-хромосомы также ассоциируется

с канцерогенезом. У женщин в клетках рака молочной железы и яичников часто наблюдается утрата конденсированной X-хромосомы (тельце Барра) или ее дублирование, а у мужчин с генотипом XXУ риск развития рака молочной железы и герминогенных опухолей яичек повышен в 20–50 раз [20–24].

Несмотря на процесс дозовой компенсации, женские клетки имеют значительное преимущество перед

мужскими, поскольку помимо полного комплекта работающих генов на активной X-хромосоме часть генов инактивированной X-хромосомы преодолевает эпигенетическую репрессию. Эти так называемые «гены-беглецы» удваивают число активных генов, экспрессируемых с обеих X-хромосом [25, 26].

Среди «генов-беглецов» находятся гены эпигенетических модификаторов KDM5C и KDM6A (UTX), которые модифицируют остатки лизина гистона H3, изменяя структуру хроматина и транскрипцию генов. Содержание этих ферментов у женщин гораздо выше, чем у мужчин, поскольку их паралоги на Y-хромосоме KDM5D и UTY мало активны [25–29].

В связи с этим последствия инактивирующих мутаций в генах *ATRX*, *CNKSR2*, *DDX3X*, *KDM5C*, *KDM6A* и *MAGEC3* чаще проявляются в опухолях мужчин, поскольку у женщин эти гены экспрессируются биаллельно и в случае мутации любого из них на активной X-хромосоме копия с XCI компенсирует утрату. Кроме того, в Y-хромосоме млекопитающих почти в 5 раз повышен риск мутирования. Во-первых, это связано с тем, что сперматозоиды, через которые она передается, образуются в ряду делений клеток-предшественников, и каждое из этих делений несет возможность появления новой мутации, а во-вторых, с тем, что сперматозоиды находятся в семенниках в кислой среде, стимулирующей мутагенез [30].

Половой диморфизм в канцерогенезе может быть связан и с тем, что, по данным проекта Genotype-Tissue Expression (GTEx, релиз v8), 37 % всех генов экспрессируются в зависимости от пола хотя бы в одной ткани, что обуславливает фенотипические различия. Например, у мужчин в отличие от женщин в эпителии молочных желез экспрессируются гены, которые, по предварительным данным, подавляют лактацию [31].

Экстремальное снижение экспрессии генов Y-хромосомы (EDY) или их мозаичная утрата (LOY), происходящие у пожилых мужчин, указывают на повышенный риск ряда заболеваний, в том числе онкологических [32, 33].

Инактивирующие мутации гена *UTX*, который кодирует гистоновую H3K27-специфическую деметилазу, также часто встречаются у мужчин в клетках рака почки, плоскоклеточного рака пищевода, медуллобластомы IV желудочка и других опухолей. Предполагается, что это может быть одной из причин, по которой детская форма острого Т-клеточного лимфолейкоза (Т-ALL) чаще встречается у мальчиков, чем у девочек. Среди других генов белков гистон-деацетилазного комплекса в опухолях у мужчин обнаруживаются мутации *DDX3X*, АТФ-зависимой РНК-хеликазы, которые не компенсируются молчащим гомологом (*ZMYM3*) на Y-хромосоме [34, 35].

Определенную роль в преимущественном возникновении опухолей печени у мужчин играет aberrантная активация локализованного на Y-хромосоме гена мотива связывания РНК (*RBMY*), кодирующего

специфичный для мужских половых клеток белок-регулятор сплайсинга РНК во время сперматогенеза. В клетках семенников человека обнаружено не менее 20 потенциальных генов-мишеней этого белка. У трансгенных мышей с aberrантной активацией *RBMY* развивались предраковые поражения печени и гепатокарциномы, а в случае химического канцерогенеза экспрессия этого белка у трансгенных мышей ускорила возникновение гепатом [36].

Помимо различий в уровне экспрессии генов, кодирующих белки, мужские и женские клетки значительно различаются по экспрессии некодирующих микроРНК, мишенями которых являются 30–50 % белок-кодирующих генов. Наибольшая плотность микроРНК выявлена на X-хромосоме. Она содержит не менее 118 микроРНК, тогда как Y-хромосома – только 2 (рис. 2; табл. 1). В числе X-сцепленных микроРНК находятся как микроРНК, способствующие злокачественному превращению клетки и прогрессии опухоли, так и опухолевые супрессоры. В этом плане кластер X-сцепленных микроРНК – miR-221–223 – изучен наиболее подробно. Нарушение регуляции miR-221 характерно для нескольких видов ЗНО, что, вероятно, объясняется ее влиянием на экспрессию белка-регулятора клеточного цикла p27Kip1/CDKN1B, являющегося опухолевым супрессором. Его инактивация наблюдается при многих опухолях человека (табл. 2). В женских клетках некоторые из X-сцепленных микроРНК находятся в генах, которые избегают XCI, например, в *DMD*, *CHM*, *ATP11C* или *IRAK1*. Вследствие этого двойной набор независимых микроРНК может компенсировать утрату функций одной из них, что в мужских клетках невозможно.

Одним из механизмов полового диморфизма в онкологии является неравенство в развитии врожденного и адаптивного противоопухолевого иммунитета, связываемое с X-сцепленным кластером miR-106-363 (-106a, -18b, -20b, -19b2, -92a2 и -363). Показано также, что miR-106b, -20b и -513 контролируют экспрессию лиганда программируемой клеточной гибели (programmed death-ligand 1, PD-L1), который стимулирует апоптоз эффекторных Т-лимфоцитов и ингибирует этот процесс у супрессорных Т-лимфоцитов. Все они репрессируют PD-L1 путем прямого связывания с частично комплементарными последовательностями 3'UTR мРНК. Другой лиганд этого рецептора – programmed death-ligand 1 (PD-L2) – контролируется miR-20 и miR-106. Относительно X-сцепленной miR-424 известно, что она также регулирует PD-L1 и, вероятно, экспрессию антигенпрезентирующего рецептора CD80 [37–41].

Помимо этого, флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence in-situ hybridization, FISH) микроРНК женских Т-клеток показала, что в некоторых из них X-сцепленные гены Т-клеточного ответа *CD40LG* и *CXCR3* экспрессируются с обоих аллелей. В частности, в зрелых Т- и В-лимфоцитах были обнаружены

паттерны РНК *Xist* без типичных инактивирующих гетерохроматических модификаций, характерных для ХС1 [43, 44].

Таблица 2. Экспрессия *miR-221* в различных опухолях [37]

Table 2. Expression of *miR-221* in various tumors [37]

Злокачественная опухоль Malignant tumor	Мишени <i>miR-221</i> <i>miR-221</i> targets
Глиобластома Glioblastoma	<i>GJA1</i> (Cx43), <i>SOCS3</i>
Рак печени Liver cancer	<i>CDKN1B</i> (p27), <i>CDKN1C</i> (p57), <i>HDAC6</i> , <i>BMF</i> , <i>NFKB1</i> (NF-κB), <i>SOCS3</i>
Рак поджелудочной железы Pancreatic cancer	<i>PTEN</i> (p27, p57), <i>PUMA</i> , <i>TIMP2</i> , <i>SOCS3</i>
Рак пищевода и желудка Esophageal and gastric cancer	<i>PTEN</i> (p27), <i>CDX2</i> , <i>DKK2</i> , <i>HAI-1</i>
Рак простаты Prostate cancer	<i>CDKN1B</i> (p27), <i>DIRAS3</i> , <i>SOCS3</i> , <i>IRF2</i>
Рак мочевого пузыря Bladder cancer	<i>PTEN</i> , <i>PUMA</i> , <i>STMN1</i>
Рак молочной железы Breast cancer	<i>CDKN1B</i> (p27), <i>TRPS1</i> , <i>TNFAIP3</i> (A20), <i>SOCS1</i> , <i>ADIPOR1</i> , <i>PTEN</i> , <i>ZEB1</i> , <i>TIMP3</i> , <i>ITGB4</i> (b4 integrin), <i>ADAM17</i> , <i>STAT5</i>
Хронический лимфолейкоз Chronic lymphocytic leukemia	<i>CDKN1B</i> (p27)
Хронический миелолейкоз Chronic myeloid leukemia	<i>CDKN1B</i> (p27), <i>STAT5</i>
Множественная миелома Multiple myeloma	<i>CDKN1B</i> (p27), <i>CDKN1C</i> (p57), <i>PTEN</i> , <i>PUMA</i> , <i>ABCC1</i> (MRP1)
Рак легкого Lung cancer	<i>CDKN1B</i> (p27), <i>PTEN</i> , <i>TIMP2</i> , <i>TIMP3</i>
Рак почки Kidney cancer	<i>TIMP2</i>
Рак яичников Ovarian cancer	<i>APAF1</i> , <i>BMF</i> , <i>PTEN</i> , <i>ARF4</i>
Рак шейки матки Cervical cancer	<i>SOCS1</i> , <i>THBS2</i> , <i>MBD2</i> , <i>ARID1A</i>
Меланома Melanoma	<i>FOS</i>
Саркомы Sarcomas	<i>CDKN1B</i> (p27), <i>PTEN</i> , <i>CCND2</i> , <i>CDK6</i> , <i>ERBB3</i> , <i>ARHI</i>

Таким образом, ряд унаследованных или первоначально возникших мутаций X-сцепленного гена, регулирующего экспрессию микроРНК, может компенсироваться в клетках женского организма и не

проявиться, в то время как в мужских клетках эти мутации дают фенотипические изменения вследствие моноаллельной экспрессии единственной мутантной копии. В то же время избыточная билатеральная экспрессия X-сцепленных генов, связанных с иммунитетом, коррелирует у женщин (помимо больших антиканцерогенной устойчивости и эффективности иммунотерапии) с повышенной предрасположенностью к аутоиммунным заболеваниям, таким как склеродермия, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, системная красная волчанка, системное поражение соединительной ткани в виде синдрома Шегрена, которые в 3–7 раз чаще встречаются у женщин, чем у мужчин [44, 45].

Еще одним фактором, увеличивающим половые различия в иммунном статусе, является участие андрогенных рецепторов (AR) Т-клеток в ингибировании воспалительных процессов и противоопухолевом клеточном иммунитете.

Как известно, цитотоксические Т-клетки составляют основу адаптивной иммунной системы. Поддержка их активности на определенном уровне позволяет, с одной стороны, осуществлять элиминацию атипичных клеток, а с другой, не допускать развития аутоиммунных реакций. Показано, что половые различия в патогенезе ЗНО в значительной мере связаны с особенностями адаптивного иммунитета. Мужские CD8⁺-Т-клетки проявляют более низкие эффекторные свойства по сравнению с женскими, так, AR подавляет активность и стволовость мужских инфильтрирующих опухоль CD8⁺-Т-клеток путем регуляции эпигенетических и транскрипционных программ дифференцировки. В частности, активность андрогенного рецептора ингибирует дифференцировку исходных клеток Th1 в CD4⁺ и тем самым влияет на противоопухолевый клеточный иммунитет. Механизм подавления созревания CD4 включает связывание консервативной области фосфатазы Ptpn1 с последующим повышением ее активности, что ингибирует сигнализацию цитокина интерлейкина-12 (IL-12) и дифференцировку CD4-клеток. При этом опосредованно подавляется и выработка клетками CD8⁺-интерферона γ (IFNγ), который является важным активатором макрофагов и индуктором экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II класса. По такому механизму тестостерон ингибирует в Т-клетках экспрессию IFNγ и способствует устойчивости опухоли к иммунотерапии. Кроме того, противоопухолевый иммунитет подавляется и способностью злокачественных клеток вырабатывать PD-L1. Блокада этих рецепторов с помощью небольших моноклональных антител или малых молекул, так же как и антиандрогенная терапия, стали новым подходом в химиотерапии, поскольку предотвращают истощение пула цитотоксических Т-клеток, увеличивают выработку цитокинов CD8⁺-клетками и улучшают реакцию на таргетную терапию путем увеличения экспрессии IFNγ [46–50].

Способность гуморальных факторов воздействовать на развитие опухолевого процесса у особей мужского пола также понижена. Показано, что в процессе развития иммунного ответа В-клетки у мужчин и женщин функционируют по-разному. В частности, это касается динамики активации герминативных центров периферических лимфоидных органов, где зрелые В-лимфоциты, активированные антигеном, пролиферируют, дифференцируются и претерпевают процессы соматического гипермутагенеза с переключением классов антител. В активированных антигеном мужских В-клетках процессы происходят менее эффективно, чем в женских. Одной из причин этого является способность тестостерона стимулировать рецептор GPR174, кодируемый X-хромосомой, который подавляет формирование герминальных центров у самцов, но не у самок или кастрированных самцов. Введение тестостерона таким самцам возобновляет ингибирующее действие GPR174. Данный процесс является еще одной составляющей половых различий в гуморальном противоопухолевом иммунитете [49, 50].

РОЛЬ ГОРМОНАЛЬНОГО ПРОФИЛЯ

У мужских особей пол определяется наличием в составе Y-хромосомы гена *SRY*, кодирующего TDF (testis determining factor) – совокупность генов и их продуктов, стимулирующих развитие семенников и выработку тестостерона. После полутора месяцев эмбрионального развития человека TDF начинает превращать первичные половые закладки в яички, которые в результате стимуляции хорионическим гонадотропином плаценты вырабатывают тестостерон. Без экспрессии гена *SRY* развитие первичных примитивных гонад продолжает идти по женскому типу.

Гормональный профиль зрелого организма в плане половых различий определяется гипоталамо-гипофизарно-гонадной осью, состоящей из гипоталамуса, гипофиза и половых желез. Нейроны гипоталамуса выделяют гонадотропин-рилизинг-гормон, который стимулирует выработку клетками передней доли гипофиза фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) гормонов. В мужском организме ФСГ стимулирует сперматогенез, а ЛГ – выработку тестостерона. В женском организме эти белковые гормоны определяют синтез эстрогенов и прогестерона. Баланс оси регулируется петлей обратной связи. Гипофизарные гормоны вызывают в периферических органах, например в печени, специфический для пола профиль экспрессии генов и таким образом влияют на канцерогенез непосредственно в репродуктивных органах и опосредованно в других. Их воздействие на транскрипцию обусловлено активацией фосфорилирования преобразователя сигналов и активатора транскрипции 5 (STAT5), защищающего гепатоциты от хронического повреждения в результате воспаления, вызванного вирусом гепатита В или химическими канцерогенами, и, соответственно, от злокачественной трансформации.

В случае химического канцерогенеза половые различия в активности ферментов метаболизма канцерогенов проявляются в результате разного профиля выделения соматотропного гормона гипофиза, который отвечает за большую часть различий в уровне экспрессии генов, характерных для особей мужского или женского пола. В частности, в печени более постоянный уровень циркуляции соматотропного гормона приводит к женской модели экспрессии генов, а пульсирующий – к мужской [51]. По этой причине и в результате давления отбора по половому признаку у самок и самцов значительно различаются транскриптомы, оптимальные для выживания данного пола, т. е. одни и те же гены по-разному экспрессируются в клетках мужского и женского организмов. X-хромосома обогащена аллелями, оптимальными для женщин, и их экспрессия в клетках женского организма выше, чем мужского. Поэтому соматотропный гормон по-разному инициирует у самок и самцов триметилирование гистона H3K27 через STAT5b с помощью каталитических субъединиц Ezh1/Ezh2 поликомб-репрессивного комплекса 2 (PRC2). В результате по сравнению с самцами у самок повышена активность изоформ цитохрома P450 CYP2A4, 2B9, 2B10, 2B13, 3A41, 3A44, что влияет на профиль метаболизма канцерогенов. Нокаут Ezh1/Ezh2 так же, как и гипофизэктомия, устраняют половые различия в экспрессии этих ферментов и в активности канцерогенеза [52–54].

Помимо репродуктивных органов гормоны контролируют канцерогенез и в тканях, не относящихся к половой сфере. Это в значительной мере связано с тем, что кроме glandularной системы существует и диффузная эндокринная система, представленная гормон-продуцирующими клетками практически во всех тканях. Она также играет существенную роль в канцерогенезе [55, 56]. В частности, в ткани легкого нейроэндокринные клетки метаболизируют стероиды и синтезируют многие гормоны, в том числе биогенные амины, влияющие на активность клеточной пролиферации, воспаление, иммунный ответ и другие процессы как непосредственно в легком, так и в других органах.

В патогенезе опухолей легкого наблюдаются четкие половые различия. При прочих равных условиях плоскоклеточная бронхогенная форма рака легкого поражает в основном мужчин. У женщин значительно чаще развиваются аденокарциномы. Среди никогда не куривших пациентов у женщин около 53 % всех немелкоклеточных опухолей легких составляют аденокарциномы, а у мужчин – только 15 %. Величина этого соотношения варьирует на разных континентах, но всегда выше у женщин. Борьба с курением и другие профилактические мероприятия привели к снижению заболеваемости бронхогенным раком у мужчин, но не аденокарциномами у женщин, частота которых продолжает расти. Курение повышает риск развития рака легкого у женщин в 3 раза больше, чем у мужчин. Это связано, помимо прочего, с тем, что табачный дым

не только оказывает прямое канцерогенное действие, но и увеличивает уровень изоформ цитохрома P450 типа CYP1B1, которые превращают эндогенные эстрогены в потенциально канцерогенные формы катехолов и хинонов. В результате повышенной экспрессии других ферментов, активирующих канцерогены табачного дыма, у женщин образуется больше аддуктов и чаще обнаруживаются мутации в гене супрессора p53 и протоонкогене *KRAS*. Роль эстрогенов в легочном канцерогенезе подтверждает и тот факт, что у женщин, получающих заместительную гормональную терапию или оральные контрацептивы, рак легкого возникает чаще, так же как и у мужчин, принимающих эстрогенные препараты для снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний [57–61].

В клетках немелкоклеточного рака легкого экспрессия эстрогенового рецептора α (ER α) обычно снижена, в то время как почти в 90 % образцов опухолей пациентов обоего пола наблюдается гиперэкспрессия эстрогенового рецептора β (ER β). При этом его влияние на течение заболевания различается в зависимости от пола. У мужчин с ER β -положительными опухолями отмечается более низкая смертность по сравнению с ER β -отрицательными опухолями, а у женщин эта зависимость обратная [62, 63].

У грызунов ER β однозначно определялся как фактор, способствующий злокачественной трансформации эпителия легкого. Было показано, что ER β , связанный с G-белком (GPER), активирует цАМФ/PKA/CREB и сигнальные пути PI3K/IKK/NF- κ B, что, в свою очередь, приводит к активации сигнальных путей PI3K/IKK/NF- κ B, PI3K/AKT/Vcl-XL и RAS/RAF/MEK/ERK, связанных с пролиферацией, инвазией, метастазированием и ингибированием апоптоза [64].

Рецептор прогестерона также стимулирует прогрессию рака легкого, причем повышенное содержание его компонента — трансмембранного эволюционно консервативного белка PGRMC1 — коррелирует с плохим прогнозом. Этот компонент помимо влияния на апоптоз и аутофагию модифицирует клеточные транспортеры, сигнализацию стероидных гормонов и ряд других процессов путем взаимодействия с рецептором эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) и регулятором липидного обмена (SCAP). В настоящее время он является одной из перспективных мишеней в химиотерапии рака легкого [65].

Андрогены и их рецептор влияют на патогенез рака легких по нескольким механизмам. В частности, показано, что в клетках культуры немелкоклеточного рака андрогены изменяют профиль экспрессии многих генов, включая те, которые связаны с пролиферацией или апоптозом. Андрогенный рецептор взаимодействует с EGFR, который играет роль в патогенезе рака легких. Их стимуляция с помощью дигидротестостерона или эпидермального фактора роста (epidermal growth factor, EGF) активирует сигнальный путь

p38MAPK-mTOR, который отвечает за уход от апоптоза, рост, пролиферацию клеток и метаболизм. Поэтому ингибирование андрогенного сигналинга может прямо влиять на прогрессию рака легкого, выживаемость его клеток и чувствительность к химиотерапии [66]. У мужчин с немелкоклеточным раком легкого ингибиторы андрогенного пути значительно повышают выживаемость, в то же время лучшая выживаемость женщин с той же опухолью коррелировала с повышенным уровнем AR [67, 68].

В целом роль сигналов AR в прогрессировании опухолей изучена недостаточно, так как в настоящее время нет объяснения, почему этот рецептор оказывает противоположное действие на опухолевый рост в зависимости от органов и клеток, например, как стимулятор метастазирования рака мочевого пузыря, почек и легких и супрессор метастазирования рака простаты и печени.

Выраженной гормональной зависимостью обладают и клетки печени. С различиями в возникновении опухолей этого органа более всего связаны половые стероиды, их рецепторы ER α , ER β и AR. Поскольку с каждым из них прямо или косвенно связана экспрессия сотен генов, трудно выделить сигнальные пути, ответственные за данные различия. Показано, что влияние ER α и AR на развитие гепатоцеллюлярных карцином, которые чаще возникают у особей мужского пола, прямо противоположно. Андрогены и их рецепторы промотируют пролиферацию гепатоцитов после инициации злокачественного процесса химическими канцерогенами или вирусом гепатита В. Они ингибируют супрессоры опухолевого роста и ингибитор циклин-зависимой киназы p16, но стимулируют экспрессию ингибитора апоптоза p21. Кроме того, лигандзависимая и независимая сигнализация AR активирует эпителиально-мезенхимальный переход гепатоцеллюлярной карциномы и ее метастазирование путем активации транскрипционного фактора SNAI2, который в числе других факторов связывается с промоторами генов, ответственных за этот переход [69].

Эстрогены и ER α снижают действие химических канцерогенов на печень в клинической практике и эксперименте. Введение эстрогенов в химиотерапевтический протокол замедляет прогрессирование рака печени, тогда как тамоксифен, который связывает рецептор ER α и блокирует действие эстрогена, его стимулирует [70–73].

Следует отметить, что при раке молочной железы у женщин и мужчин тамоксифен, наоборот, значительно увеличивает показатели безрецидивной выживаемости. У мужчин они превышают 60 % по сравнению с другими методами лечения, а его побочные эффекты в значительной степени зависят от гормонального фона пациента, поскольку у мужчин данная патология развивается на фоне гинекомастии, как идиопатической, так и вызванной антиандрогенами при лечении рака предстательной железы [74, 75].

Различия в действии ER α и AR на печень связаны с разным уровнем экспрессии у самцов и самок активаторов транскрипции FOXA1 и FOXA2, регулирующих эстрогенную и андрогенную сигнализацию путем изменения компактизации хроматина и организации нуклеосом. Связываясь с ER α и AR, они превращают эти рецепторы в активные цис-регуляторные элементы. Инактивирующие мутации в сайтах связывания FOXA и ER α у пациентов с опухолями печени приводят к прерыванию эстрогенной сигнализации. В эксперименте нокаут FOXA так же, как и гена *Esr1*, вызывает маскулинизацию экспрессии генов в печени самок и стирает половые различия в канцерогенном действии нитрозаминов на печень. Самки становятся столь же чувствительными к канцерогену, как и самцы, поскольку эстрогены, находящиеся под контролем ER α , перестают ингибировать продукцию воспалительных медиаторов типа интерлейкина-6 (IL-6), стимулирующих канцерогенез. Таким образом, FOXA-зависимая ER α -опосредованная сигнализация предотвращает, а AR-опосредованная андрогенная сигнализация способствует росту опухолей печени.

Прогрессию гепатоцеллюлярной карциномы регулируют и локальные факторы, связанные со способностью клеток опухоли стимулировать экспрессию miR-9-5p, мишенью которой является *Esr1*. В отличие от *Esr1*, статус *Esr2*, кодирующего ER β , не влиял на гепатоканцерогенез [76–79].

В то же время при опухолях других органов высокий уровень экспрессии ER β коррелирует с улучшенным прогнозом. Например, при раке толстого кишечника и почки активирующий полиморфизм промотора ER β является индикатором повышения выживаемости пациентов. В случае плоскоклеточных карцином кожи с низкой экспрессией ER β ее спонтанное или индуцированное агонистом повышение вызывает дифференцировку клеток опухоли и замедление роста новообразования. При меланоме уровни экспрессии ER β также обратно пропорциональны прогрессированию опухоли, а тамоксифен, который является агонистом ER β , подавляет на мышинной модели и метастазирование [80–84].

Еще один механизм защитного действия эстрогенов на клетки печени связан с их способностью стимулировать выработку гипофизом пролактина, который ингибирует базальный уровень врожденного иммунитета, отвечающего воспалением на повреждение гепатоцитов вирусом гепатита В или канцерогенами [85]. В культуре гепатоцитов пролактин ингибирует

активацию MYC и пролиферацию путем подавления сигналинга рецептора интерлейкина-1 (IL-1R), Toll-подобного рецептора 4 (TLR4) и рецептора фактора некроза опухоли (TNFRSF1A) через деградацию адаптерных белков, таких как фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей (TRAF6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассматриваемые половые различия в онкопатологии человека являются частным случаем диморфизма двуполовых организмов, проявляющегося в разных физиологических и патологических состояниях. Конкретные механизмы большей защищенности женского организма от возникновения опухолей органов, не относящихся к половой сфере, связаны в первую очередь с наличием в женских клетках двух X-хромосом и с тем, что некоторые гены, противодействующие канцерогенезу по разным механизмам, экспрессируются биаллельно. При этом манифестации рецессивной соматической мутации одного из них не происходит. Количество генов на Y-хромосоме на порядок меньше, чем на X-хромосоме. В результате многие гены X-хромосомы в мужских клетках представлены единственной копией, что даже при одинаковой вероятности возникновения драйверных онкогенных мутаций у лиц обоего пола даст большую частоту возникновения опухолей у мужчин. В качестве одного из механизмов, определяющих это неравенство, рассматриваются также различия в экспрессии некодирующих микроРНК, влияющих на значительную часть белок-кодирующих генов, которых на X-хромосоме в 5 раз больше, чем на Y-хромосоме. С X-сцепленным кластером микроРНК связывают более выраженный у женщин противоопухолевый иммунитет, как врожденный, так и адаптивный. Различный гормональный профиль мужского и женского организмов также существенен. Он оказывает значительное влияние как на инициацию, так и на промоцию процесса канцерогенеза. В первом случае роль играют различия в образовании мутагенных производных стероидов и неравнозначная активация генотоксических ксенобиотиков биосферы, во втором, выражающемся в преимущественной стимуляции роста трансформированных клеток, — эпигенетические механизмы. Таким образом, половой диморфизм в канцерогенезе обусловлен сложным комплексом взаимосвязанных факторов, воздействие на которые может служить целям профилактики и терапии злокачественных опухолей.

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

1. Haupt S., Caramia F., Klein S. et al. Sex disparities matter in cancer development and therapy. *Nat Rev Cancer* 2021;21(6):393–407. DOI: 10.1038/s41568-021-00348-y
2. Rubin I., Lagas J., Broestl L. et al. Sex differences in cancer mechanisms. *Biol Sex Differ* 2020;11:17. DOI: 10.1186/s13293-020-00291-x
3. Zheng D., Trynda J., Williams C. et al. Sexual dimorphism in the incidence of human cancers. *BMC Cancer* 2019;19:684. DOI: 10.1186/s12885-019-5902-z
4. Tevfik Dorak M., Karpuzoglu E. Gender differences in cancer susceptibility: an inadequately addressed issue. *Front Genet* 2012;3:268. DOI: 10.3389/fgene.2012.00268
5. Li P., Ding Y., Liu M. et al. Sex disparities in thyroid cancer: a SEER population study. *Gland Surg* 2021;10(12):3200–10. DOI: 10.21037/gs-21-545
6. Jawad M.U., Zeitlinger L.N., Bewley A.F. et al. Head and neck cutaneous soft-tissue sarcoma demonstrate sex and racial/ethnic disparities in incidence and socioeconomic disparities in survival. *J Clin Med* 2022;11(18):5475. DOI: 10.3390/jcm11185475
7. Rouhani P., Fletcher C.D., Devesa S.S., Toro J.R. Cutaneous soft tissue sarcoma incidence patterns in the U.S.: an analysis of 12,114 cases. *Cancer* 2008;113(3):616–27. DOI: 10.1002/cncr.23571
8. Stewart D.R., Best A.F., Williams G.M. et al. Neoplasm risk among individuals with a pathogenic germline variant in DICER1. *J Clin Oncol* 2019;37(8):668–76. DOI: 10.1200/JCO.2018.78.4678
9. Apellaniz-Ruiz M., Cullinan N., Grant R. et al. DICER1 screening in 15 paediatric paratesticular sarcomas unveils an unusual DICER1-associated sarcoma. *J Pathol Clin Res* 2020;6(3):185–94. DOI: 10.1002/cjp2.164
10. Warren M., Hiemenz M.C., Schmidt R. et al. Expanding the spectrum of dicer1-associated sarcomas. *Mod Pathol* 2019;33:164–74. DOI: 10.1038/s41379-019-0366-x
11. Gill A.J. Succinate dehydrogenase (SDH)-deficient neoplasia. *Histopathology* 2018;72:106–16. DOI: 10.1111/his.13277
12. Sandeep K., Peddada S., Silins I. et al. Gender differences in chemical carcinogenesis in National Toxicology Program two-year bioassays. *Toxicol Pathol* 2012;40(8):1160–8. DOI: 10.1177/0192623312446527
13. Белицкий Г.А., Кирсанов К.И., Кривошеева Л.В. и др. Канцерогенная опасность «неканцерогенных» соединений. *Вопросы онкологии* 2022;68:1.7–16. DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-1-7-16
14. Belitsky G.A., Kirsanov K.I., Krivosheeva L.V. et al. Carcinogenic danger of “non-carcinogenic” compounds. *Prospory onkologii = Oncology Issues* 2022;68(1):7–16. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-1-7-16
15. Snell D.M., Turner J.M.A. Sex chromosome effects on male-female differences in mammals. *Curr Biol* 2018;28(22):R1313–24. DOI: 10.1016/j.cub.2018.09.018
16. Pinheiro I., Dejager L., Libert C. X-chromosome-located microRNAs in immunity: might they explain male/female differences? The X chromosome-genomic context may affect X-located miRNAs and downstream signaling, thereby contributing to the enhanced immune response of females. *BioEssays* 2011;33(11):791–802. DOI: 10.1002/bies.201100047
17. Wijchers P.J., Festenstein R.J. Epigenetic regulation of autosomal gene expression by sex chromosomes. *Trends Genet* 2011;27(4):132–40. DOI: 10.1016/j.tig.2011.01.004
18. Balaton B.P., Brown C.J. Contribution of genetic and epigenetic changes to escape from X-chromosome inactivation. *Epigenetics Chromatin* 2021;14(1):30. DOI: 10.1186/s13072-021-00404-9
19. Plath K., Fang J., Mlynarczyk-Evans S.K. et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 2003;300:131–5. DOI: 10.1126/science.1084274
20. Yildirim E., Kirby J.E., Brown D.E. et al. Xist RNA is a potent suppressor of hematologic cancer in mice. *Cell* 2013;152(4):727–42. DOI: 10.1016/j.cell.2013.01.034
21. Kanakis G.A., Nieschlag E. Klinefelter syndrome: more than hypogonadism. *Metabolism* 2018;86:135–44. DOI: 10.1016/j.metabol.2017.09.017
22. Ferzoco R.M., Ruddy K.J. The epidemiology of male breast cancer. *Curr Oncol Rep* 2016;18(1):1. DOI: 10.1007/s11912-015-0487-4
23. Kawakami T., Okamoto K., Sugihara H. et al. The roles of supernumerical X chromosomes and XIST expression in testicular germ cell tumors. *J Urol* 2003;169(4):1546–52. DOI: 10.1097/01.ju.0000044927.23323.5a
24. Chaligne R., Heard E. X-chromosome inactivation in development and cancer. *FEBS Lett* 2014;588(15):2514–22. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.06.023
25. Pageau G.J., Hall L.L., Ganesan S. The disappearing Barr body in breast and ovarian cancers. *Nat Rev Cancer* 2007;7(8):628–33. DOI: 10.1038/nrc2172
26. Cotton A.M., Ge B., Light N. et al. Analysis of expressed SNPs identifies variable extents of expression from the human inactive X chromosome. *Genome Biol* 2013;14(11):R122. DOI: 10.1186/gb-2013-14-11-r122
27. Tukiainen T., Villani A.-C., Yen A. Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. *Nature* 2017;550(7675):244–8. DOI: 10.1038/nature24265
28. Arnold A.P. X chromosome agents of sexual differentiation. *Nat Rev Endocrinol* 2022;18(9):574–83. DOI: 10.1038/s41574-022-00697-0
29. Snell D.M., Turner J.M.A. Sex chromosome effects on male-female differences in mammals. *Curr Biol* 2018;28: R1313–24. DOI: 10.1016/j.cub.2018.09.018
30. Xu J., Deng X., Watkins R., Distèche C.M. Sex-specific differences in expression of histone demethylases Utx and Uty in mouse brain and neurons. *J Neurosci* 2008;28:4521–7. DOI: 10.1016/j.cub.2018.09.018
31. Dunford A., Weinstock D.M., Savova V. et al. Tumor-suppressor genes that escape from X-inactivation contribute to cancer sex bias. *Nat Genet* 2017;49(1):10–6. DOI: 10.1038/ng.3726
32. Oliva M., Muñoz-Aguirre M., Kim-Hellmuth S. et al. The impact of sex on gene expression across human tissues. *Science* 2020; 369(6509):eaba3066. DOI: 10.1126/science.aba3066
33. Cáceres A., Jene A., Esko T. et al. Extreme downregulation of chromosome y and cancer risk in men. *Natl Cancer Inst* 2020;112(9):913–20. DOI: 10.1093/jnci/djz232
34. Thompson D.J., Genovese G., Halvardson J. et al. Genetic predisposition to mosaic Y chromosome loss in blood. *Nature* 2019;575(7784):652–7. DOI: 10.1038/s41586-019-1765-3
35. Van der Meulen J., Sanghvi V., Mavrikis K. et al. The H3K27me3 demethylase UTX is a gender-specific tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015;125(1):13–21. DOI: 10.1182/blood-2014-05-577270
36. Yi J., Shi X., Xuan Z., Wu J. Histone demethylase UTX/KDM6A enhances tumor immune cell recruitment, promotes differentiation and suppresses medulloblastoma. *Cancer Lett* 2021;499:188–200. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.11.031
37. Tsuei D.J., Lee P.H., Peng H.Y. et al. Male germ cell-specific RNA binding protein RBMY: a new oncogene explaining male predominance in liver cancer. *PLoS One* 2011;6(11):e26948. DOI: 10.1371/journal.pone.0026948
38. Di Martino M.T., Arbitrio M., Caracciolo D. et al. miR-221/222 as biomarkers and targets for therapeutic intervention on cancer and other diseases: a systematic review. *Mol Ther Nucleic Acids* 2022;27:1191–224. DOI: 10.1016/j.omtn.2022.02.005
39. Di Palo A., Siniscalchi C., Salerno M. et al. What microRNAs could tell us about the human X chromosome. *Cell Mol Life Sci* 2020;77(20):4069–80. DOI: 10.1007/s00018-020-03526-7

39. Pinheiro I., Dejager L., Libert C. X-chromosome-located microRNAs in immunity: might they explain male/female differences? The X chromosome-genomic context may affect X-located miRNAs and downstream signaling, thereby contributing to the enhanced immune response of females. *Bioessays* 2011;33:791–802. DOI: 10.1002/bies.201100047
40. Xu S., Tao Z., Hai B. et al. miR-424(322) reverses chemoresistance via T-cell immune response activation by blocking the PD-L1 immune checkpoint. *Nat Commun* 2016;7:11406–19. DOI: 10.1038/ncomms11406
41. Slack F.J., Chinnaiyan A.M. The role of non-coding RNAs in oncology. *Cell* 2019;179:1033–55. DOI: 10.1016/j.cell.2019.10.017
42. Wanga J., Syretta C.M., Kramer M.C. et al. Unusual maintenance of X chromosome inactivation predisposes female lymphocytes for increased expression from the inactive X. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(14):E2029–38. DOI: 10.1073/pnas.1520113113
43. Reinius B., Sh C.I., Hengshuo L. et al. Female-biased expression of long non-coding RNAs in domains that escape X-inactivation in mouse. *BMC Genomics* 2010;11:614. DOI: 10.1186/1471-2164-11-614
44. Youness A., Miquel C.-H., Guéry J.-C. Escape from X chromosome inactivation and the female predominance in autoimmune diseases. *Int J Mol Sci* 2021;22(3):1114. DOI: 10.3390/ijms22031114
45. Billi A.C., Kahlenberg J.M., Gudjonsson J.E. Sex bias in autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol* 2019;31(1):53–61. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000564
46. Guan X., Polesso F., Wang C. et al. Androgen receptor activity in T cells limits checkpoint blockade efficacy. *Nature* 2022;606(7915):791–6. DOI: 10.1038/s41586-022-04522-6
47. Kissick H.T., Sanda M.G., Dunn L.K. et al. Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(27):9887–92. DOI: 10.1073/pnas.1402468111
48. Vellano C.P., White M.G., Andrews M.C. et al. Androgen receptor blockade promotes response to BRAF/MEK-targeted therapy. *Nature* 2022;606(7915):797–803. DOI: 10.1038/s41586-022-04833-8
49. Xin Chen R.Z., Ma W., Zhang J. et al. A GPR174–CCL21 module imparts sexual dimorphism to humoral immunity. *Nature* 2020;577(7790):416–20. DOI: 10.1038/s41586-019-1873-0
50. Yang C., Jin J., Yang Y. et al. Androgen receptor-mediated CD8+ T cell stemness programs drive sex differences in antitumor immunity. *Immunity* 2022;55(7):1268–83.e9. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.05.012
51. Mode A., Gustafsson J.-A. Sex and the liver – a journey through five decades. *Drug Metab Rev* 2006;38(1–2):197–207. DOI: 10.1080/03602530600570057
52. Melia T., Waxman D.J. Genetic factors contributing to extensive variability of sex-specific hepatic gene expression in diversity outbred mice. *PLoS One* 2020;15(12):e0242665. DOI: 10.1371/journal.pone.0242665
53. Lau-Corona D., Bae W.K., Hennighausen L., Waxman D.J. Sex-biased genetic programs in liver metabolism and liver fibrosis are controlled by EZH1 and EZH2. *PLoS Genet* 2020;16(5):e1008796. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008796
54. Clodfelter K.H., Holloway M.G., Hodor P. et al. Sex-dependent liver gene expression is extensive and largely dependent upon signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b): STAT5b-dependent activation of male genes and repression of female genes revealed by microarray analysis. *Mol Endocrinol (Baltimore, Md)* 2006;20(6):1333–51. DOI: 10.1210/me.2005-0489
55. Montuenga L.M., Guembe L., Burrell M.A. et al. The diffuse endocrine system: from embryogenesis to carcinogenesis. *Prog Histochem Cytochem* 2003;38(2):155–272. DOI: 10.1016/s0079-6336(03)80004-9
56. Iaglov V.V., Iaglova N.V. Novel concepts in biology of diffuse endocrine system: results and future investigations. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 2012;(4):74–81.
57. Meireles S.I., Esteves G.H., Hirata R. et al. Early changes in gene expression induced by tobacco smoke: evidence for the importance of estrogen within lung tissue. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010;3(6):707–17. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-09-0162
58. Stapelfeld C., Dammann C., Maser E. Sex-specificity in lung cancer risk. *Int J Cancer* 2020;146(9):2376–82. DOI: 10.1002/ijc.32716
59. Schweigert D., Krasauskas A., Didziapetriene J. et al. Smoking, hormonal factors and molecular markers in female lung cancer. *Neoplasma* 2016;63(4):504–9. DOI: 10.4149/neo_2016_402
60. Meza R., Meernik C., Jeon J., Cote M.L. Lung cancer incidence trends by gender, race and histology in the United States, 1973–2010. *PLoS One* 2015;10(3):e0121323. DOI: 10.1371/journal.pone.0121323
61. Lortet-Tieulent J., Soerjomataram I., Ferlay J. et al. International trends in lung cancer incidence by histological subtype: adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. *Lung Cancer* 2014;84(1):13–22. DOI: 10.1016/j.lungcan.2014.01.009
62. Smida T., Bruno T.C., Stabile L.P. Influence of estrogen on the NSCLC microenvironment: a comprehensive picture and clinical implications. *Front Oncol* 2020;10:137. DOI: 10.3389/fonc.2020.00137
63. Solairaja S., Ramalingam S., Dunna N.R., Venkatabalasubramanian S. Progesterone receptor membrane component 1 and its accomplice: Emerging therapeutic targets in lung cancer. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2022;22(6):601–11. DOI: 10.2174/1871530321666211130145542
64. Fuentes N., Rodriguez M.S., Silveyra P. Role of sex hormones in lung cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* 2021;246(19):2098–2110. DOI: 10.1177/15353702211019697
65. Recchia A.G., Musti A.M., Lanzino M. et al. A cross-talk between the androgen receptor and the epidermal growth factor receptor leads to p38mapk-dependent activation of mtor and cyclind1 expression in prostate and lung cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(3):603–14. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.07.004
66. Chang C., Lee S.O., Yeh S., Chang T.M. Androgen receptor (AR) differential roles in hormone-related tumors including prostate, bladder, kidney, lung, breast and liver. *Oncogene* 2014;33(25):3225–34. DOI: 10.1038/onc.2013.274
67. Berardi R., Morgese F., Santinelli A. et al. Hormonal receptors in lung adenocarcinoma: expression and difference in outcome by sex. *Oncotarget* 2016;7(50):82648–57. DOI: 10.18632/oncotarget.12244
68. Skov B.G., Fischer B.M., Pappot H. Oestrogen receptor beta over expression in males with non-small cell lung cancer is associated with better survival. *Lung Cancer* 2008;59(1):88–94. DOI: 10.1016/j.lungcan.2007.07.025
69. Dauki A.M., Blachly J.S., Kautto E.A. et al. Transcriptionally active androgen receptor splice variants promote hepatocellular carcinoma progression. *Cancer Res* 2020;80(3):561–75. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1117
70. Zheng D., Wang X., Antonson P. et al. Genomics of sex hormone receptor signaling in hepatic sexual dimorphism. *Mol Cell Endocrinol* 2017;471:33–41. DOI: 10.1016/j.mce.2017.05.025
71. Hassan M.M., Botrus G., Abdel-Wahab R. et al. Estrogen replacement reduces risk and increases survival times of women with hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2017;15(11):1791–9. DOI: 10.1016/j.cgh.2017.05.036
72. Villa E. Role of estrogen in liver cancer. *Womens Health* 2008;4:41–50. DOI: 10.2217/17455057.4.1.41
73. Di Maio M., De Maio E., Morabito A. et al. Hormonal treatment of human hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1089:252–61. DOI: 10.1196/annals.1386.007
74. Wibowo E., Pollock P.A., Hollis N., Wassersug R.J. Tamoxifen in men: a review of adverse events. *Andrology* 2016;4(5):776–88. DOI: 10.1111/andr.12197

75. Egemann H., Brucker C., Schraude, M. et al. Survival benefit of tamoxifen in male breast cancer: prospective cohort analysis. *Br J Cancer* 2020;123(1):33–7. DOI: 10.1038/s41416-020-0857-z
76. Wang L., Cui M., Cheng D. et al. MiR-9-5p facilitates hepatocellular carcinoma cell proliferation, migration and invasion by targeting ESR1. *Mol Cell Biochem* 2021;476(2):575–83. DOI: 10.1007/s11010-020-03927-z
77. O'Brien M.H., Pitot H.C., Chung S.-H. et al. Estrogen receptor- α suppresses liver carcinogenesis and establishes sex-specific gene expression. *Cancers (Basel)* 2021;13(10):2355. DOI: 10.3390/cancers13102355
78. Li Z., Tuteja G., Schug J., Kaestner K.H. Foxa1 and Foxa2 are essential for sexual dimorphism in liver cancer. *Cell* 2012;148(1–2): 72–83. DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.026
79. Zhao Y., Li Z. Interplay of estrogen receptors and FOXA factors in the liver cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2015;418 Pt 3(03):334–9. DOI: 10.1016/j.mce.2015.01.043
80. Sun L., Gao Z., Luo L. et al. Estrogen affects cell growth and IGF-1 receptor expression in renal cell carcinoma. *Oncotargets Ther* 2018;11:5873–8. DOI: 10.2147/OTT.S172149
81. Yu C.P., Ho J.Y., Huang Y.T. et al. Estrogen inhibits renal cell carcinoma cell progression through estrogen receptor-beta activation. *PLoS One* 2013;8(2):e56667. DOI: 10.1371/journal.pone.0056667
82. Passarelli M.N., Phipps A.I., Potter D.J. et al. Common single-nucleotide polymorphisms in the estrogen receptor β promoter are associated with colorectal cancer survival in postmenopausal women. *Cancer Res* 2013;73(2):767–75. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2484
83. Matsuoka H., Tsubak M., Yamazoe Y. et al. Tamoxifen inhibits tumor cell invasion and metastasis in mouse melanoma through suppression of PKC/MEK/ERK and PKC/PI3K/Akt pathways. *Exp Cell Res* 2009;315(12):2022–32. DOI: 10.1016/j.yexcr.2009.04.009
84. Chen P., Sheikh S., Ahmad A. et al. Orally administered endoxifen inhibits tumor growth in melanoma-bearing mice. *Cell Mol Biol Lett* 2018;23:3. DOI: 10.1186/s11658-017-0068-7
85. Hartwell H.J., Petrosky K.Y., Fox J.G. et al. Prolactin prevents hepatocellular carcinoma by restricting innate immune activation of c-Myc in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(31):11455–60. DOI: 10.1073/pnas.1404267111

Вклад авторов

Г.А. Белицкий: определение структуры обзора, проведение системного анализа, подготовка иллюстративного материала, обобщение данных и написание текста статьи;

К.И. Кирсанов: обзор литературы по теме статьи, написание раздела «Хромосомный фактор полового диморфизма», редактирование;

Е.А. Лесовая: обзор литературы по теме статьи, написание раздела «Роль гормонального профиля», редактирование;

В.П. Максимова: обзор литературы по теме статьи, подготовка иллюстративного материала, редактирование;

Л.В. Кривошеева: обзор литературы по теме статьи, проведение системного анализа;

М.Г. Якубовская: определение структуры обзора, проведение системного анализа, обобщение данных, редактирование.

Authors' contribution

G.A. Belitsky: defining the structure of the review, conducting a system analysis, preparing illustrative material, summarizing data, article writing;

K.I. Kirsanov: literature review on the topic of the article, writing the section “Chromosomal factor of sexual dimorphism”, editing;

E.A. Lesovaya: literature review on the topic of the article, writing the section “The role of the hormonal profile”, editing;

V.P. Maksimova: literature review on the topic of the article, preparation of illustrative material, editing;

L.V. Krivosheeva: literature review on the topic of the article, system analysis;

M.G. Yakubovskaya: defining the structure of the review, conducting system analysis, summarizing data, editing.

ORCID авторов / ORCID authors

Г.А. Белицкий / G.A. Belitsky: <https://orcid.org/0000-0002-3167-7204>

К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>

Е.А. Лесовая / E.A. Lesovaya: <https://orcid.org/0000-0002-1967-9637>

В.П. Максимова / V.P. Maksimova: <https://orcid.org/0000-0003-0896-2952>

М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-65-00003).

Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 23-65-00003).

Статья поступила: 22.07.2023. **Принята к публикации:** 24.08.2023.

Article submitted: 22.07.2023. **Accepted for publication:** 24.08.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-36-49



Роль микоплазм в качестве инфекционного агента при канцерогенезе

М.А. Галямина, О.В. Побегуц, А.Ю. Горбачев

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. акад. Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»; Россия, 119435 Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

Контакты: Мария Алексеевна Галямина mrogova@gmail.com

В обзоре представлены данные исследований о роли микоплазм в качестве инфекционных агентов при канцерогенезе, а также их участии в медикаментозной терапии рака и влиянии на исход лечения. Микоплазмы представляют особый интерес, поскольку обладают уникальными способностями легко прикрепляться к эукариотическим клеткам и проникать в них, модулировать их функциональное состояние и вызывать хроническое воспаление, избегая действия иммунной системы хозяина. В обзоре представлены данные, подтверждающие повышенную колонизацию микоплазмами опухолевой ткани по сравнению со здоровой, описаны молекулярные механизмы, с помощью которых микоплазмы активируют экспрессию онкогенов и факторов роста, инактивируют супрессоры опухоли, способствуют NF-κB-зависимой миграции опухолевых клеток и модулируют апоптоз, что приводит к аномальному росту и трансформации клеток хозяина. Также анализируется эффективность противоопухолевых препаратов при микоплазменной инфекции.

Ключевые слова: микоплазменная инфекция, канцерогенез, метаболизм нуклеозидов, антиметаболиты

Для цитирования: Галямина М.А., Побегуц О.В., Горбачев А.Ю. Роль микоплазм в качестве инфекционного агента при канцерогенезе. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(3):36–49. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-36-49

The role of mycoplasmas as an infectious agent in carcinogenesis

M.A. Galyamina, O.V. Pobeguts, A.Yu. Gorbachev

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency; 1a Malaya Pirogovskaya St., Moscow 119435, Russia

Contacts: Mariya Alekseevna Galyamina mrogova@gmail.com

The review presents data on studies of the role of mycoplasmas as infectious agents in carcinogenesis, as well as their participation in cancer drug therapy and the impact on the outcome of treatment. Mycoplasmas are of particular interest because they have unique abilities to readily attach to and enter eukaryotic cells, modulate their functional state, and induce chronic inflammation while evading the host's immune system. The review will highlight the data confirming the increased colonization of tumor tissue by mycoplasmas compared to healthy ones, describe the molecular mechanisms by which mycoplasmas activate the expression of oncogenes and growth factors, inactivate tumor suppressors, promote NF-κB-dependent migration of cancer cells and modulate apoptosis, which results in abnormal growth and transformation of host cells. The review also presents data on the effectiveness of anticancer drugs in mycoplasma infections.

Keywords: mycoplasmas infection, carcinogenesis, nucleoside metabolism, antimetabolites

For citation: Galyamina M.A., Pobeguts O.V., Gorbachev A.Yu. The role of mycoplasmas as an infectious agent in carcinogenesis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(3):36–49. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-36-49

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени проведено довольно много исследований, подтверждающих тесную связь между злокачественными новообразованиями и хроническим воспалением, возникающим в результате персис-

тирующих бактериальных или вирусных инфекций. По данным Американского онкологического общества (American Cancer Society, ACS), до 20 % случаев рака во всем мире связаны с инфекционными агентами [1]. Микробиом способен модулировать клеточный

цикл, изменять иммунный ответ, гормональный метаболизм, поддерживать гомеостаз, влиять на клеточный апоптоз и пролиферацию, вызывать различные заболевания и способствовать проканцерогенному состоянию клеток организма [2–4]. Причинно-следственная связь между различными типами рака и многими онковирусами (вирусы папилломы человека, гепатита В и Эпштейна–Барр), а также бактериями убедительно доказана. Показано, что *Streptococcus bovis* обладает онкогенными свойствами, способствующими развитию рака толстой кишки, *Salmonella thyphi* – рака желчного пузыря, *Chlamydia pneumoniae* – рака легких, *Helicobacter pylori* – рака желудка [4–8].

В настоящее время получено достаточное количество данных, подтверждающих связь между микоплазмами и развитием злокачественных новообразований. Микоплазмы идеально подходят на роль агентов, способствующих трансформации нормальных клеток в опухолевые, поскольку могут вызывать бессимптомное хроническое воспалительное состояние без ущерба для жизнеспособности инфицируемых клеток [9].

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКОПЛАЗМ В КЛЕТКАХ ОПУХОЛЕЙ

Микоплазмы относятся к классу *Mollicutes* и представляют собой бактерии с минимальным размером генома (от 600 до 2200 тыс. п. о.). Значительная редукция генома этих бактерий связана с паразитическим образом жизни [10]. Из-за отсутствия клеточной стенки микоплазмы активно подвергаются воздействию окружающей среды, поэтому в процессе эволюции они приобрели способность успешно выживать в условиях стресса, избегая влияния иммунной системы хозяина и получая возможность свободно персистировать в организме. Одним из таких механизмов является внутриклеточная инвазия. Многие микоплазмы способны не только прикрепляться к эукариотическим клеткам хозяина, но и проникать в них, свободно реплицироваться, не вызывая клеточной гибели [11, 12]. Другим механизмом является фенотипическая пластичность, обусловленная постоянной сменой поверхностных антигенов [11, 13]. Липопротеины микоплазм могут не только играть роль адгезинов или антигенов, но и активировать провоспалительный ответ [14], модулировать клеточный апоптоз, связывать иммуноглобулины, тем самым инактивируя их функции [15, 16].

Онкогенный потенциал и роль микоплазм в развитии рака начали исследовать с 1950-х годов. *Mycoplasma orale* (*M. orale*) – один из первых видов этих бактерий, которых стали связывать с лейкозом человека [17]. Позже во многих исследованиях была показана зависимость между микоплазменной инфекцией и раком предстательной железы (РПЖ), желудка, пищевода, легких и молочной железы. Появилось много сообщений об идентификации микоплазм в злокачественных опухолях либо путем количественной полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном

времени (кПЦР) и иммуногистохимии, либо косвенно – путем определения антител к белкам микоплазмы в крови пациентов. Анализировались парафинизированные блоки злокачественных опухолей и околоопухолевых тканей, хирургический и биопсийный материал, а также клеточные линии. Так, методом иммуноблоттинга с использованием специфических зондов рДНК микоплазмы у 11 из 23 (48 %) японских пациентов с раком желудка была обнаружена *Mycoplasma hyorhinae* (*M. hyorhinae*) [18]. Удалось даже культивировать эту микоплазму из биоптатов, что является неопровержимым доказательством ее существования в тканях опухолей. Более высокие показатели – около 56 [19] и 54,1 % [20] – были зарегистрированы в опухолях китайских пациентов с использованием иммуногистохимического (ИГХ) анализа. С помощью количественной ПЦР с ИГХ-исследованием в опытной и контрольной группах в 120 парафинизированных образцах желудка были определены представители *Mollicutes*, в частности *M. hyorhinae* (в 12 и 2,5 % случаев соответственно). Авторы предполагают, что эти показатели коррелировали с папиллярной гистологической картиной из-за трансформации клеток, вызванной микоплазменной инфекцией [21]. В ходе анализа 46 образцов быстрозамороженных опухолевых тканей с помощью метода секвенирования из геля продуктов ПЦР были выявлены *Mycoplasma salivarium* (*M. salivarium*) и *Mycoplasma arginini* (*M. arginini*) [22]. Разработанный комбинированный метод (кПЦР + иммуноферментный анализ) для определения 15 видов микоплазм у женщин с раком яичников позволил обнаружить микоплазмы у 60 % протестированных пациенток [23]. В работе S. Banerjee и соавт. показано, что в 74 % случаев рака яичников в злокачественных клетках выявлялась микоплазма [24]. С помощью ПЦР у пациенток с раком шейки матки идентифицировали *Ureaplasma* spp. в 51,4 % случаев, *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) – в 34 %, *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) – в 2,3 % [25]. Предполагают, что эти микоплазмы обладают онкогенным потенциалом и способствуют развитию иммортализации, повышенной миграции и инвазии опухолевых клеток при раке простаты. Методом кПЦР в образцах, полученных от пациентов с повышенным уровнем простатического специфического антигена (ПСА), были выявлены *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*), *M. genitalium* и *M. hominis* [26–29]. Наличие *M. hominis* коррелировало с тяжестью диагноза. Отмечается значительное увеличение коэффициента инфицирования *Mycoplasma* spp. злокачественной ткани (35 %) по сравнению с соседней нормальной тканью (7 %). В ходе ПЦР-скрининга биоптатов предстательной железы российских мужчин Ю. Барикова и соавт. обнаружили, что *M. hominis* присутствовала в 3 раза чаще у пациентов с РПЖ, чем у пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ). Авторы предполагают, что инфекция *M. hominis* может быть вовлечена в развитие рака

простаты и, следовательно, рассматриваться в качестве потенциального маркера рака простаты и/или мишени для улучшения результатов профилактики и лечения этого заболевания [29].

Довольно часто проводят ретроспективные исследования архивного материала. Так, группа ученых под руководством S. Saadat изучила парафинизированные блоки тканей РПЖ и ДГПЖ. По результатам кПЦР *M. hominis* была выявлена в нескольких образцах, выделенных только из клеток РПЖ. Как предполагают авторы, встречаемость микоплазменной инфекции именно при злокачественном проявлении может свидетельствовать о хронической и бессимптомной колонизации этой бактерией предстательной железы [27]. В более раннем исследовании, в ходе которого также были изучены архивные образцы пациентов с РПЖ, *M. genitalium* определена в нескольких образцах независимо от степени агрессивности опухоли. Однако, как утверждают авторы, низкая представленность этого персистирующего микроорганизма указывает на его непрямую причастность к развитию РПЖ, независимо от фенотипа опухоли [30]. В ходе исследования парафинизированных тканей пациентов с РПЖ и ДГПЖ у 15 из 50 пациентов с помощью ПЦР-амплификации с дальнейшим секвенированием выявлена уреоплазменная инфекция. В большинстве своем это были больные старше 60 лет с РПЖ и показателем ПСА >4 нг/мл. По мнению авторов, представители класса *Mollicutes*, а именно *Ureaplasma parvum* (*U. parvum*) и *U. urealyticum*, причастны к развитию РПЖ, но эти предположения требуют дальнейших исследований [31]. При тестировании хирургических и биопсийных образцов в исследовании M. Osama *M. genitalium* чаще определялась у молодых пациентов с РПЖ, причем инфицированность микоплазмой коррелировала со злокачественностью данного заболевания [28].

При определении наличия микоплазменной инфекции в различных образцах требуются точность, специфичность и чувствительность методов анализа. Полимеразная цепная реакция и кПЦР являются наиболее простыми и доступными способами детекции, поскольку легко адаптируются под задачи исследователей. Так, при анализе клеточных линий лейкемии — лимфомы метод ПЦР был модернизирован: использовалась смесь праймеров, которые реагировали на ДНК любой микоплазмы. Таким образом, повысилась чувствительность определения, а также были исключены ложноположительные результаты [32]. Часто для идентификации микоплазм в опухолевой ткани используют ИГХ-анализ. Исследований, в которых применялись методы высевания микоплазм на твердые или полужидкие среды, очень мало.

Трудности в культивировании выделенных из биоптатов опухоли микоплазм связаны с тем, что, как известно, их клинические изоляты плохо растут даже в самых богатых культуральных средах. Отсутствие возможности выделять и культивировать микоплазмы

непосредственно из биоптатов опухолей остается довольно сильным аргументом, вызывающим в некоторых случаях сомнения в неопровержимом доказательстве инфицирования ею раковых тканей.

Известные случаи определения микоплазм в различных тканях опухолей и клеточных линиях представлены в табл. 1.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МИКОПЛАЗМАМИ ДЛЯ РАЗВИТИЯ И ПОДДЕРЖАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Предложены некоторые молекулярные механизмы, с помощью которых микоплазмы способствуют агрессивности опухолей (рис. 1). Эти бактерии могут действовать на разных уровнях клеточной организации: активировать экспрессию онкогенов, увеличивать продукцию факторов роста, инактивировать супрессоры опухоли, способствовать NF-κB-зависимой (NF-κB — ядерный фактор карпа B) миграции опухолевых клеток и модулировать апоптоз, тем самым потенциально помогая аномальному росту и трансформации клеток хозяина [33]. Показано, что они индуцируют хромосомную нестабильность и злокачественные трансформации, таким образом содействуя иммортализации, повышенной миграции и инвазии опухолевых клеток [34]. Было также показано, что микоплазменная инфекция может трансформировать клеточные линии, способствуя экспрессии некоторых онкогенов, таких как H-ras и c-myc. Отмечалось, что длительное инфицирование микоплазмой приводит к заметным хромосомным изменениям и неконтролируемому росту клеток [35].

Индукцированная микоплазмами злокачественная трансформация была обнаружена во многих клеточных линиях человека из разных органов, таких как клеточная линия лейомиосаркомы матки человека SK-UT-1B [36], клетки аденокарциномы легкого A549 [37] и клеточная линия нейробластомы человека BE-M17 [38]. S. Feng и соавт. изучили влияние инфекции *Mycoplasma fermentans* (*M. fermentans*) и *M. hominis* на мышиную линию кроветворных клеток 32D, которая, как известно, подвергается интерлейкин-3-зависимому апоптозу. Было обнаружено, что микоплазменная инфекция изменяет свойства клеток 32D, предотвращая их апоптотическую способность и позволяя им расти автономно, независимо от стимуляции интерлейкина-3. Об этом свидетельствовало образование опухолей после инъекции трансформированных 32D-клеток мышам [39]. В ходе изучения роли *M. hyorhinis* и *M. fermentans* при инфицировании опухолевых клеток W. Liu и соавт. выявили, что эти микоплазмы ингибируют рост иммортализованных (32D и COS-7) и опухолевых клеточных линий (HeLa и AGS). Заражение клеточной линии 32D *M. hyorhinis* и *M. fermentans* приводило к конденсации ядра, деградации клеточного генома и дисрегуляции экспрессии генов,

Таблица 1. Определение микоплазм в различных опухолевых тканях и клеточных линиях

Table 1. Detection of mycoplasmas in various tumor tissues and cell lines

Вид опухоли Tumor type	Ткань/клеточная линия Tissue/cell line	Микоплазма Mycoplasma	Метод детекции Method detection	Источ- ник Source
Острый лимфобласт- ный лейкоз Acute lymphoblastic leukemia	Костный мозг Bone marrow	<i>M. orale</i>	Гель-диффузия, фиксация комплемента (реакция бактериолиза) Gel diffusion complement fixation (bacteriolysis reaction)	[17]
Рак желудка Gastric cancer	Срезы парафинизированных тканей карциномы желудка Sections of paraffinized tissue of gastric carcinoma	<i>M. hyorhinis</i>	Иммуногистохимическое исследование, ПЦР Immunohistochemical examination, PCR	[21]
			Саузерн-блоттинг, ПЦР Southern blot analysis, PCR	[18]
			Иммуногистохимическое исследование Immunohistochemical examination	[20]
Карцинома пищева- да, легких, молочной железы и глиома Esophageal, lung, breast carcinoma and glioma	Срезы парафинизированных тканей пищевода, легкого, молочной железы, мозга Sections of paraffinized tissues of the esophagus, lung, breast, brain	<i>M. hyorhinis</i>	Иммуногистохимическое исследование, ПЦР Immunohistochemical examination, PCR	[19]
Рак яичников Ovarian cancer	Срезы парафинизированной ткани яичника Paraffinized ovarian tissue sections	<i>Mycoplasma</i> spp.	ПЦР с иммуноферментным анализом PCR with enzyme immunoassay	[23]
	Ткани рака яичников, прилегающие к опухоли ткани Ovarian cancer tissue adjacent to tumor tissue	<i>Mycoplasma</i> spp., <i>Ureaplas- ma</i> spp.	Микробные зонды, секвенирование Microbial probes, sequencing	[24]
	Замороженные биоптаты опухоли яичников Frozen ovarian tumor biopsies	<i>M. salivarium</i> , <i>M. arginini</i>	ПЦР, секвенирование PCR, sequencing	[22]
Рак шейки матки Cervical cancer	Мазок с поврежденных тканей шейки матки Swab from damaged cervical tissue	<i>M. genitalium</i> , <i>M. hominis</i> , <i>Ureaplasma</i> spp.	ПЦР, метагеномное секвенирование PCR, metagenomic sequencing	[25]
Рак предстательной железы Prostate cancer	Биоптаты рака предстательной железы Prostate cancer biopsies	<i>M. hominis</i>	ПЦР, кПЦР PCR, qPCR	[26]
	Срезы парафинизированных тканей предстательной железы Sections of paraffinized prostate tissues	<i>Ureaplasma</i> spp.	ПЦР, секвенирование PCR, sequencing	[31]
	Хирургические и биопсийные образцы рака предстательной железы и доброкачествен- ной гиперплазии предстательной железы Surgical and biopsy specimens of prostate cancer biopsies and benign prostatic hyperplasia	<i>M. genitalium</i>	ПЦР PCR	[28]
	Срезы парафинизированных тканей рака предстательной железы и доброкачествен- ной гиперплазии предстательной железы Sections of paraffinized tissues of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia	<i>M. hominis</i>	ПЦР PCR	[27]
	Срезы парафинизированных тканей рака предстательной железы Sections of paraffinized tissues of prostate cancer	<i>M. genitalium</i>	ПЦР PCR	[30]
Лимфома Lymphoma	Клеточные линии лейкемии – лимфомы Leukemia-lymphoma cell line	<i>Mycoplasma</i> spp.	кПЦР qPCR	[32]

Примечание. ПЦР – полимеразная цепная реакция; кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени.

Note. qPCR – quantitative polymerase chain reaction with real-time detection.

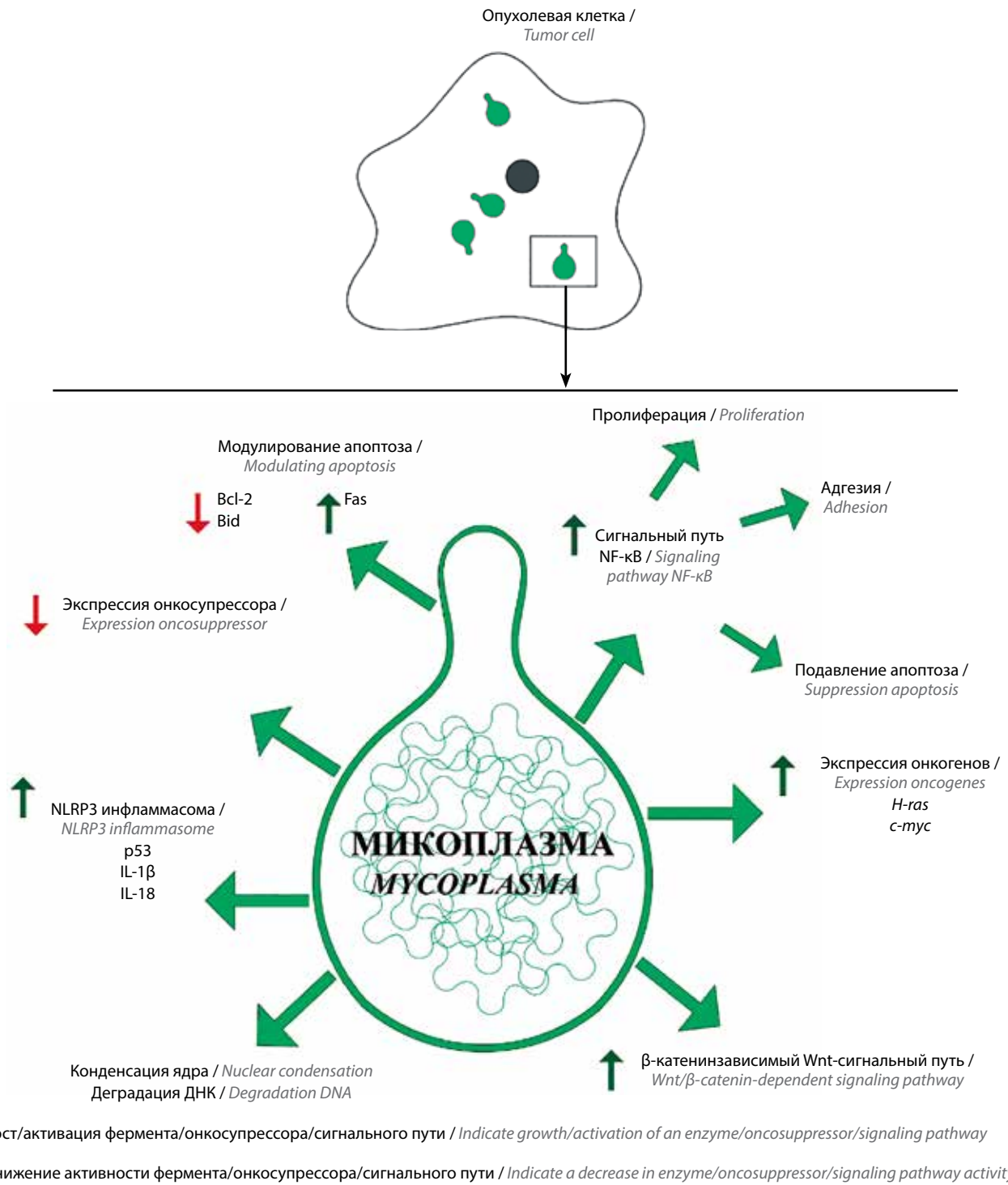


Рис. 1. Молекулярные механизмы, используемые микоплазмами для развития и поддержания опухолевых клеток. *Bcl-2* – белок-регулятор, обладающий антиапоптотической активностью; *Bid* – белок-регулятор, являющийся связующим звеном между двумя направлениями апоптоза; *Fas* – белок-рецептор на поверхности клетки, который реагирует на внешний сигнал и запускает процесс апоптоза; *NF-κB* – ядерный фактор карра В, универсальный фактор транскрипции, контролирующей экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла; *H-ras* – уникальная изоформа семейства *Ras GTPase*, одного из наиболее заметно мутировавших семейств онкогенов в раковых заболеваниях; *c-myc* – один из наиболее важных факторов транскрипции, регулирующий широкий спектр клеточных функций, включая пролиферацию, рост и апоптоз; *IL-1β* – интерлейкин-1β; *IL-18* – интерлейкин-18

Fig. 1. Molecular mechanisms that mycoplasmas use to develop and maintain tumor cells. *Bcl-2* – regulatory protein that is a link between two directions of apoptosis; *Bid* – regulatory protein that is a link between two directions of apoptosis; *Fas* – is a receptor protein on the cell surface that responds to an external signal and triggers the apoptosis process; *NF-κB* – nuclear factor kappa B, is a universal transcription factor that controls the expression of immune response, apoptosis, and cell cycle genes; *H-ras* – unique isoform of the *Ras GTPase* family, one of the most prominently mutated families of oncogenes in cancer; *c-myc* – one of the most important transcription factors regulating a wide range of cellular functions, including proliferation, growth and apoptosis; *IL-1β* – interleukin 1β; *IL-18* – interleukin 18

связанных с пролиферацией, апоптозом, онкогенезом, сигнальными путями и метаболизмом. Экспрессия генов, кодирующих белки Bcl-2, Bid и p53 и ассоциированных с апоптозом, снижалась, в то время как экспрессия гена, кодирующего апоптозный антиген Fas, увеличивалась. Таким образом, авторы показали, что микоплазменная инфекция ингибирует рост клеток путем модификации профилией экспрессии генов и посттрансляционной модификации белков, связанных с пролиферацией и апоптозом [40]. Д. Ю. Логунов и соавт. изучили влияние 4 видов микоплазм — *M. fermentans*, *M. arginini*, *M. hominis* и *Mycoplasma arthritidis* (*M. arthritidis*) — на экспрессию гена, кодирующего супрессор опухоли белок p53, а также на ген NF-κB (оба участвуют в поддержании стабильности клеточного цикла). Эксперименты, проведенные *in vitro* на панели клеточных линий человека и мышей, показали, что микоплазменные инфекции ингибируют активность p53 и активируют NF-κB. Однако белок микоплазмы, который непосредственно участвует в этом, не был идентифицирован [41]. Исследование Y. Wang и соавт. показало, что микоплазмы более успешно заражают клетки гепатоцеллюлярной карциномы с нокдаун митохондриального транскрипционного фактора A (TFAM). Как следствие, активируется сигнальный путь NF-κB, увеличивается способность клеток к миграции, инвазии и метастазированию. Было показано, что при снижении этого фактора транскрипции активируется фактор транскрипции Sp1, что влечет за собой повышение уровня аннексина A2 (ANXA2), который взаимодействует с мембранным белком микоплазмы [42].

В других исследованиях было показано, что *M. hyorhina* активирует сигнальный путь β-катенина в опухолевых клетках желудка с участием гликогенсинтазы киназы 3 β (GSK3β) и белка-рецептора липопротеинов низкой плотности (LRP6). При этом обнаружено взаимодействие между LRP6 и липопротеином p37 *M. hyorhina* [43]. Микоплазменный мембранный белок p37 предложен в качестве онкогена. В работах S. Goodison и соавт. показана роль липопротеина p37 *M. hyorhina* в инвазии клеток линий рака простаты PC3 и DU145. Авторы обнаружили, что p37 вызывает изменения морфологии и экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие в клеточном цикле, сигнальной трансдукции и метаболизме [44]. Показано также, что p37 может не только индуцировать экспрессию воспалительных цитокинов, но и задействовать множественные сигнальные пути, активируя протеинкиназы, включая каскад фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K)/АКТ, семейство протеинкиназ C (PKC) и митоген-активируемую протеинкиназу (MAPK)/RAS, что увеличивает инвазивность клеток рака предстательной железы [10, 43]. Исследование Y. Zhang и соавт. продемонстрировало, что блокировка взаимодействия белка p37 и его рецептора TLR4 на мембране клеток плоскоклеточного рака пищевода с помощью аптамера ZY3A, способ-

ного нейтрализовать *M. hyorhina* на клетках этой опухоли, приводит к ингибированию миграции и инвазии клеток, инфицированных *M. hyorhina in vitro*, и метастазирования *in vivo* [45].

В качестве белка-онкогена предложен еще один компонент микоплазмы — шаперон DnaK. F. Benedetti и соавт. удалось обнаружить, что DnaK *M. hyorhina* связывает поли (АДФ-рибоза) — полимеразу (PARP), которая играет критическую роль в путях, участвующих в распознавании повреждения и репарации ДНК, и снижает его каталитическую активность. Он также связывает белок USP10 (ключевой регулятор онкосупрессора p53), тем самым снижая стабильность p53 и противораковые функции. Показано, что неинфицированные клетки поглощают экзогенный DnaK, что предполагает возможную функцию в стимулировании клеточной трансформации, помимо прямой микоплазменной инфекции [46]. Поскольку этот белок консервативен среди бактерий и другие бактериальные DnaK схожи по структуре и аминокислотному составу, авторы предложили новый механизм, при котором компоненты микробиоты человека способны модифицировать активность протеинкиназ, участвующих в канцерогенезе и прогрессировании рака. Роль *M. hyorhina* в злокачественной трансформации была также продемонстрирована в работе Y. Xu и соавт. [47]. Чтобы уточнить, способствует ли *M. hyorhina* развитию опухоли посредством активации инфламмосомы NLRP3 (белковый комплекс, контролирующей созревание важных провоспалительных цитокинов интерлейкина-1β (ИЛ-1β) и интерлейкина-18 (ИЛ-18) и участвующий в онкогенезе и метастазировании различных видов рака), был проведен анализ продукции цитокинов ИЛ-1β и ИЛ-18 моноцитами при инфицировании этой бактерией. Показано, что индуцированная *M. hyorhina* секреция цитокина ИЛ-1β была инфламмосомозависимой *in vitro* и *in vivo*. Микоплазма влияла на активность катепсина В, отток K⁽⁺⁾, приток Ca⁽²⁺⁾ и продукцию активных форм кислорода, необходимых для активации NLRP3 инфламмосомы. Авторы предполагают, что вызванная микоплазмой активация NLRP3 инфламмосомы может быть связана с метастазированием рака желудка, а антимиоплазменная терапия — являться эффективным подходом для контроля прогрессирования рака желудка. Был предложен еще один механизм участия микоплазм в поддержании злокачественного перерождения клеток, нарушающий противоопухолевый процесс. Микоплазма подавляет активность естественных клеток-киллеров, которые распознают и устраняют опухолевые или патоген-инфицированные клетки [48]. В ходе использования моделей, имитирующих воспалительную среду опухоли, авторы наблюдали, что макрофаги защищают клеточные линии хронического миелоидного лейкоза от атаки клеток-киллеров только тогда, когда они были заражены микоплазмой и находились в состоянии хронической инфекции. Эта работа служит еще одним

доказательством того, что воспаление, вызванное микоплазменной инфекцией, способствует прогрессированию рака; в данном случае оно связано со снижением активности клеток-киллеров, опосредованной макрофагами. Одним из немногих исследований, в ходе которого обнаружено влияние микоплазмы на трансформацию нормальных клеток в злокачественные, является работа К. Namiki и соавт. Показано, что длительная хроническая инфекция доброкачественных клеток предстательной железы человека ВРН-1 двумя видами микоплазмы (*M. genitalium* и *M. hyorhinis*) приводит к злокачественной трансформации доброкачественных эпителиальных клеток человека [49].

Таким образом, получено много данных, подтверждающих участие микоплазм в развитии разных типов рака. Были идентифицированы микоплазмы в злокачественных опухолях и в крови больных пациентов, а также предложены некоторые молекулярные механизмы, с помощью которых микоплазмы способствуют агрессивности рака, определены 2 возможных онкогена — липопротеин p37 и шаперон DnaK (рис. 2). Однако молекулярные механизмы и пути воздействия микоплазм исследованы недостаточно. В основном в их качестве рассматриваются активация некоторых сигнальных путей, антиапоптотических белков, ингибирование белков-супрессоров опухоли. Большинство молекулярных механизмов, ответственных за дедифференцировку опухоли, агрессивность и развитие рецидивов, еще предстоит открыть. Влияние микоплазменных инфекций на поддержание и развитие канцерогенеза представлено в табл. 2.

ВЛИЯНИЕ МИКОПЛАЗМ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

В начале 1950-х годов впервые сообщалось о синтезе и цитостатической активности аналогов пуриновых нуклеозидов. Несколько исследований продемонстрировали ингибирующую активность против мышинных опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* таких соединений, как 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин и 2,6-диаминопурин. Первоначально они нашли применение в лечении гематологических злокачественных новообразований, но в настоящее время различные производные пиридиноновых и пуриновых нуклеозидов также проявляют активность в отношении нескольких видов рака. Например, такой пиридиноновый аналог нуклеозидов, как гемцитабин (2',2'-дифтор-2'-дезоксцитидин), используется при лечении рака мочевого пузыря, поджелудочной железы и легкого [50–52]. В работе М. V. Сропауег и соавт. было показано его ингибирующее влияние на пролиферацию опухолевых клеток предстательной железы LNCaP [52]. Большинство антиметаболитов тормозят синтез пуриновых и пиридиноновых нуклеотидов, необходимых для построения ДНК, ингибируют ферменты, отвечающие за репликацию ДНК. Препараты этой группы могут также снижать эффективность синтеза РНК, нарушать

метаболизм аминокислот и синтез белков. Все это в конечном счете приводит к индукции апоптоза и гибели злокачественных клеток. По химической структуре можно выделить 3 различных класса пуриновых и пиридиноновых антиметаболитов: тиопурины, фторпиримидины и 2'-дезоксирибонуклеозидные аналоги [53]. Синтезированный еще в 1950-х годах 5-фторуридин стал одним из основных препаратов противоопухолевой химиотерапии, применяемым, несмотря на 50-летнюю историю, для лечения многих злокачественных новообразований до настоящего времени.

Было обнаружено, что микоплазменные инфекции снижают эффективность противоопухолевых препаратов — аналогов нуклеозидов (антиметаболитов). Показано, что цитостатическая активность антиметаболитов резко (в 20–150 раз) снижалась при инфицировании *M. hyorhinis* клеточной линии MCF-7, полученной из инвазивной аденокарциномы протоков молочной железы человека. Цитостатическая актив-

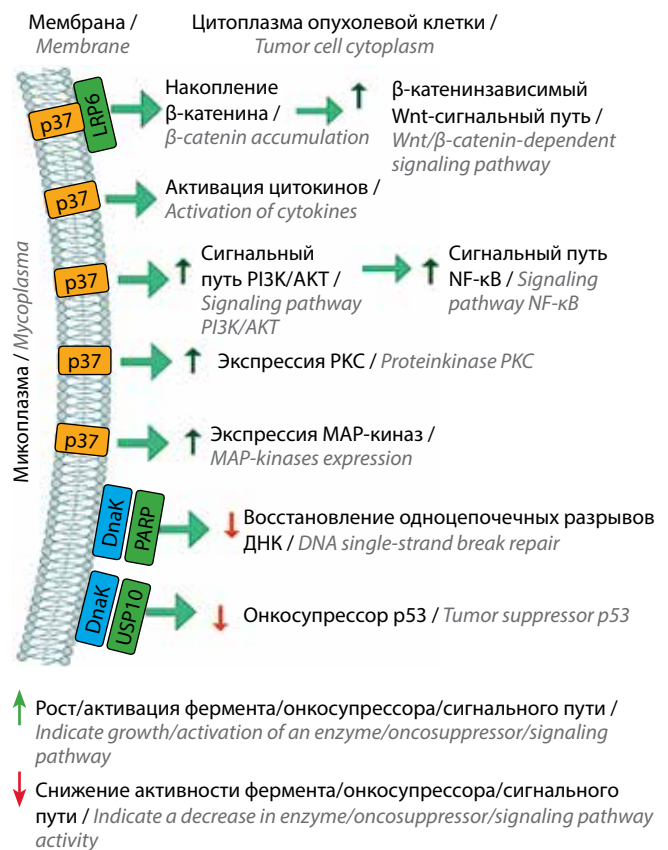


Рис. 2. Пути влияния белков-онкогенов микоплазм p37 и DnaK на развитие и поддержание опухолевых клеток. LRP6 — белок-рецептор липопротеинов низкой плотности; PARP — поли (АДФ-рибоза) — полимеразы; USP10 — ключевой регулятор онкосупрессора p53; PI3K — фосфатидилинозитол-3-киназа; NF-kB — ядерный фактор карра В; PKC — протеинкиназа С

Fig. 2. Pathways of influence of mycoplasma p37 and DnaK oncogene proteins on the development and maintenance of tumor cells. LRP6 low-density lipoprotein receptor-related protein 6. PARP — poly (ADP-ribose) polymerase; USP10 — a key regulator of the p53 tumor suppressor; PI3K — phosphatidylinositol 3-kinase; NF-kB — nuclear factor kappa B; PKC — protein kinase C

ность полностью восстанавливалась в присутствии ингибитора тимидинфосфорилазы (5-хлор-6-[1-(2-иминопирролидинил) метил] урацила гидрохлорида). Снижение цитостатической активности сопровождалось уменьшением включения препарата в нуклеиновые кислоты в случае 5-трифтортимидина [54]. В двух независимых исследованиях S. Liekens и соавт. и V. Voorde и соавт. было показано снижение эффективности противоопухолевых и противовирусных препаратов на основе нуклеозидов при инфицировании микоплазмами [55, 56]. L. Jetté и соавт. обнаружили, что культуры клеток рака толстой кишки НСТ116 в 5 и 100 раз были более устойчивы к 5-фторуридину и 5-фтор-2'-дезоксифторуридину соответственно при инфицировании ми-

коплазмами [57]. Таким образом, микоплазменная инфекция может привести как к уменьшению, так и к увеличению цитостатической активности лекарства в зависимости от того, требует оно дополнительной активации или нет. Эти биологические эффекты могут быть нормализованы путем совместного применения антибиотиков, направленных на микоплазмы, или специфического ингибитора тимидинфосфорилазы. Активность антимаболитов, требующих фосфорилиза в качестве стадии активации, была, наоборот, повышена в культурах опухолевых клеток, инфицированных микоплазмами. Цитостатический потенциал 5'-дезоксифторуридина – промежуточного метаболита капецитабина – был увеличен в 30 раз благодаря

Таблица 2. Влияние микоплазменных инфекций на поддержание и развитие канцерогенеза
Table 2. Effect of mycoplasma infections on the maintenance and development of carcinogenesis

Мико-плазма Mycoplasma	Клеточная линия Cell line	Механизм/результат влияния микоплазменной инфекции Mechanism/result of influence of mycoplasma infection	Источ-ник Source
<i>A. laidlawii</i> (штамм PG-8) <i>A. laidlawii</i> (strain PG-8)	Лейомиосаркома матки человека SK-UT-1B Human uterine leiomyosarcoma SK-UT-1B	Существенно изменялся характер распределения клеток по числу хромосом по сравнению с контролем. Происходило постепенное увеличение в 13 раз количества дицентриков в опытных образцах, тогда как количество хроматидных разрывов увеличивалось только в 2 раза. Дицентрики появлялись независимо от других типов хромосомных аберраций и увеличивались в количестве по мере удлинения срока контаминации The nature of the distribution of cells according to the number of chromosomes changed significantly in comparison with the control. There was a gradual increase in the number of dicentric chromosomes in the experimental samples by 13 times, while the number of chromatid breaks increased only 2 times. Dicentric chromosomes appear independently of other types of chromosomal aberrations and increase in number as the duration of contamination increases	[36]
<i>M. fermentans incognitus</i> , <i>M. hominis</i>	Миелоидная клеточная линия мыши 32D ИЛ-3-зависимая Myeloid cell line of mouse 32D IL-3-dependent	Неинфицированные контрольные клетки не экспрессировали <i>BMP2</i> в среде, не содержащей ИЛ-3. Инфицированные клетки индуцировали экспрессию матричной РНК <i>BMP2</i> в течение 4 ч после инфекции Uninfected control cells did not express <i>BMP2</i> in medium without IL-3. Infected cells induced <i>BMP2</i> matrix RNA expression within 4 hours of infection	[37]
	BEAS-2B (иммортализованные клетки бронхиального эпителия человека) BEAS-2B (immortalized human bronchial epithelial cells)	Микоплазменная инфекция запускала экспрессию зрелого секретируемого белка <i>BMP2</i> в клетках BEAS-2B, которые в норме не экспрессируют его. <i>BMP2</i> стимулировал пролиферацию клеток BEAS-2B, трансформированных хронической микоплазменной инфекцией. Хронически инфицированные микоплазмой клетки BEAS-2B вызывали низкодифференцированные, высокозлокачественные и инвазивные опухоли у мышей Mycoplasma infection triggered the expression of the mature secreted <i>BMP2</i> protein in BEAS-2B cells, which normally do not express <i>BMP2</i> . <i>BMP2</i> stimulated proliferation of BEAS-2B cells transformed by chronic mycoplasma infection. Chronically infected with mycoplasma, BEAS-2B cells induced low-grade, high-grade, and invasive tumors in mice	
<i>M. arginini</i>	A549 (клетки аденокарциномы легкого) A549 (lung adenocarcinoma cells)	Микоплазменная инфекция стимулировала разные уровни экспрессии <i>BMP2</i> в клетках A549 разных штаммов (от неопределяемого до высокого). Высокий уровень <i>BMP2</i> коррелировал с микоплазменной инфекцией Mycoplasma infection stimulated different levels of expression of <i>BMP2</i> in A549 cells of different strains (from undetectable to high). A high level of <i>BMP2</i> correlates with mycoplasma infection	[37]
	HELA	Две сублинии клеток HeLa (A, B) экспрессировали полноразмерную РНК <i>BMP2</i> , но только HeLa-B экспрессировала более короткую РНК. Обнаружено, что высокий уровень экспрессии РНК <i>BMP2</i> и новый транскрипт коррелируют со скрытой инфекцией <i>M. arginini</i> Two sublines of HeLa cells (A, B) both expressed the full-length <i>BMP2</i> RNA, but only HeLa-B expressed the shorter RNA. It was found that a high level of <i>BMP2</i> RNA expression and a new transcript correlate with latent infection with <i>M. arginini</i>	

Продолжение табл. 2

Continuation of table 2

Мико-плазма Mycoplasma	Клеточная линия Cell line	Механизм/результат влияния микоплазменной инфекции Mechanism/result of influence of mycoplasma infection	Источ-ник Source
<i>Mycoplasma</i> spp.	Нейробластома человека BE-M17 Human neuroblastoma BE-M17	Вызывала окислительный стресс в отсутствие воспалительной реакции с заметно повышенным уровнем повреждения ДНК. Снижала эффективность основного пути, ответственного за восстановление окислительно поврежденной ДНК Induces oxidative stress in the absence of an inflammatory response with markedly increased levels of DNA damage. Reduces the efficiency of the main pathway responsible for the repair of oxidatively damaged DNA	[38]
<i>M. fermentans</i> , <i>M. penetrans</i>	Миелоидная клеточная линия мыши 32D ИЛ-3-зависимая Mouse myeloid cell line 32D IL-3-dependent	Показана активация NF-κB-пути в ИЛ-3-зависимой клеточной линии 32D, инфицированной несколькими видами микоплазм человека. Микоплазмы продолжали расти в культуре 32D, лишенной ИЛ-3. Не обнаружено признаков аутокринной продукции ИЛ-3 в клетках 32D, инфицированных микоплазмами. Инактивированные нагреванием микоплазмы или препараты мембран микоплазм могли поддерживать непрерывный рост клеток 32D в культуре без добавления ИЛ-3 в течение значительного периода времени. При удалении инактивированных нагреванием микоплазм клетки 32D быстро погибали. Хроническая инфекция <i>M. fermentans</i> или <i>M. penetrans</i> вызывала злокачественную трансформацию клеток 32D An IL-3-dependent 32D cell line infected with several species of human mycoplasmas rapidly activating NF-κB lives and continues to grow in culture depleted of IL-3. No signs of autocrine production of IL-3 were found in cells infected with mycoplasma. Heat-killed mycoplasmas or mycoplasma membrane preparations alone could maintain continuous growth of 32D cells in culture without the addition of IL-3 for a significant period of time. However, upon removal of heat-inactivated mycoplasmas, 32D cells rapidly apoptated. Chronic infection with <i>M. fermentans</i> or <i>M. penetrans</i> induced malignant transformation of 32D cells	[39]
<i>M. hyorhinis</i> , <i>M. fermentans</i>	Миелоидная клеточная линия мыши 32D ИЛ-3-зависимая Mouse myeloid cell line 32D IL-3-dependent	Ингибировали рост. Вызывали компрессию ядра, деградацию клеточного генома и нарушение регуляции экспрессии генов, связанных с пролиферацией и апоптозом. Связанные с апоптозом белки Bcl-2, Bid и p53 подавлялись, Fas повышалась, а Вах не регулировалась в инфицированных микоплазмой клетках 32D Growth inhibited. Caused nuclear compression, cell genome degradation and dysregulation of gene expression associated with proliferation, apoptosis. Apoptosis-associated proteins Bcl-2, Bid, and p53 were down-regulated, Fas was up-regulated, and Bax was down-regulated in mycoplasma-infected 32D cells	[40]
<i>M. fermentans</i> , <i>M. arginini</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. arthritidis</i>	Фибробласты человека и мышей Human and mouse fibroblasts	Активировала путь NF-κB, а также общие характеристики большинства опухолевых клеток. <i>M. arginini</i> оказывала наиболее сильный эффект по сравнению с протестированными видами. Кроме того, микоплазменная инфекция снижала уровень экспрессии и индуцируемость эндогенного p53-чувствительного гена p21 и ингибировала апоптоз, вызванный генотоксическим стрессом. Инфекция <i>M. arginini</i> делала фибробласты эмбрионов крыс и мышей восприимчивыми к трансформации онкогенными H-Ras, тогда как свободные от микоплазмы клетки подвергались необратимой p53-зависимой остановке роста. Микоплазменная инфекция была так же эффективна, как и опосредованный shRNA-нокдаун экспрессии p53, делала фибробласты грызунов восприимчивыми к Ras-индуцированной трансформации Activates the NF-κB pathway as well as general characteristics of most tumor cells. <i>M. arginini</i> has the strongest effect among the species tested. In addition, mycoplasma infection reduces the level of expression and inducibility of the endogenous p53-sensitive p21 gene and inhibits genotoxic stress-induced apoptosis. <i>M. arginini</i> infection rendered rat and mouse embryonic fibroblasts susceptible to transformation with oncogenic H-Ras, while mycoplasma-free cells underwent irreversible p53-dependent growth arrest. Mycoplasma infection was as effective as shRNA-mediated knockdown of p53 expression in making rodent fibroblasts susceptible to Ras-induced transformation	[41]
<i>M. hyorhinis</i>	Миелоидная клеточная линия мыши 32D ИЛ-3-зависимая Mouse myeloid cell line 32D IL-3-dependent	Способствовала накоплению ядерного β-катенина и усиливала экспрессию его нижестоящих генов. Увеличивала подвижность раковых клеток. <i>M. hyorhinis</i> также индуцировала фосфорилирование LRP6 GSK3β-зависимым образом Promotes the accumulation of nuclear β-catenin and increases the expression of downstream β-catenin genes. Increases the mobility of cancer cells. <i>M. hyorhinis</i> also induces LRP6 phosphorylation in a GSK3β-dependent manner	[43]

Окончание табл. 2

The end of table 2

Мико-плазма Mycoplasma	Клеточная линия Cell line	Механизм/результат влияния микоплазменной инфекции Mechanism/result of influence of mycoplasma infection	Источ-ник Source
<i>M. hyorhinitis</i>	Клеточные линии рака простаты PC3 и DU145 Prostate cancer cell lines PC3 and DU145	Микоплазменный белок p37 индуцировал рост, изменял морфологию клеток и увеличивал экспрессию генов в клеточных линиях рака предстательной железы. Рекомбинантный p37 вызывал увеличение ядер, обозначающее активные анапластические клетки, и увеличивал миграционный потенциал клеток PC-3 и DU145 The mycoplasmal p37 protein induced growth, altered cell morphology, and increased gene expression in prostate cancer cell lines. Recombinant p37 caused an increase in nuclei, indicating active anaplastic cells, and increased the migratory potential of PC-3 and DU145 cells	[44]
	Моноцитарная клеточная линия человека THP-1 Human monocytic cell line THP-1	Микоплазменная инфекция индуцировала быструю и значительную секрецию ИЛ-1β и ИЛ-18. За индукцию ИЛ-1β отвечал мембранный белок микоплазмы, ассоциированный с липидами (LAMP). Секреция ИЛ-1β была NLRP3-зависимой <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> . Микоплазма активировала инфламмасому NLRP3 за счет активности катепсина В, оттока K ⁽⁺⁾ , притока Ca ⁽²⁺⁾ и продукции активных форм кислорода Mycoplasma infection induced rapid and strong secretion of IL-1β and IL-18. The mycoplasma lipid-associated membrane protein (LAMP) was responsible for the induction of IL-1β. IL-1β secretion was NLRP3 dependent <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> . Mycoplasma activated the NLRP3 inflammasome through cathepsin B activity, K ⁽⁺⁾ efflux, Ca ⁽²⁺⁾ influx, and reactive oxygen species production	[47]
	Гепатоцеллюлярная карцинома HCC SNU-739, SNU-368 Hepatocellular carcinoma HCC SNU-739, SNU-368	Микоплазменная инфекция усиливалась при нокдауне транскрипционного фактора А (TFAM) в клетках HCC, способствуя их метастазированию, а также миграции и инвазии за счет активации сигнального пути NF-kB Mycoplasma infection was enhanced by transcription factor A (TFAM) knockdown in HCC cells, promoting their metastasis, as well as migration and invasion due to activation of the NF-kB signaling pathway	[42]
<i>Mycoplasma</i> spp.	Клеточная линия ХМЛ CML cell line	Хроническая микоплазменная инфекция способствовала макрофагальной защите клеток ХМЛ от клеток-киллеров Chronic mycoplasma infection contributed to the macrophage protection of CML cells from killer cells	[48]
<i>M. genitalium</i> , <i>M. hyorhinitis</i>	Доброкачественные клетки предстательной железы человека ВРН-1 Benign human prostate cells BPH-1	ВРН-1 достигали независимого прикрепления и роста, а также повышенной миграции и инвазии. Злокачественность была подтверждена образованием ксенотрансплантатных опухолей у бестимусных мышей. Такие изменения приводили к увеличению кариотипической энтропии, проявляющейся накоплением хромосомных aberrаций и полисомией BPH-1 achieved independent attachment and growth, as well as increased migration and invasion. Malignancy was confirmed by the formation of xenograft tumors in athymic mice. Such changes led to an increase in karyotypic entropy, manifested by the accumulation of chromosomal aberrations and polysomy	[49]

Примечание. ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз; ИЛ-3 – интерлейкин-3; ИЛ-1β – интерлейкин-1β; ИЛ-18 – интерлейкин-18; NF-kB – ядерный фактор катепсина В.

Note. CML – chronic myeloid leukemia; IL-3 – interleukin 3; IL-1β – interleukin 1β; IL-18 – interleukin 18; NF-kB – nuclear factor kappa B.

кодируемой микоплазмой тимидинфосфорилазе, эффективно превращающей пролекарство в его активный метаболит 5-фторуридин [58]. Показано, что инфицирование микоплазмой может стимулировать изменения в метаболизме пиримидина в клетках злокачественных опухолей [59]. В частности, отмечались активация процесса катаболизма нуклеозидов и снижение активности их синтеза *de novo* в инфицированных микоплазмой эукариотических клетках [60].

У микоплазм сильно редуцированы метаболические пути, и синтезировать нуклеозиды *de novo* они не способны. Однако эти бактерии имеют ферменты, участвующие в процессе катаболизма нуклеозидов,

в результате которого они получают не только нуклеотиды для построения ДНК, но и энергию (рис. 3). Г. Фисунов и соавт. изучили протеомный профиль микоплазм и реконструировали карту энергетического метаболизма *M. hominis*. Было обнаружено, что эта бактерия может использовать нуклеозиды в качестве источника углерода. Применение нуклеозидов пиримидинового ряда позволяет ей переходить в состояние, подобное персистерам, что дает возможность быть устойчивой к антибиотикам, избегать действия иммунной системы, свободно персистировать внутри организма хозяина и вызывать хронические инфекции [61, 62]. Возможно, эта особенность метаболизма

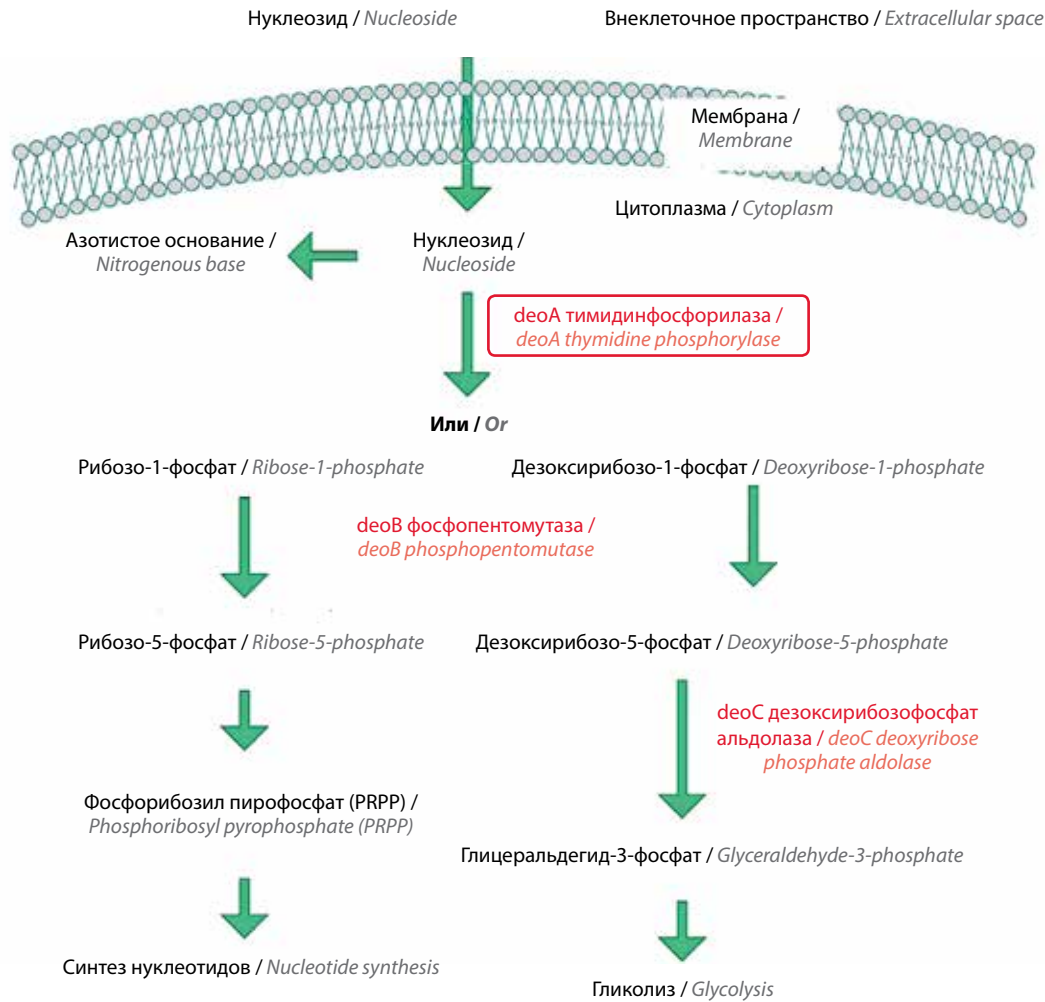


Рис. 3. Схема катаболизма нуклеозидов в клетках микоплазм
Fig. 3. Scheme of nucleoside catabolism in mycoplasma cells

микоплазм объясняет их стремление инфицировать именно злокачественные клетки, когда доступность к определенным питательным веществам повышена. Предполагают, что ферментативная активность одного из основных ферментов катаболизма нуклеозидов пиримидинового ряда микоплазм – тимидинфосфорилазы DeoA – может быть инструментом, снижающим эффективность пиримидиновых антиметаболитов (аналоги пиримидиновых нуклеозидов, такие как 5-фтор-2'-дезоксисуридин 5-трифтортимидин и 5-галогенированные 2'-дезоксисуридины, могут разлагаться тимидинфосфорилазой микоплазм до неактивных оснований) (рис. 4). Интересно, что тимидинфосфорилаза не только является ключевым ферментом катаболизма нуклеозидов пиримидинового ряда, но и идентична тромбоцитарному фактору роста эндотелиальных клеток (platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF) [63, 64]. Роль нуклеозидного метаболизма в развитии опухоли, а также механизмы влияния микоплазм на эффективность антиметаболитов требуют дальнейшего исследования.

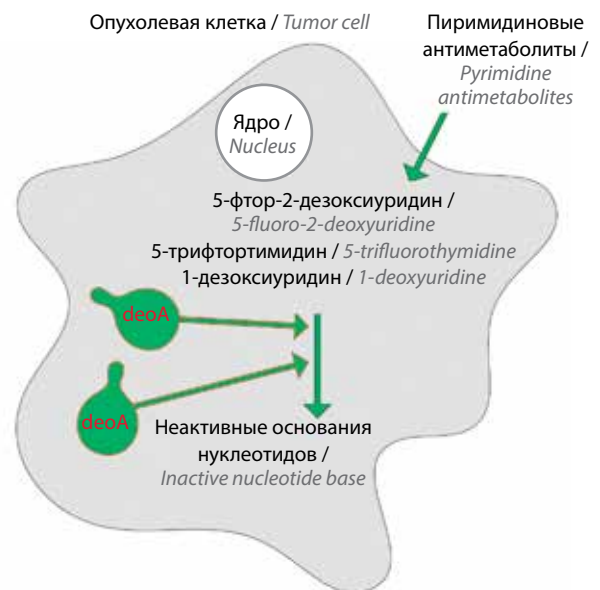


Рис. 4. Влияние микоплазм на эффективность противоопухолевых препаратов
Fig. 4. Effect of mycoplasmas on the efficacy of anticancer drugs

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, получено достаточное количество данных, подтверждающих повышенную колонизацию микоплазмами опухолевой ткани по сравнению со здоровой, их участие в злокачественной трансформации клеток, влияние на течение онкологического заболевания и исход лечения. Предложены некоторые молекулярные механизмы, с помощью которых микоплазмы способствуют иммортализации, пролиферации и инвазивности опухолевых клеток, определены два возможных онкогена микоплазм – липопротеин р37 и шаперон DnaK. Однако молекулярные механизмы и пути воздействия мико-

плазм в процессе онкогенеза требуют дальнейшего всестороннего исследования. Следует уделить более пристальное внимание изучению хронической инфекции, особенно при новообразованиях, даже если они носят доброкачественный характер. Необходимо также дальнейшее исследование взаимодействия микоплазм с нуклеозид-производными противоопухолевыми препаратами, поскольку это увеличит шансы на благоприятный исход лечения онкологических заболеваний. Нельзя исключать, что микоплазмы могут быть потенциальным маркером рака или мишенью для улучшения профилактики и терапии этой патологии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hansen J.P., Ali W.M., Sivadasan R. et al. Bacteria-cancer interface: awaiting the perfect storm. *Pathogens* 2021;10(10):1321. DOI: 10.3390/pathogens10101321
- Liu H.-X., Tao L.-L., Zhang J. et al. Difference of lower airway microbiome in bilateral protected specimen brush between lung cancer patients with unilateral lobar masses and control subjects. *Int J Cancer* 2018;142(4):769–78. DOI: 10.1002/ijc.31098
- Chambers L.M., Bussies P., Vargas R. et al. The microbiome and gynecologic cancer: current evidence and future opportunities. *Curr Oncol Rep* 2021;23(8):92. DOI: 10.1007/s11912-021-01079-x
- Littman A.J., Jackson L.A., Vaughan T.L. *Chlamydia pneumoniae* and lung cancer: epidemiologic evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(4):773–8. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0599
- Vogelmann R., Amieva M.R. The role of bacterial pathogens in cancer. *Curr Opin Microbiol* 2007;10(1):76–81. DOI: 10.1016/j.mib.2006.12.004
- Ellmerich S., Scholler M., Durantou B. et al. Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis* 2000;21(4):753–6. DOI: 10.1093/carcin/21.4.753
- Touati E. When bacteria become mutagenic and carcinogenic: lessons from *H. pylori*. *Mut Res* 2010;703(1):66–70. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2010.07.014
- Scanu T., Spaapen R.M., Bakker J.M. et al. *Salmonella* manipulation of host signaling pathways provokes cellular transformation associated with gallbladder carcinoma. *Cell Host Microbe* 2015;17(6):763–74. DOI: 10.1016/j.chom.2015.05.002
- Tsai S., Wear D.J., Shih J.W. et al. Mycoplasmas and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92(22):10197–201. DOI: 10.1073/pnas.92.22.10197
- Razin S., Yogev D., Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62(4):1094–56. DOI: 10.1128/MMBR.62.4.1094-1156.1998
- Kornspan J.D., Tarshis M., Rottem S. Invasion of melanoma cells by *Mycoplasma hyorhinis*: enhancement by protease treatment. *Infect Immun* 2010;78(2):611–7. DOI: 10.1128/IAI.01017-09
- Matyushkina D., Pobeguts O., Butenko I. et al. Phase transition of the bacterium upon invasion of a host cell as a mechanism of adaptation: a *Mycoplasma gallisepticum* model. *Sci Rep* 2016;24:6:35959. DOI: 10.1038/srep35959
- Citti C., Nouvel L.X., Baranowski E. Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiol* 2010;5(7):1073–85. DOI: 10.2217/fmb.10.71
- Zuo L.L., Wu Y.M., You X.X. Mycoplasma lipoproteins and Toll-like receptors. *J Zhejiang Univ Sci B* 2009;10(1):67–76. DOI: 10.1631/jzus.B0820256
- Arfi Y., Minder L., Di Primo C. et al. MIB–MIP is a mycoplasma system that captures and cleaves immunoglobulin G. *Proc Natl Acad Sci* 2016;113:5406–11. PMID: 27114507. DOI: 10.1073/pnas.1600546113.
- Grover R.K., Zhu X., Niesuma T. et al. A structurally distinct human mycoplasma protein that generically blocks antigen-antibody union. *Science* 2014;343(6171):656–61. DOI: 10.1126/science.1246135
- Hayflick L., Koprowski H. Direct agar isolation of Mycoplasmas from human leukaemic bone marrow. *Nature* 1965;205(4972):713–4. DOI: 10.1038/205713b0
- Sasaki H., Igaki H., Ishizuka T. et al. Presence of *Streptococcus* DNA sequence in surgical specimens of gastric cancer. *Japanese J Cancer Res* 1995;86(9):791–4. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1995.tb03086.x
- Huang S., Li J.Y., Wu J. et al. Mycoplasma infections and different human carcinomas. *World J Gastroenterol* 2001;7(2):266–9. DOI: 10.3748/wjg.v7.i2.266
- Ji J.-F., Zhang J., Shou C.-C. et al. *Mycoplasma hyorhinis* in gastric cancer. *Chinese J Cancer Res* 2002;14(2):84–7. DOI: 10.1007/s11670-002-0019-2
- Nascimento Araujo C.D., Amorim A.T., Barbosa M.S. et al. Evaluating the presence of *Mycoplasma hyorhinis*, *Fusobacterium nucleatum*, and *Helicobacter pylori* in biopsies of patients with gastric cancer. *Infect Agent Cancer* 2021;16(1):70. DOI: 10.1186/s13027-021-00410-2
- Quirk J.T., Kupinski J.M., DiCioccio A.R. Detection of Mycoplasma ribosomal DNA sequences in ovarian tumors by nested PCR. *Gynecol Oncol* 2001;83(3):560–2. DOI: 10.1006/gyno.2001.6446
- Chan P.J., Seraj I.M., Kalugdan T.H. et al. Prevalence of mycoplasma conserved DNA in malignant ovarian cancer detected using sensitive PCR-ELISA. *Gynecol Oncol* 1996;63(2):258–60. DOI: 10.1006/gyno.1996.0316
- Banerjee S., Tian T., Wei Z. et al. The ovarian cancer oncobiome. *Oncotarget* 2017;8(22):36225–45. DOI: 10.18632/oncotarget.16717
- Klein C., Samwel K., Kahesa C. et al. Mycoplasma co-infection is associated with cervical cancer risk. *Cancers (Basel)* 2020;12(5):1093. DOI: 10.3390/cancers12051093
- Erturhan S.M., Bayrak O., Pehlivan S. et al. Can mycoplasma contribute to formation of prostate cancer? *Int Urol Nephrol* 2013;45(1):33–8. DOI: 10.1007/s11255-012-0299-5
- Saadat S., Karami P., Jafari M. et al. The silent presence of *Mycoplasma hominis* in patients with prostate cancer. *Pathog Dis* 2020;78(7):ftaa037. DOI: 10.1093/femspd/ftaa037

28. Miyake M., Ohnishi K., Hori S. et al. Mycoplasma genitalium infection and chronic inflammation in human prostate cancer: detection using prostatectomy and needle biopsy specimens. *Cells* 2019;8(3):212. DOI: 10.3390/cells8030212
29. Barykova Y.A., Logunov D.Y., Shmarov M.M. et al. Association of *Mycoplasma hominis* infection with prostate cancer. *Oncotarget* 2011;2(4):289–97. DOI: 10.18632/oncotarget.256
30. Yow M.A., Tabrizi S.N., Severi G. et al. Detection of infectious organisms in archival prostate cancer tissues. *BMC Cancer* 2014;14:579. DOI: 10.1186/1471-2407-14-579
31. Abdul-Wahab O.M.S., Al-Shyarba M.H., Mardassi B.B.A. et al. Molecular detection of urogenital mollicutes in patients with invasive malignant prostate tumor. *Infect Agent Cancer* 2021;16(1):6. DOI: 10.1186/s13027-021-00344-9
32. Uphoff C.C., Drexler H.G. Detection of mycoplasma in leukemia-lymphoma cell lines using polymerase chain reaction. *Leukemia* 2002;16(2):289–93. DOI: 10.1038/sj.leu.2402365
33. Zhang S., Tsai S., Lo S.-C. Alteration of gene expression profiles during mycoplasma-induced malignant cell transformation. *BMC Cancer* 2006;6(1):116. DOI: 10.1186/1471-2407-6-116
34. Yacoub E., Saed Abdul-Wahab O.M., Al-Shyarba M.H. et al. The relationship between mycoplasmas and cancer: is it fact or fiction? Narrative review and update on the situation. *J Oncol* 2021;2021:9986550. DOI: 10.1155/2021/9986550
35. Zhang B., Shih J.W., Wear D.J. et al. High-level expression of H-ras and c-myc oncogenes in mycoplasma-mediated malignant cell transformation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;214:359–66. DOI: 10.3181/00379727-214-44104
36. Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н., Эндер Н.А. Влияние микоплазменной контаминации клеточной линии лейомиосаркомы человека SK-UT-1B на кариотипическую структуру. *Цитология* 1998;40(1):23–30. Polianskaia G.G., Efremova T.N., Ender N.A. Effect of mycoplasma contamination of the human uterine leiomyosarcoma cell line SK-UT-1B on karyotype structure. *Tsitologiya = Cytology* 1998;40(1):23–30. (In Russ.).
37. Jiang S., Zhang S., Langenfeld J. et al. Mycoplasma infection transforms normal lung cells and induces bone morphogenetic protein 2 expression by post-transcriptional mechanisms. *J Cell Biochem* 2008;104(2):580–94. DOI: 10.1002/jcb.21647
38. Ji Y., Karbaschi M., Cooke M.S. Mycoplasma infection of cultured cells induces oxidative stress and attenuates cellular base excision repair activity. *Mut Res* 2019;845:403054. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2019.05.010
39. Feng S.-H., Tsai S., Rodriguez J., Lo S.-C. Mycoplasma infections prevent apoptosis and induce malignant transformation of interleukin-3-dependent 32D hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 1999;19(12):7995–8002. DOI: 10.1128/mcb.19.12.7995
40. Liu W., Shou C. *Mycoplasma hyorhinitis* and *Mycoplasma fermentans* induce cell apoptosis and changes in gene expression profiles of 32D cells. *Biol Res* 2011;44(4):383–91.
41. Logunov D.Y., Scheblyakov D.V., Zubkova O.V. et al. Mycoplasma infection suppresses p53, activates NF-κB and cooperates with oncogenic Ras in rodent fibroblast transformation. *Oncogene* 2008;27(33):4521–31. DOI: 10.1038/onc.2008.103
42. Wang Y., Wang G., Hong X. et al. Downregulated mitochondrial transcription factor A enhances mycoplasma infection to promote the metastasis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2023;114(4):1464–78. DOI: 10.1111/cas.15715
43. Liu X., Rong Z., Shou C. *Mycoplasma hyorhinitis* infection promotes gastric cancer cell motility via β-catenin signaling. *Cancer Med* 2019;8(11):5301–12. DOI: 10.1002/cam4.2357
44. Goodison S., Nakamura K., Iczkowski K.A. et al. Exogenous mycoplasma p37 protein alters gene expression, growth and morphology of prostate cancer cells. *Cytogenet Genome Res* 2007;118(2–4):204–13. DOI: 10.1159/000108302
45. Zhang Y., Zhang H., Sun X. et al. Nucleic acid aptamer controls mycoplasma infection for inhibiting the malignancy of esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Ther* 2022;30(6):2224–41. DOI: 10.1016/j.ymthe.2022.02.018
46. Benedetti F., Cocchi F., Latinovic O.S. et al. Role of mycoplasma chaperone DnaK in cellular transformation. *Int J Mol Sci* 2020;21(4):1311. DOI: 10.3390/ijms21041311
47. Xu Y., Li H., Chen W. et al. *Mycoplasma hyorhinitis* activates the NLRP3 inflammasome and promotes migration and invasion of gastric cancer cells. *PLoS One* 2013;8(11). DOI: 10.1371/journal.pone.0077955.e77955
48. Choo Q.W.W., Koean R.A.G., Chang S.C. et al. Macrophages protect mycoplasma-infected chronic myeloid leukemia cells from natural killer cell killing. *Immunol Cell Biol* 2020;98(2):138–51. DOI: 10.1111/imcb.12309
49. Namiki K., Goodison S., Porvasnik S. et al. Persistent exposure to mycoplasma induces malignant transformation of human prostate cells. *PLoS One* 2009;4(9):e6872. DOI: 10.1371/journal.pone.0006872
50. Karamelas T., Skavatsou E., Argyros O. et al. Gemcitabine based peptide conjugate with improved metabolic properties and dual mode of efficacy. *Mol Pharm* 2017;14(3):674–85. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00961
51. Emons G., Gorchev G., Sehouli J. et al. Efficacy and safety of AEZS-108 (INN: zoptarelin doxorubicin acetate) an LHRH agonist linked to doxorubicin in women with platinum refractory or resistant ovarian cancer expressing LHRH receptors: a multicenter phase II trial of the AGO-study group (AGO GYN 5). *Gynecol Oncol* 2014;133(3):427–32. DOI: 10.1016/j.ygyno.2014.03.576
52. Cronauer M.V., Klocker H., Talasz H. et al. Inhibitory effects of the nucleoside analogue gemcitabine on prostatic carcinoma cells. *Prostate* 1996;28(3):172–81. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0045(199603)28:3<172::AID-PROS4>3.0.CO;2-H
53. Parker W.B. Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chem Rev* 2009;109(7):2880–93. DOI: 10.1021/cr900028p
54. Bronckaers A., Balzarini J., Liekens S. The cytostatic activity of pyrimidine nucleosides is strongly modulated by *Mycoplasma hyorhinitis* infection: implications for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2008;76(2):188–97. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.04.019
55. Liekens S., Bronckaers A., Perez-Perez M.J. et al. Targeting platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2007;74(11):1555–67. DOI: 10.1016/j.bcp.2007.05.008
56. Vande Voorde J., Gago F., Vrancken K. et al. Characterization of pyrimidine nucleoside phosphorylase of *Mycoplasma hyorhinitis*: implications for the clinical efficacy of nucleoside analogues. *Biochem J* 2012;445(1):113–23. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.04.019
57. Jetté L., Bissoon-Haqqani S., Le François B. et al. Resistance of colorectal cancer cells to 5-FUdR and 5-FU caused by Mycoplasma infection. *Anticancer Res* 2008;28(4B):2175–80.
58. Ishikawa T., Kamimura H., Tsuchiya A. et al. Clinical efficacy of intra-arterial pharmacokinetic chemotherapy with 5-fluorouracil, CDDP, gemcitabine, and angiotensin-II in patients with advanced pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 2007;54(80):2378–82.
59. Johnson S.M. The importance of B-cells and ecto-5′nucleotidase in *Mycoplasma fermentans* infection and the relevance to rheumatoid arthritis. *Immunology* 2008;123(2):187–96. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02686.x
60. Merckenschlager M., Kardamakis D., Rawle F.C. et al. Rate of incorporation of radiolabelled nucleosides does not necessarily reflect the metabolic state of cells in culture: effects of latent mycoplasma contamination. *Immunology* 1988;63(1):125–31.
61. Fisunov G.Y., Pobeguts O.V., Ladygina V.G. et al. Thymidine utilisation pathway is a novel phenotypic switch of *Mycoplasma hominis*. *J Med Microbiol* 2022;71(1):001468. DOI: 10.1099/jmm.0.001468

62. Rakovskaya I.V., Ermolaeva S.A., Levina G.A. et al. Microcolonies: a novel morphological form of pathogenic *Mycoplasma* spp. J Med Microbiol 2019;68(12):1747–58. DOI: 10.1099/jmm.0.001081
63. Ishikawa F., Miyazono K., Hellman U. et al. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. Nature 1989;338(6216):557–62. DOI: 10.1038/338557a0
64. Akiyama S., Furukawa T., Sumizawa T. et al. The role of thymidine phosphorylase, an angiogenic enzyme, in tumor progression. Cancer Sci 2004;95(11):851–7. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb02193.x

Вклад авторов

М.А. Галямина, О.В. Побегуц: подбор литературы по теме статьи, написание текста статьи, редактирование, подготовка таблиц и рисунков; А.Ю. Горбачев: обзор литературы по теме статьи, редактирование.

Authors' contribution

M.A. Galyamina, O.V. Pobeguts: selection of literature on the topic of the article, writing the text of the article, editing, preparation of tables and figures; A.Yu. Gorbachev: literature review on the topic of the article, editing.

ORCID автора / ORCID of author

М.А. Галямина / M.A. Galyamina: <https://orcid.org/0000-0002-3216-4320>

О.В. Побегуц / O.V. Pobeguts: <https://orcid.org/0000-0001-5265-7627>

А.Ю. Горбачев / A.Yu. Gorbachev: <https://orcid.org/0000-0002-2743-5835>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflicts of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда, (грант № 23-24-00189, <https://rscf.ru/project/23-24-00189/>).

Funding. This research was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 23-24-00189, <https://rscf.ru/project/23-24-00189/>).

Статья поступила: 13.03.2023. **Принята к публикации:** 13.06.2023.

Article submitted: 13.03.2023. **Accepted for publication:** 13.06.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-50-58



Хроническое ультрафиолетовое облучение индуцирует развитие устойчивой резистентности клеток меланомы к противоопухолевым препаратам

Ю.Ю. Щеголев¹, М.А. Карпучина¹, Д.В. Сорокин^{1,2}, А.М. Шчербаков^{1,2}, О.Е. Андреева¹, В.Е. Разуваева¹, Т.А. Богущ¹, И.Н. Михайлова^{1,3}, Л.В. Демидов¹, М.В. Гудкова¹, М.А. Красильников^{1,2}

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

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; Россия, 603022 Нижний Новгород, проспект Гагарина, 23;

³ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; Россия, 660022 Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

Контакты: Михаил Александрович Красильников krasilnikovm1@yandex.ru

Введение. Меланома относится к группе наиболее злокачественных новообразований, отличающихся агрессивным ростом и активным метастазированием. При этом эффективность терапии, в первую очередь таргетной терапии, во многом ограничена быстрым развитием резистентности к препаратам.

Цель исследования – изучить влияние хронического ультрафиолетового (УФ) облучения на формирование субпопуляции устойчивых к УФ клеток меланомы, а также особенности клеточного сигналинга и чувствительность УФ-резистентных клеток меланомы к действию противоопухолевых препаратов.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках меланомы А375. Клетки культивировали в стандартной среде DMEM + 10 % FBS, анализ скорости роста клеток проводили с помощью МТТ-теста; выживаемость клеток после облучения анализировали с использованием колониеобразующего теста. Транскрипционную активность рецептора эстрогенов (ER) определяли методом репортерного анализа при трансфекции в клетки плазмиды, содержащей ген-репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом. Для анализа экспрессии клеточных белков использовали метод иммуноблоттинга; сравнительный анализ экспрессии ER α и ER β проводили с помощью иммунофлуоресцентного метода.

Результаты. Длительное УФ-облучение приводит к формированию УФ-резистентной субпопуляции клеток меланомы А375, отличающейся пониженной чувствительностью к таргетным (вемурафенибу) и гормональным (тамоксифену) препаратам на фоне повышенной экспрессии Snail – активатора эпителиально-мезенхимального перехода и при отсутствии заметных изменений в экспрессии белков PI3K (фосфоинозитид-3-киназы)/mTOR (мишень рапамицина млекопитающих) сигналинга. Метформин снижает экспрессию Snail как в родительских, так и в УФ-резистентных клетках А375 и усиливает цитостатический эффект в комбинации с вемурафенибом или тамоксифеном.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о снижении чувствительности к таргетным препаратам клеток меланомы на фоне длительной экспозиции с УФ. Способность метформина потенцировать действие таргетных препаратов и ингибировать Snail позволяет рассматривать это лекарственное средство не только как противоопухолевый агент, но и как потенциальный ингибитор эпителиально-мезенхимального перехода.

Ключевые слова: клетки меланомы, ультрафиолетовое облучение, вемурафениб, тамоксифен, резистентность

Для цитирования: Щеголев Ю.Ю., Карпучина М.А., Сорокин Д.В. и др. Хроническое ультрафиолетовое облучение индуцирует развитие устойчивой резистентности клеток меланомы к противоопухолевым препаратам. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(3):50–8. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-50-58

Continuous ultraviolet irradiation induces the development of irreversible resistance of melanoma cells to anticancer drugs

Yu. Yu. Shchegolev¹, M. A. Karpukhina¹, D. V. Sorokin^{1,2}, A. M. Scherbakov^{1,2}, O. E. Andreeva¹, V. E. Razuvaeva¹, T. A. Bogush¹, I. N. Mikhailova^{1,3}, L. V. Demidov¹, M. V. Gudkova¹, M. A. Krasil'nikov^{1,2}

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

²National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod; 23 Gagarin Prospekt, Nizhny Novgorod 603022, Russia;

³Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Partizan Zheleznyak St., Krasnoyarsk, Russia

Contacts: Mikhail Alexandrovich Krasil'nikov krasilnikovm1@ya.ru

Introduction. Melanoma belongs to the group of the most malignant tumors characterized by aggressive growth and active metastasis. At the same time, the effectiveness of therapy, primarily targeted therapy, is largely limited by the rapid development of drug resistance.

Aim. To study the effect of chronic ultraviolet (UV) irradiation on the formation of a population of radiation-resistant melanoma cells; to study the features of cell signaling and the sensitivity of UV-resistant melanoma cells to the antitumor drugs.

Materials and methods. The experiments were carried out on *in vitro* cultured A375 melanoma cells. Cells were cultured in a standard DMEM + 10 % FBS medium; cell growth rate was analyzed using the MTT assay; cell survival after irradiation was analyzed using a colony-forming test. Determination of the transcriptional activity of the estrogen receptor (ER) was performed by reporter analysis upon transfection into cells of a plasmid containing the luciferase reporter gene controlled by estrogen responsive element. The immunoblotting method was used to analyze the expression of cellular proteins; comparative analysis of ER α and ER β expression was performed by immunofluorescent method.

Results. Long-term UV irradiation leads to the formation of a UV-resistant subpopulation of A375 melanoma cells, which is characterized by decreased sensitivity to targeted (vemurafenib) and hormonal (tamoxifen) drugs, increased expression of Snail, an activator of the epithelial-mesenchymal transition, and in the absence of noticeable changes in the expression of PI3K/mTOR signaling. Metformin reduces Snail expression in both parental and UV-resistant A375 cells and enhances the cytostatic effect in combination with vemurafenib or tamoxifen.

Conclusion. The data obtained demonstrate a decrease in the sensitivity of melanoma cells to targeted drugs under the long-term exposure to UV. The ability of metformin to potentiate the action of targeted drugs and inhibit Snail allows us to consider metformin not only as an antitumor agent, but also as a potential inhibitor of the epithelial-mesenchymal transition.

Keywords: melanoma cells, ultraviolet irradiation, vemurafenib, tamoxifen, resistance

For citation: Shchegolev Yu.Yu., Karpukhina M.A., Sorokin D.V. et al. Continuous ultraviolet irradiation induces the development of irreversible resistance of melanoma cells to anticancer drugs. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(3):50–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-50-58

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день меланома рассматривается как одно из наиболее агрессивных злокачественных новообразований кожи, отличающихся высоким риском развития рецидивирования и метастазирования. Меланома характеризуется выраженной генетической нестабильностью и высоким уровнем мутаций, среди которых наиболее распространенной является мутация в гене *BRAF*, расположенная на 600-м кодоне 15-го экзона (*BRAF*^{V600E}). В настоящее время в клиническую практику активно внедряются новые таргетные препараты, тропные к мутантному эпитопу *BRAF*, однако эффективность таргетной терапии во многом ограничена возникновением резистентности к препаратам – врожденной или приобретенной в процессе терапии.

Одним из основных внешних факторов, способствующих злокачественной трансформации меланоцитов кожи и развитию меланомы, является ультрафиолетовое (УФ) облучение, длительное воздействие которого вызывает целый каскад мутаций в ДНК меланоцитов, приводящих в итоге к трансформации клеток. Собственно, роль УФ-облучения в инициации злокачественного роста довольно хорошо изучена, идентифицированы мутации, вызванные облучением, получившие общее название УФ-сигнатуры, в том числе драйверные мутации таких генов, как *P53*, *PTEN*, *p14ARF*, *p16INK4a*, *ARID2*, *PPP6C*, *SNX31*, некоторые

варианты *BRAF* и ряд других [1]. Менее исследован вопрос о влиянии УФ-облучения на клетки, прошедшие злокачественную трансформацию. Установлено, что оно вызывает каскад апоптотических реакций в клетках меланомы, сопровождающийся остановкой клеточного деления и гибелью клеток; идентифицированы отдельные белки, участвующие в развитии УФ-индуцированного апоптоза [2]. Вместе с тем практически не изучен вопрос о воздействии хронического УФ-облучения на клетки меланомы, в том числе возможность и механизм формирования клонов клеток меланом, устойчивых к данному облучению. Продемонстрировано участие p53-сигналинга в реализации УФ-индуцированного апоптоза [3], выявлены отдельные белки, в частности MEK-ERK-STAT3-сигналинга, ассоциированные с резистентностью клеток меланом к УФ-облучению [4], однако особенности формирования УФ-резистентных клонов и взаимосвязь УФ-резистентности и чувствительности клеток меланом к противоопухолевым препаратам, в первую очередь таргетным, остаются малоисследованными.

В настоящей работе в условиях хронического УФ-облучения культивируемых *in vitro* клеток меланомы A375 была получена сублиния клеток, отличающаяся частичной резистентностью к УФ-облучению. Резистентные к УФ клетки характеризовались пониженной чувствительностью к таргетным (вемурафенибу)

и гормональным (тамоксифену) препаратам на фоне повышенной экспрессии Snail – активатора эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Метформин усиливал цитостатический эффект препаратов и снижал экспрессию Snail, что свидетельствует об активности этого лекарственного средства не только как противоопухолевого агента, но и как потенциального ингибитора ЭМП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках меланомы A375. В работе использовались методы, представленные ниже.

Культивирование клеток. Клетки меланомы A375 культивировали в стандартной среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10 % эмбриональной сыворотки телят (FBS NuClone, США) и гентамицин (50 ед./мл) («ПанЭко», Россия), при 37 °С и 5 % CO₂. Культивирование клеток выполняли в инкубаторе NU-5840E (NuAire, США). При анализе скорости роста количество клеток определяли с использованием МТТ-теста, основанного на восстановлении живыми клетками реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2)-2,5-дифенилтетразол бромид) в кристаллы формазана (нерастворимые в культуральных средах).

Репортерный анализ. Для определения транскрипционной активности рецептора эстрогенов (ER) проводили трансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген-репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом, любезно предоставленной George Reid и Frank Gannon [5]. Для контроля за эффективностью и потенциальной токсичностью процедуры трансфекции применялась котрансфекция клеток плазмидой, содержащей ген β-галактозидазы. Активность люциферазы измерялась по стандартному протоколу (Promega, США) на люминометре Tecan Infinite M200 Pro (США). Расчет активности люциферазы проводили в условных единицах (отношение общей активности люциферазы к активности галактозидазы в исследованных образцах).

Иммуноблоттинг. Клетки на стадии формирования 80 % монослоя дважды промывали на чашках (60 мм; Corning, США) 2 мл фосфатного буфера. Для получения тотального клеточного экстракта к образцам добавляли по 130 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-НСl рН 7,4; 1 % Igepal CA-630, 150 мМ NaCl, 1 мМ тетраацетата этилендиамина, 1 мМ дитиотреитола, 1 мкг/мл аprotинина, леупептина и пепстатина, 1 мМ фторида натрия и ортованадата натрия (Merck, США). Образцы клеточных экстрактов центрифугировали (10 000 g, 10 мин, 4 °С, центрифуга Eppendorf 5417R) и проводили стандартный электрофорез и иммуноблоттинг, как описано ранее [6]. В цитозольных экстрактах исследовали содержание расщепленной формы PARP, phospho-p53, p53, Snail, мишень рапамицина млекопитающих (mTOR), phospho-mTOR, phospho-S6K, S6K, phospho-Akt, Akt, Slug, ERα (Cell Signaling

Technology, США). Для контроля эффективности иммуноблоттинга использовали антитела к α-тубулину (Cell Signaling Technology, США).

Анализ экспрессии рецепторов эстрогенов α и β иммунофлуоресцентным методом. В работе использовались первичные моноклональные антитела к ERα и ERβ и вторичные антикроличьи антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем DyLight650 (Abcam, ab98510). Клетки A375 инкубировали с первичными антителами 14–16 ч при +37 °С в темноте, со вторичными – 1,5 ч при +4 °С в темноте. Интенсивность флуоресценции клеток оценивали на проточном цитометре Beckman Coulter Navios. Специфическая флуоресценция клеток рассчитывалась в программе FlowJo 10.0.8 с помощью критерия Колмогорова–Смирнова.

Ультрафиолетовое облучение и отбор устойчивых к ультрафиолетовому облучению клеток. Облучение проводили с помощью УФ-лампы Vilber Lourmat (Франция) мощностью 6 Вт модели VL-6. LC. На клетки A375 воздействовали УФ-излучением диапазона С с длиной волны 254 нм и интенсивностью 50 Дж/м². Для отбора УФ-резистентных клеток клетки A375 подвергали воздействию УФ 1 раз в неделю в течение 12 нед с последующим поддержанием роста клеток в течение не менее 40 дней после последнего раунда облучения.

Колониеобразующий тест. Клетки A375 рассеивали на культуральные чашки диаметром 60 мм (Corning, США) в среде DMEM, содержащей 10 % FBS. На следующий день культуральную среду удаляли, клетки облучали УФ (длина волны 254 нм) и рассеивали на 6-луночный культуральный планшет (Corning, США) в стандартной культуральной среде с образованием 50–2000 колоний на лунку. Колонии фиксировали и окрашивали 20 % метанолом и 0,2 % кристаллическим фиолетовым после 10-дневного периода инкубации в инкубаторе с 5 % CO₂, 37 °С. Любую колонию, состоящую из более чем 50 клеток, оценивали как выживший клон.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Microsoft Excel. Во всех случаях статистические критерии считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние однократного ультрафиолетового облучения на клетки меланомы A375. Основной целью работы явилось исследование возможных изменений чувствительности клеток меланомы к противоопухолевым препаратам под действием УФ-облучения. Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках меланомы A375, несущих мутацию BRAF^{F600E} и чувствительных к ингибитору BRAF вемурафенибу.

Клетки A375 облучали под лампой 6W Vilber Lourmat (Франция) VL-6. LC, интенсивность 25–50 Дж/м², как было описано выше. Однократное УФ-облучение

клеток меланомы A375 в диапазоне 254 нм приводит к выраженной гибели клеток (рис. 1, а), сопровождающейся повышением уровня апоптотических маркеров: накоплением фосфорилированной формы p53, расщеплением PARP и повышением экспрессии маркера ЭМП Snail (рис. 1, б).

Разработка модели хронического ультрафиолетового облучения культивируемых *in vitro* клеток меланомы A375. Для моделирования хронического облучения проведены 12 раундов облучения клеток в диапазоне УФ 254 нм с интенсивностью 50 Дж/м² с частотой 1 раз в неделю, последующие эксперименты с выжившими клетками (сублиния A375/UVR) выполняли в стандартной среде в течение 2 мес после последнего раунда облучения. Сравнительный анализ чувствительности

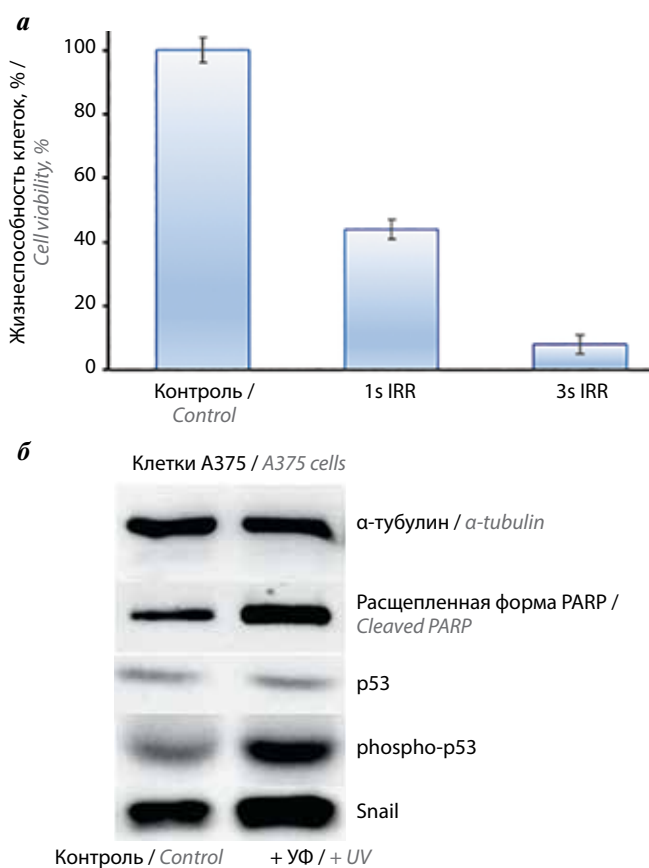


Рис. 1. Влияние ультрафиолетового (УФ) облучения на клетки меланомы линии A375: а – клетки A375 облучали УФ 1 и 3 с, 1s IRR и 3s IRR, как описано в тексте, через 48 ч с помощью МТТ-теста определяли количество выживших клеток. Представлены средние значения ± стандартное отклонение двух независимых экспериментов; б – иммуноблоттинг образцов клеток A375 через 24 ч после УФ-облучения проводили, как описано в тексте. Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов. Антитела к α-тубулину использовали для контроля загрузки образцов в гель
Fig. 1. Influence of ultraviolet (UV) irradiation on A375 melanoma cells: а – A375 cells were irradiated with UV 1–3 s, 1s IRR and 3s IRR, respectively, as described in the text of the article, and after 48 h the amount of viable cells was assessed by the MTT-test. Data represent the mean value ± standard deviation of two independent experiments; б – A375 cells exposed to UV irradiation, and after 24 h were subjected to immunoblotting. Protein loading was controlled by membrane hybridization with α-tubulin Abs. The blot represents the results of one of the three similar experiments

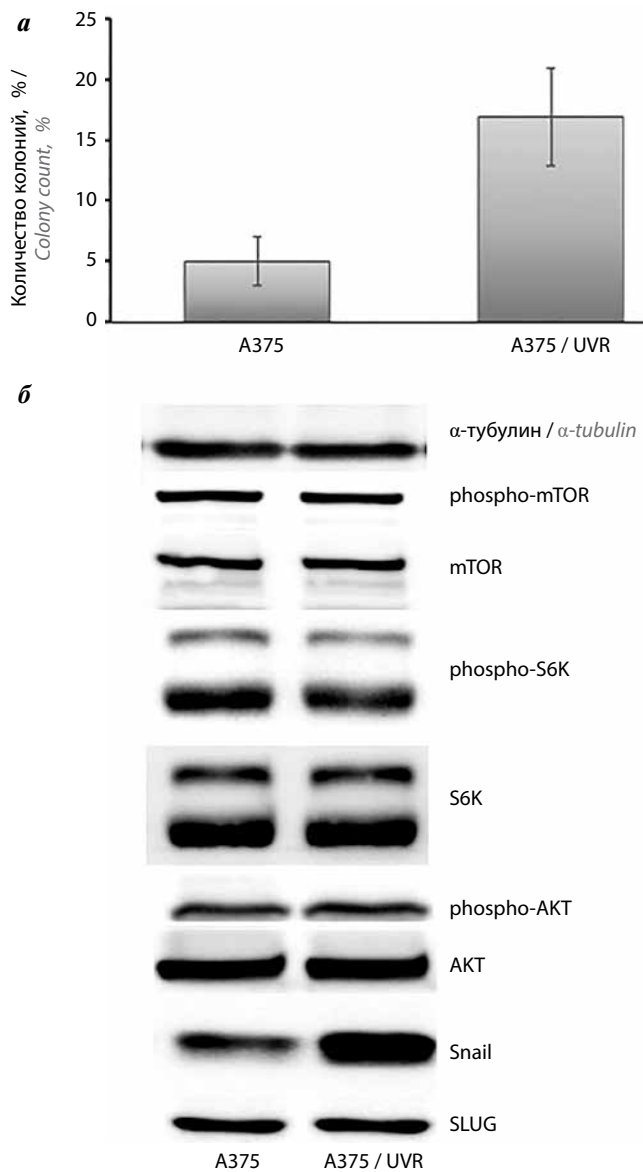


Рис. 2. Сравнительный анализ клеток A375 и резистентной к ультрафиолетовому (УФ) излучению сублинии A375/UVR: а – колониообразующий тест. Клетки облучали УФ и засеивали на 6-луночный планшет с образованием 50–2000 колоний на лунку. Окраску колоний проводили через 10–14 сут, как описано в тексте; б – иммуноблоттинг образцов клеток A375 и A375/UVR. Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов
Fig. 2. Comparative analysis of A375 and resistant to ultraviolet (UV) irradiation A375/UVR cells: а – colony-forming test. The cells were exposed to UV and seeded on 6-well plates for growing 50–2000 colonies per well. The colonies were stained after 10–14 days as described in the text of the article; б – immunoblotting of A375 and A375 cells. The blot represents the results of one of the three similar experiments

клеток к УФ-облучению с использованием теста на колониообразование показал существенное увеличение эффективности этого процесса в клетках A375/UVR по сравнению с родительскими клетками, что свидетельствует о развитии частичной резистентности к облучению в клетках A375/UVR (рис. 2, а). Исследование основных белков ростового сигналинга в клетках A375 и A375/UVR не выявило существенных различий

в экспрессии белков, за исключением Snail, ключевого активатора ЭМП, экспрессия которого оказалась существенно выше в резистентных клетках (рис. 2, б).

Чувствительность клеток меланомы A375 к вемурафенибу; комбинированный эффект вемурафениба и метформина. Сравнительный анализ чувствительности родительских и УФ-резистентных клеток меланомы A375 к ингибитору BRAF вемурафенибу показал снижение чувствительности УФ-резистентных клеток A375/UVR к антипролиферативному действию вемурафениба (рис. 3, а). Как отмечалось выше, резистентные клетки A375/UVR сохраняют практически неизменным уровень экспрессии белков Akt- и mTOR-сигналинга (см. рис. 2, б), что свидетельствует о потенциальной возможности усиления цитостатического эффекта при комбинированном воздействии на клетки вемурафениба и ингибиторов mTOR. В дальнейших экспериментах в качестве последнего использовался метформин – антидиабетический препарат с минимальными побочными эффектами, обладающий ши-

роким спектром действия, в том числе являющийся непрямым ингибитором mTOR-сигналинга. Мы показали, что комбинация вемурафениба с сублетальными дозами метформина усиливает цитостатический эффект на родительские и УФ-резистентные клетки меланомы (рис. 3, б). Анализ влияния этого препарата на основные белки клеточного сигналинга выявил выраженное снижение экспрессии Snail в присутствии метформина, в том числе в УФ-резистентных клетках (рис. 4), что позволяет рассматривать его в качестве одного из соединений, не только обладающих антипролиферативной активностью, но и препятствующих активации ЭМП.

Эстрогеновый сигналинг в клетках меланомы A375; чувствительность клеток меланомы к антипролиферативному действию антиэстрогена тамоксифена. Использование тамоксифена в качестве дополнительной линии терапии меланом активно обсуждается в литературе, однако результаты как экспериментальных, так и клинических исследований носят довольно противоречивый характер [7, 8].

Проведенный в наших экспериментах анализ содержания ER в клетках меланомы A375 методом

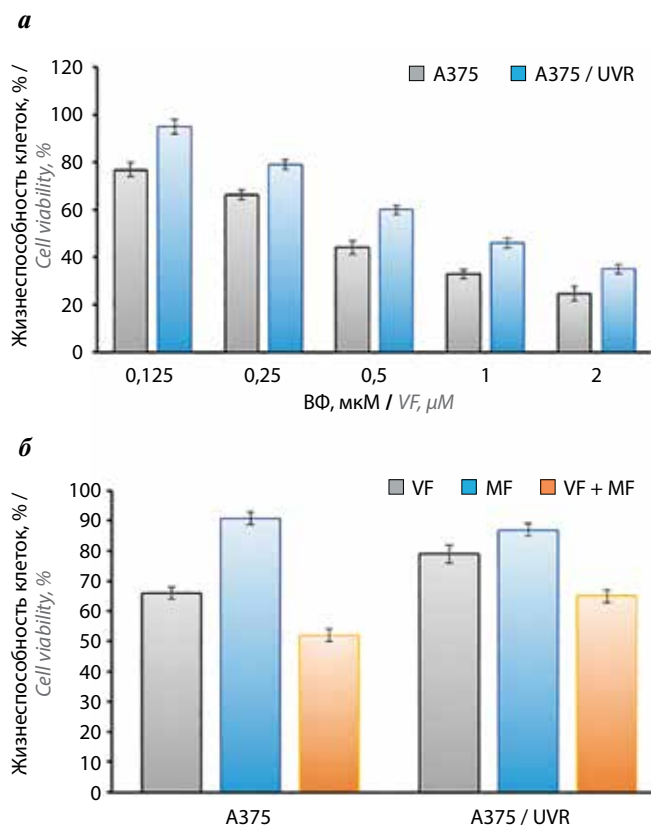


Рис. 3. Влияние вемурафениба (VF) в концентрации 0,125–2 мкМ (а) и вемурафениба в концентрации 0,25 мкМ в комбинации с 2 мМ метформина (MF) (б) на рост клеток A375 и A375/UVR. Клетки культивировали с указанными препаратами в течение 72 ч, количество выживших клеток определяли с помощью MTT-теста. Представлены средние значения ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов

Fig. 3. Influence of 0,125–2 µM vemurafenib (VF) (a) and 0,25 µM vemurafenib in combination with 2 mM metformin (MF) (b) on the growth of A375 and A375/UVR cells. The cells were cultured with indicated drugs within 72 h, and the amount of viable cells was assessed by the MTT-test. Data represent the mean value ± standard deviation of three independent experiments

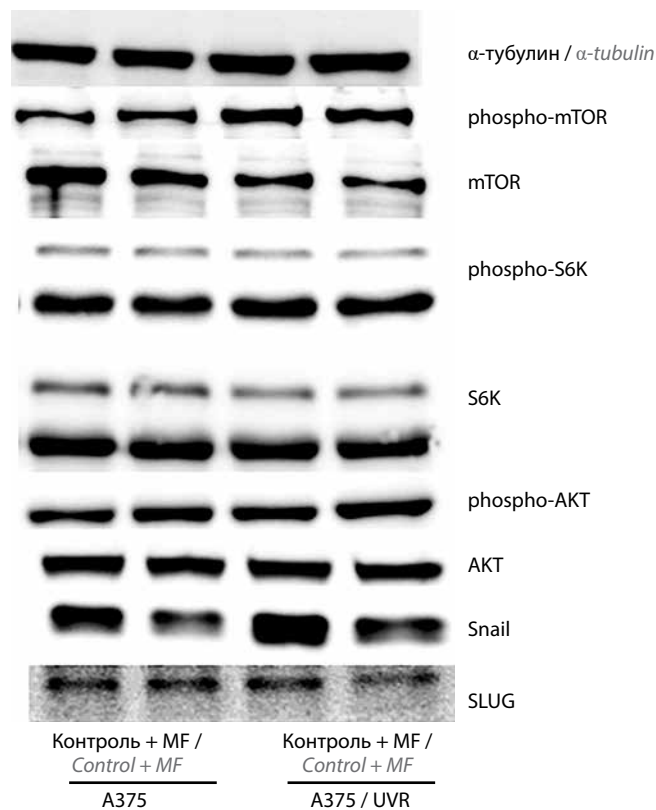


Рис. 4. Влияние метформина (MF) на экспрессию белков в клетках A375 и A375/UVR. Клетки культивировали в присутствии 2 мМ метформина 24 ч и проводили иммуноблоттинг образцов, как описано в тексте. Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов

Fig. 4. Metformin (MF) influence on the protein expression in A375 and A375/UVR cells. The cells were treated with 2 mM metformin for 24 h, and the cells were subjected to immunoblotting as described in the text of the article. The blot represents the results of one of the three similar experiments

проточной цитометрии показал присутствие в клетках α- и β-форм этого рецептора, при этом содержание ERβ практически в 3 раза превышает содержание ERα (см. таблицу). Определение транскрипционной активности ERα с использованием репортерной плазмиды, содержащей ген люциферазы под контролем эстроген-респонсивного элемента, не выявило изменений его активности под действием эстрогенов или антиэстрогенов, что свидетельствует о низкой транскрипционной активности ERα в клетках меланомы A375 (рис. 5).

Сравнительный анализ экспрессии и активности ERα в родительских и УФ-резистентных клетках меланомы не показал существенных различий в уровне ERα; однократное УФ-облучение клеток приводило к снижению содержания ERα, при этом транскрипционная активность менялась незначительно (рис. 6). Несмотря на низкую активность ERα, был выявлен выраженный цитостатический эффект антиэстрогена тамоксифена на клетки меланомы A375; при этом, как и в случае с вемурафенибом, мы обнаружили снижение чувствительности к тамоксифену в УФ-резистентных клетках A375/UVR (рис. 7, а). Комбинация тамоксифена с метформинном усиливает цитостатический эффект, в большей степени – в родительских клетках A375 (рис. 7, б).

В целом полученные результаты свидетельствуют о формировании УФ-резистентной популяции клеток меланомы в условиях длительного УФ-облучения, для которой характерна пониженная чувствительность к таргетным и гормональным препаратам на фоне повышенной экспрессии активатора ЭМП Snail. Метформин в комбинации с вемурафенибом или тамоксифеном усиливает цитостатический эффект и снижает экспрессию Snail, что свидетельствует о потенциальной перспективности использования метформина при проведении противоопухолевой терапии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мутации в гене *BRAF* встречаются в 40–85 % случаев меланомы, повышенная частота мутации отмечается в метастазах и рецидивирующих меланомах [9, 10]. Чаще всего мутация локализуется в 600-м кодоне

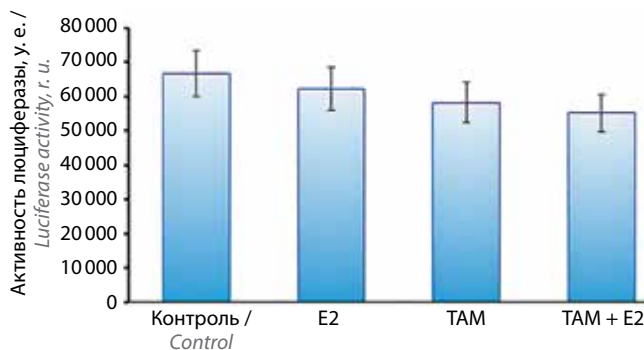


Рис. 5. Эстрогеновый сигналинг в клетках A375. Репортерный анализ транскрипционной активности ERα. Клетки A375 трансфицировали плазмидой, содержащей ген-репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом, и плазмидой, содержащей ген β-галактозидазы, и культивировали в присутствии 10⁻⁸ М 17β-эстрадиола (E2) и 5 × 10⁻⁶ М тамоксифена (TAM). Через 24 ч определяли активность люциферазы и β-галактозидазы, как описано в тексте. Расчет активности люциферазы проводили в у. е. (отношение общей активности люциферазы к активности β-галактозидазы в исследованных образцах). Представлены средние значения ± стандартные отклонения трех независимых экспериментов.

Fig. 5. Estrogen signaling in A375 cells. Reporter analysis of ERα transcriptional activity. A375 cells were transfected with the plasmid containing the luciferase reporter gene under the estrogen-responsive elements, and β-galactosidase plasmid, and cells were cultured in the presence of 10⁻⁸ M 17-β estradiol (E2) and 5 × 10⁻⁶ M tamoxifen (TAM). After 24 h the luciferase and β-galactosidase activities were determined as described in the text of the article. The relative luciferase activity was calculated in arbitrary units as the ratio of the luciferase to the galactosidase activity. Data represent mean value ± standard deviation of three independent experiments

гена *BRAF*, в результате которой происходит замена валина на глутаминовую кислоту (V600E) [11]. Идентификация мутаций, приводящих к усиленной активации BRAF, способствовала разработке селективных ингибиторов, включая вемурафениб (PLX4032) и дабрафениб (GSK2118436), которые ингибируют передачу ростового сигнала в MAP-киназном каскаде.

Вемурафениб (N-(3-([5-(4-Хлорфенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-3-ил] карбонил)-2,4-дифторфенил)пропан-1-сульфонамид) является сильным ингибитором мутантной киназы BRAF [12] и проявляет высокую противоопухолевую активность в клетках меланомы с мутацией *BRAF*^{V600E} [9, 13]. Ответ клеток меланомы на этот препарат может варьировать в зависимости от уровня экспрессии гена *BRAF* или количества

Содержание рецепторов эстрогенов ERα и ERβ, определенное с помощью иммунофлуоресцентного метода

Level of estrogen receptors ERα and ERβ determined by immunofluorescence assay

Показатель Parameter	Уровень экспрессии (доля специфически флуоресцирующих клеток относительно контроля), % Expression level (is the proportion of specifically fluorescent cells relative to the control), %	Интенсивность экспрессии (отношение среднего геометрического интенсивности флуоресценции в опытном образце к контролю), у. е. Expression intensity (is the ratio of the geometric mean fluorescence intensity in the test sample to the control), r. u.	Индекс экспрессии (интегральный показатель, равный произведению интенсивности и уровня экспрессии, деленному на 100), у. е. Expression index (an integral indicator equal to the product of intensity and expression level divided by 100), r. u.
ERα	59	2,2	1,3
ERβ	86	6,3	5,4

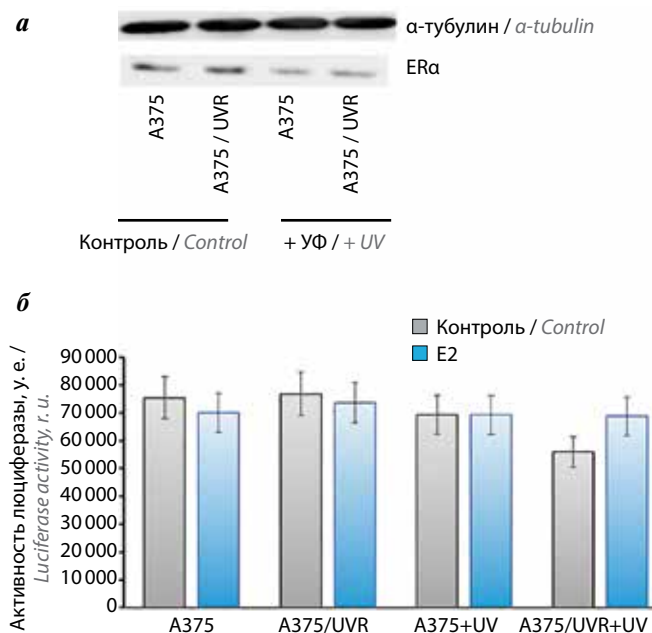


Рис. 6. Влияние ультрафиолетового (УФ) облучения на экспрессию и транскрипционную активность эстрогенового рецептора ERα в клетках A375 и A375/UVR. Клетки облучали УФ, через 24 ч содержание ERα в образцах клеток определяли методом иммуноблоттинга (а); активность ERα анализировали методом репортерного анализа (б). Представлены средние значения ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов. E2 – 17β-эстрадиол

Fig. 6. The influence of ultraviolet irradiation (UV) on the expression of estrogen receptor α (ERα) and its transcriptional activity in A375 and A375/UVR cells. The cells were exposed to UV, and after 24 h the ERα expression was determined by immunoblotting (a); ERα activity was measured by reporter gene analysis (b). Data represent mean value ± standard deviation of three independent experiments. E2 – 17β estradiol

матричной РНК (мРНК) BRAF. Несмотря на высокие показатели ответа на терапию в начале применения вемурафениба, у пациентов с метастатической меланомой во многих случаях наблюдается довольно стремительное прогрессирование заболевания на фоне продолжения терапии, что указывает на развитие приобретенной резистентности к нему в клетках меланомы. Как правило, приобретенная резистентность к данному препарату связана с реактивацией незаблокированных сигнальных путей, в частности путей рецепторной тирозинкиназы PDGFR [14], киназы CRAF (RAF1) и ряда других [15, 16]. Продемонстрирована важная роль эпигенетических факторов в формировании резистентности к вемурафенибу, в том числе метилирования ДНК [17], изменения спектра отдельных микроРНК, регулирующих ростовой сигналинг в клетках меланом [18].

Особый интерес представляет вопрос о возможных изменениях чувствительности меланомы к вемурафенибу под действием различных повреждающих и генотоксических факторов, в том числе под действием УФ-облучения. Роль УФ-облучения в злокачественной трансформации меланоцитов и прогрессировании меланомы достаточно хорошо изучена, продемонстрирована ведущая роль мутаций ДНК, индуцированных

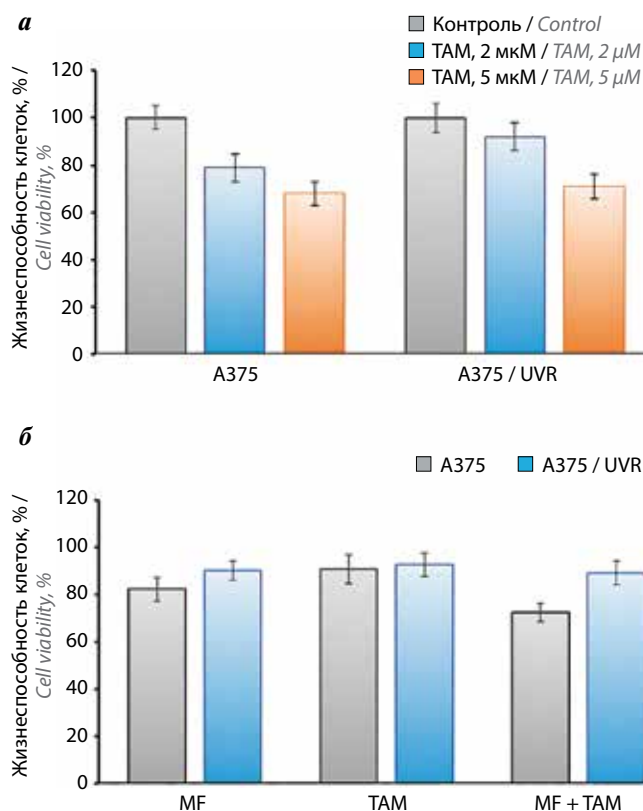


Рис. 7. Влияние тамоксифена (TAM) в концентрации 2–5 мкМ (а) и тамоксифена в концентрации 5 мкМ в комбинации с 2 мМ метформина (MF) (б) на рост клеток A375 и A375/UVR. Клетки культивировали с указанными препаратами в течение 72 ч, количество выживших клеток определяли с помощью МТТ-теста. Представлены средние значения ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов

облучением, в трансформации клеток, в том числе мутаций *P53*, *PTEN*, *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}*, *BRAF* и ряда других [1]. Действие УФ-облучения на трансформированные клетки меланомы сопровождается активизацией апоптотического каскада и частичной гибелью клеток [3]. Лишь в единичных работах исследовались особенности метаболизма клеток меланомы, обладающих повышенной устойчивостью к УФ-облучению. Так, в клетках, резистентных к нему, выявлены существенная реаранжировка сигнальных путей и активизация ростового/антиапоптотического сигналинга [4], продемонстрировано развитие УФ-резистентности при инактивации p53 сигнального пути [3].

В какой степени изменения клеточного сигналинга, ассоциированные с развитием УФ-резистентности, могут влиять на чувствительность клеток меланомы к противоопухолевым препаратам? В настоящей работе мы исследовали чувствительность клеток меланомы A375 и УФ-резистентной сублинии A375/UVR, полученной в результате хронического облучения клеток УФ, к ингибитору BRAF вемурафенибу [13] и ингибитору

эстрогенового сигналинга тамоксифену, возможное использование которого в терапии меланом активно обсуждается в литературе [7, 8]. Было показано, что развитие резистентности клеток меланомы к УФ-облучению сопровождается снижением чувствительности клеток к обоим препаратам; дополнительное воздействие на клетки метформина, относящегося к группе активаторов АМПК и непрямых ингибиторов mTOR, приводит к усилению их цитостатического эффекта. Сравнительный анализ белков клеточного сигналинга выявил конститутивную активацию Snail – основного активатора ЭМП, в УФ-резистентных клетках; при этом метформин приводил к существенному подавлению

экспрессии Snail в родительских и УФ-резистентных клетках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом полученные результаты свидетельствуют о формировании в условиях длительного УФ-облучения клона УФ-резистентных клеток, характеризующихся пониженной чувствительностью к вемурафенибу и тамоксифену, а также активацией белков, ассоциированных с ЭМП. Метформин усиливает цитостатический эффект в комбинации с обоими препаратами, что позволяет рассматривать его в качестве потенциального противоопухолевого препарата в терапии меланом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hodis E., Watson I.R., Kryukov G.V. et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012;150(2):251–63. DOI: 10.1016/j.cell.2012.06.024
- Ouhtit A., Gupta I., Gaur R.L. et al. Deregulation of cell growth and apoptosis in UV-induced melanomagenesis. *Front Biosci (Elite ed.)* 2020;12(2):223–36. DOI: 10.2741/e868
- Awais R., Spiller D.G., White M.R. et al. p63 is required beside p53 for PERP-mediated apoptosis in uveal melanoma. *Br J Cancer* 2016;115(8):983–92. DOI: 10.1038/bjc.2016.269
- Fukumoto T., Iwasaki T., Okada T. et al. High expression of Mcl-1L via the MEK-ERK-phospho-STAT3 (Ser727) pathway protects melanocytes and melanoma from UVB-induced apoptosis. *Genes Cells* 2016;21(2):185–99. DOI: 10.1111/gtc.12330
- Reid G., Hübner M.R., Métivier R. et al. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 2003;11(3):695–707. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00090-x
- Shchegolev Y., Sorokin D., Scherbakov A. et al. Upregulation of Akt/Raptor signaling is associated with rapamycin resistance of breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2020;330:109243. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109243
- Kanter-Lewensohn L., Girmila L., Girmila A. et al. Tamoxifen-induced cell death in malignant melanoma cells: possible involvement of the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathway. *Mol Cell Endocrinol* 2000;165(1–2):131–7. DOI: 10.1016/s0303-7207(00)00253-7
- Lens M.B., Reiman T., Husain A.F. Use of tamoxifen in the treatment of malignant melanoma. *Cancer* 2003;98(7):1355–61. DOI: 10.1002/cncr.11644
- Forschner A., Niessner H., Bauer J. et al. Successful treatment with vemurafenib in BRAF V600K-positive cerebral melanoma metastasis. *JAMA Dermatol* 2013;149(5):642–4. DOI: 10.1001/jamadermatol.2013.372
- Spathis A., Katoulis A.C., Damaskou V. et al. BRAF mutation status in primary, recurrent, and metastatic malignant melanoma and its relation to histopathological parameters. *Dermatol Pract Concept* 2019;9(1):54–62. DOI: 10.5826/dpc.0901a13
- Flaherty K.T., McArthur G. BRAF, a target in melanoma: implications for solid tumor drug development. *Cancer* 2010;116(21):4902–13. DOI: 10.1002/cncr.25261
- Wellbrock C., Arozarena I. The complexity of the ERK/MAP-KINASE pathway and the treatment of melanoma skin cancer. *Front Cell Dev Biol* 2016;4:33. DOI: 10.3389/fcell.2016.00033
- Chapman P.B., Hauschild A., Robert C. et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Eng J Med* 2011;364(26):2507–16. DOI: 10.1056/NEJMoa1103782
- Sullivan R.J., Flaherty K.T. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *Eur J Cancer* 2013;49(6):1297–304. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.11.019
- Chan X.Y., Singh A., Osman N. et al. Role played by signalling pathways in overcoming BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Int J Mol Sci* 2017;18(7):1527. DOI: 10.3390/ijms18071527
- Nelson B.E., Roszik J., Janku F. et al. BRAF v600E-mutant cancers treated with vemurafenib alone or in combination with everolimus, sorafenib, or crizotinib or with paclitaxel and carboplatin (VEM-PLUS) study. *NPJ Precis Oncol* 2023;7(1):9. DOI: 10.1038/s41698-022-00341-0
- Zakharia Y., Monga V., Swami U. et al. Targeting epigenetics for treatment of BRAF mutated metastatic melanoma with decitabine in combination with vemurafenib: a phase Ib study. *Oncotarget* 2017;8(51):89182–93. DOI: 10.18632/oncotarget.21269
- Vergani E., Di Guardo L., Dugo M. et al. Overcoming melanoma resistance to vemurafenib by targeting CCL2-induced miR-34a, miR-100 and miR-125b. *Oncotarget* 2016;7(4):4428–41. DOI: 10.18632/oncotarget.6599

Благодарность. Авторы выражают особую благодарность за предоставление плазмид для экспериментов.

Acknowledgment. Authors express special thanks to George Reid и Frank Gannon and for the providing plasmids for experiments.

Вклад авторов

Ю.Ю. Щеголев: проведение исследований на клеточных культурах, МТТ-анализа и колониеобразующего теста;

М.А. Карпухина: проведение исследований на клеточных культурах и МТТ-анализа;

Д.В. Сорокин: иммуноблоттинг;

А.М. Щербаков: статистическая обработка данных, анализ полученных данных, подготовка иллюстративного материала;

О.Е. Андреева: репортерный анализ;

В.Е. Разуваева: отбор клеток с устойчивостью к облучению, проведение колониеобразующего теста;

Т.А. Богуш: анализ экспрессии ER α и ER β иммунофлуоресцентным методом, редактирование;

И.Н. Михайлова, Л.В. Демидов: обзор литературы по теме статьи, редактирование;

М.В. Гудкова: руководство проектом, написание текста статьи;

М.А. Красильников: идея и организация исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions

Yu.Yu. Shchegolev: conducting research on cell cultures, MTT assay and colony-forming test;

M.A. Karpukhina: conducting research on cell cultures and MTT assay;

D.V. Sorokin: immunoblotting;

A.M. Shcherbakov: statistical data processing, analysis of the obtained data, preparation of illustrative material;

O.E. Andreeva: reporter gene assays;

V.E. Razuvaeva: selection of UV-resistant cells, colony-forming test;

T.A. Bogush: analysis of ER α and ER β expression using immunofluorescence method, editing;

I.N. Mikhailova, L.V. Demidov: literature review on the topic of the article, editing;

M.V. Gudkova: project management, article writing;

M.A. Krasil'nikov: idea and organization of the research, article writing.

ORCID авторов/ ORCID of authors

Ю.Ю. Щеголев / Yu.Yu. Shchegolev: <https://orcid.org/0000-0002-1490-6781>

М.А. Карпухина / M.A. Karpukhina: <https://orcid.org/0000-0002-3202-2293>

О.Е. Андреева / O.E. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0002-6015-6619>

Д.В. Сорокин / D.V. Sorokin: <https://orcid.org/0000-0002-1264-7405>

А.М. Щербаков / A.M. Scherbakov: <https://orcid.org/0000-0002-2974-9555>

Т.А. Богуш / T.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>

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

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

Л.В. Демидов / L.V. Demidov: <https://orcid.org/0000-0002-8562-6082>

М.А. Красильников / M.A. Krasil'nikov: <https://orcid.org/0000-0002-5902-7633>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-00368).

Funding. This research was funded by the Russian Scientific Foundation (grant No. 22-25-00368).

Статья поступила: 01.06.2023. **Принята к публикации:** 04.07.2023.

Article submitted: 01.06.2023. **Accepted for publication:** 04.07.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-59-71



Механизмы цитотоксической активности пиррол-карбоксамидов в отношении опухолевых клеточных сублиний с множественной лекарственной устойчивостью

А.Р. Галембикова¹, П.Д. Дунаев¹, Ф.Ф. Бикиниева¹, И.Г. Мустафин¹, П.Б. Копнин², С.С. Зыкова³,
Ф.И. Мухутдинова¹, Е.А. Сарбазян⁴, С.В. Бойчук^{1,5-7}

¹ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 49;

²Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

³ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России; Россия, 614081 Пермь, ул. Полевая, 2;

⁴ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»; Россия, 420015 Казань, ул. К. Маркса, 68;

⁵Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18;

⁶ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1;

⁷Центральная научно-исследовательская лаборатория ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 49

Контакты: Сергей Васильевич Бойчук boichuksergei@mail.ru

Введение. Вещества, именуемые митотическими ядами и влияющие на динамическое состояние микротрубочек веретена деления, являются хорошо известными и эффективными химиотерапевтическими препаратами. Эти вещества связываются с микротрубочками, влияя тем самым на процессы полимеризации или деполимеризации тубулина, что в конечном счете приводит к остановке клеточного цикла в М-фазе (митотическая катастрофа) и последующей гибели клеток по механизму апоптоза. В предыдущих исследованиях мы показали высокую цитотоксическую и противоопухолевую активность пиррол-карбоксамидов (ПК) (ПК-61 и ПК-84) в отношении широкого спектра опухолевых клеточных линий эпителиального происхождения, включая трижды негативный рак молочной железы, рак легких и предстательной железы.

Цель исследования – изучить цитотоксическую активность ПК-61 и ПК-84 в отношении опухолевых клеточных линий с множественной лекарственной устойчивостью.

Материалы и методы. Исследования проводили на клеточных линиях трижды негативного рака молочной железы, резистентного к паклитакселу (HCC1806 Tx-R), и остеосаркомы, резистентной к доксорубину (SaOS-2 Dox-R). Согласно ранее проведенным исследованиям обе опухолевые клеточные сублинии имели фенотип множественной лекарственной устойчивости.

Результаты. Противоопухолевая активность ПК обусловлена их способностью ингибировать процессы полимеризации тубулина. Данные иммунофлуоресцентной микроскопии показали способность ПК нарушать процессы сборки тубулина в опухолевых клетках. В результате ингибирования полимеризации тубулина в этих клетках происходит остановка клеточного цикла в М-фазе, что приводит к накоплению митотических клеток и индуцирует апоптоз.

Заключение. Результаты исследований показывают высокую цитотоксическую активность соединений ПК-61 и ПК-84 в отношении опухолевых клеточных линий с множественной лекарственной устойчивостью, что открывает перспективы для создания новых эффективных противоопухолевых средств на основе ПК.

Ключевые слова: микротрубочки, деполимеризация тубулина, клеточный цикл, апоптоз, множественная лекарственная устойчивость, трижды негативный рак молочной железы, остеосаркома, пиррол-карбоксамиды, паклитаксел, винбластин, доксорубин

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

Mechanisms of cytotoxic activity of pyrrole-carboxamides against multidrug-resistant tumor cell sublines

A.R. Galembikova¹, P.D. Dunaev¹, F.F. Bikinieva¹, I.G. Mustafin¹, P.B. Kopnin², S.S. Zyкова³, F.I. Mukhutdinova⁴, E.A. Sarbazyan⁴, S.V. Boichuk^{1,5-7}

¹Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 49 Butlerova St., Kazan 420012, Russia;

²Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia;

³Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Health of Russia; 2 Poleyaya St., Perm 614990, Russia;

⁴Kazan National Research Technological University, 68 Karl Marx St., Kazan 420015, Russia;

⁵Research Laboratory "Biomarker", Institute of Fundamental Medicine and Biology of the Kazan Federal University, 18 Kremlevskaya St., Kazan 420008, Russia;

⁶Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 Barricadnaya St., Moscow 125993, Russia;

⁷Central Research Laboratory of the Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 49 Butlerova St., Kazan 420012, Russia

Contacts: Sergei Vasilyevich Boichuk boichuksergei@mail.ru

Introduction. Mitotic poisoning agents (MPAs) affecting the dynamic state of the microtubules, are the well-known and effective chemotherapeutic agents. Mitotic poisoning agents are binding to the microtubules, and thereby interfere with tubulin polymerization or depolymerization dynamic state, resulting in the cell cycle arrest in M-phase (mitotic catastrophe) and subsequent apoptotic cell death. We reported previously about potent cytotoxic activities against the pyrrole-carboxamides (PCs) (PC-61 and PC-84) against broad spectrum of cancer cell lines, including triple negative breast cancer, lung and prostate cancer.

Aim. To examine the cytotoxic activities of PC-61 and PC-84 against multidrug-resistant cancer cell lines indicated above. **Materials and methods.** Study was performed on the triple-negative paclitaxel-resistant breast cancer cell line HCC1806 Tx-R and doxorubicin-resistant osteosarcoma SaOS-2 Dox-R cell line.

Results. The cytotoxic activity of PCs was due to the inhibition of tubulin polymerization. Immunofluorescence staining data revealed PC's ability to interfere with tubulin's assembly in multidrug-resistant cancer cell lines. As an outcome of inhibition of tubulin polymerization, PCs induced cell cycle arrest in M-phase, and further led to apoptotic cell death of cancer cells.

Conclusion. Collectively, we demonstrated potent cytotoxic activity of PCs against cancer cell lines with multidrug-resistant phenotype, which arising the possibilities to develop novel and effective anti-tumor agents that belongs to mitotic poisoning agents.

Keywords: microtubules, tubulin depolymerization, cell cycle, apoptosis, multidrug resistance, triple negative breast cancer, osteosarcoma, pyrrole-carboxamides, paclitaxel, vinblastine, doxorubicin.

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

ВВЕДЕНИЕ

Микротрубочки являются важными регуляторами широкого спектра физиологических процессов, включая пролиферацию и миграцию клеток, транспорт везикул в процессе эндоцитоза и хромосомную сегрегацию во время митоза. Последний процесс рассматривается как привлекательная молекулярная мишень для действия противоопухолевых препаратов, что подтверждается наличием довольно большого количества как природных, так и синтетических низкомолекулярных соединений, эффективно влияющих на динамическое состояние микротрубочек и вызывающих последующую гибель опухолевых клеток по механизму апоптоза вследствие незавершенности клеточного цикла и так называемой катастрофы в митозе [1, 2]. Молекулярный механизм действия химиотерапевтических препаратов, мишенью которых являются микротрубочки, обусловлен их способностью вмешиваться в динамическое состояние микротрубочек посред-

ством ингибирования или усиления полимеризации тубулина. К веществам, которые ингибируют процессы полимеризации тубулина, относятся алкалоиды барвинка, колхицин и его аналоги, майтанзин и пиронетин [3–6], а к химиопрепаратам (ХП), способствующим полимеризации тубулина, — таксаны (паклитаксел, доцетаксел) [7, 8]. Помимо таксанов, продукты морских губок (например, лаулималид [9] и пелорозид А [10]) также усиливают полимеризацию тубулина и стабилизируют микротрубочки, приводя к аналогичным для клетки фатальным последствиям [11].

Было обнаружено, что помимо «классических» ХП, избирательно влияющих на динамическое состояние микротрубочек, способностью оказывать влияние на процессы полимеризации тубулина обладают также некоторые таргетные препараты, относящиеся к группе ингибиторов рецепторных и нерцепторных киназ. Например, тивантиниб изначально разрабатывался как ингибитор тирозинкиназы c-Met и довольно

успешно прошел клинические испытания именно в качестве таргетного препарата [12]. Однако результаты последующих исследований продемонстрировали, что терапевтический эффект данного лекарственного средства может быть обусловлен не только ингибированием соответствующего сигнального пути в опухолевых клетках [13], но и его способностью влиять на процессы полимеризации тубулина [14]. Аналогичным образом ригосертиб, ингибирующий активность полоподобной киназы типа 1 (Plk1) [15], в дальнейшем также показал способность эффективно препятствовать процессу полимеризации тубулина [16]. Для некоторых химических соединений была обнаружена обратная закономерность. Например, для нокодазола – известного митотического яда (МЯ), нарушающего процессы деполимеризации тубулина, впоследствии была обнаружена высокая активность в отношении ряда киназ, включая ABL, c-KIT, BRAF и MEK [17, 18]. Некоторые ингибиторы киназ, которые клинически одобрены или в настоящее время проходят клинические испытания II или III фазы (например, селонсертиб, маситиниб, нинтеданиб, PF0477736, мезилат SNS-314, MPI0479605 и понатиниб), проявили стабилизирующий эффект на микротрубочки без прямого взаимодействия с тубулином [19, 20].

Митотические яды (в первую очередь таксаны и алкалоиды барвинка) обычно используются в терапии пациентов с солидными злокачественными новообразованиями, а также гемобластомами преимущественно в составе комбинированной химиотерапии. Однако их длительное применение ограничено, в том числе вследствие образования резистентности опухолей. Вторичная резистентность злокачественных новообразований к данным химиотерапевтическим препаратам может быть следствием развития в опухолевых клетках различных адаптационных механизмов, среди которых выделяют повышение экспрессии в опухолевых клетках ABC-транспортеров [21, 22], изменение уровня экспрессии специфических изоформ β -тубулина [23], мутации β -тубулина, остановку клеточного цикла вследствие активации соответствующих чек-поинтов и др. [24]. Кроме того, использование МЯ сопряжено с развитием серьезных побочных эффектов, включающих периферическую нейропатию, миело- и иммуносупрессию и другие, что существенным образом ограничивает их продолжительное использование и является стимулом для разработки новых эффективных и менее токсичных химиотерапевтических препаратов с аналогичным механизмом действия.

Результаты ранее проведенных нами исследований показали высокую цитотоксическую и противоопухолевую активность этил-2-аминопиррол-3-карбоксилатов (пиррол-карбоксамидов, ПК) в отношении довольно широкого спектра опухолевых клеточных линий и ксенографтных опухолей [25–27]. Молекулярный механизм их действия обусловлен способностью влиять на динамическое состояние микротрубочек

путем ингибирования полимеризации тубулина, что приводит к остановке клеточного цикла в М-фазе и гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза. Эти данные, свидетельствующие о противоопухолевой активности пиррол-содержащих химических соединений, согласуются с результатами других исследований. Например, в зарубежной научной литературе имеются данные о цитотоксической и проапоптотической активности некоторых пиррол-содержащих соединений, осуществляемой за счет их способности оказывать влияние на процессы полимеризации тубулина [28, 29]. В 2020–2021 гг. наша научная группа синтезировала пиррол-содержащие химические соединения, основной молекулярной мишенью для которых явился колхициновый сайт связывания в молекуле тубулина, что обуславливало их способность эффективно нарушать процессы полимеризации данного белка [30]. В результате комплексного анализа их активности, основанного как на методах компьютерного моделирования, так и на биологических методах, мы выявили 2 лидерных соединения (ПК-61 и ПК-84), обладающих наибольшей аффинностью к колхицин-связывающему домену тубулина и максимальной биологической активностью в отношении данной клеточной мишени. Ожидаемыми результатами данного взаимодействия на клеточном уровне были накопление опухолевых клеток эпителиального происхождения в М-фазе клеточного цикла и их последующая гибель по механизму апоптоза. Следует отметить, что проапоптотическая активность данных соединений подтверждена *in vivo* на ксенографтных моделях злокачественных опухолей молочной железы [30].

Результаты настоящего исследования иллюстрируют высокую активность вышеуказанных лидерных соединений в отношении опухолевых клеточных сублиний с признаками множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), что имеет, на наш взгляд, большое научно-практическое значение и создает предпосылки для разработки новых противоопухолевых препаратов, эффективных в отношении широкого спектра злокачественных новообразований, в том числе с признаками вторичной резистентности к ХП, используемым в настоящее время в практической онкологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические соединения. Пиррол-карбоксамиды 61 и 84 были синтезированы в наших лабораториях в соответствии со стандартными протоколами, как показано в предыдущих исследованиях [30–32]. Структуры и спектры ядерного магнитного резонанса ПК-61 и ПК-84 приведены в опубликованной ранее статье [30]. Паклитаксел, винбластин (SigmaAldrich, США), ПК-61 и ПК-84 были растворены в 100 % диметилсульфоксиде (ДМСО) (SigmaAldrich, США). В качестве контроля клетки инкубировали в культуральной среде с соответствующей концентрацией ДМСО

(конечная концентрация 0,1 %). Пиррол-карбоксами-ды 61 и 84 использовались в концентрации, близкой к IC50 (10 мкМ), паклитаксел (1 мкМ) и винбластин (0,01 мкМ) были использованы в данных концентрациях, подобранных ранее [30].

Клеточные линии и условия их культивирования.

В настоящем исследовании использовали 2 опухолевые клеточные сублинии – клеточную линию трижды негативного рака молочной железы, резистентную к паклитакселу (HCC1806 Tx-R), и клеточную линию остеосаркомы, резистентную к доксорубину (SaOS-2 Dox-R), ранее полученные в нашей лаборатории путем последовательного культивирования материнских опухолевых линий с постепенно увеличивающимися концентрациями ХП [33]. Линии HCC1806 и SaOS-2 получены из Американской коллекции клеточных культур (American Type Culture Collection, ATCC). Все клеточные линии культивировали во влажной атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °С (LamSystems, Россия) в среде RPMI-1640 (ООО «ПанЭко», Россия) с добавлением 15 % эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США), 1 % L-глутамина, 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ООО «ПанЭко», Россия).

Анализ жизнеспособности клеточных линий. Опухолевые клетки засеивали в 96-луночные плоскодонные планшеты (Corning Inc., США). Спустя 24 ч инкубировали в присутствии ПК-61 и ПК-84 или растворителя (DMCO) в течение 48 ч. Затем к клеткам добавляли реагент MTS (Promega, США) на 1 ч. Жизнеспособность клеток оценивали на спектрофотометре MultiScan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 492 нм. Половинную ингибирующую концентрацию (IC 50) исследуемых соединений определяли с использованием электронного ресурса <http://ic50.tk/> (по состоянию на 25.04.2023). Все данные нормализованы относительно контрольных клеток. Были проведены 3 повтора для каждого экспериментального условия.

Вестерн-блоттинг. Для приготовления клеточных экстрактов клетки лизировали буфером для радиоиммунопреципитации – RIPA (25 мМ Tris-HCl (pH 7,6); 150 мМ NaCl; 5 мМ ЭДТА; 1 % NP-40; 1 % дезоксихолат натрия; 0,1 % SDS) с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз. Лизаты клеточных культур инкубировали в RIPA буфере течение 20 мин при 4 °С, а затем центрифугировали в течение 30 мин при 13000 об./мин при 4 °С. Концентрацию белка в образцах определяли с помощью BCA (Thermo Fisher Scientific, США) по методу Брэдфорда. Образцы, содержащие 30 мкг белка, вносили в кассеты с 4–12 % Bis-Tris NuPAGE гелем (Invitrogen, США). Электрофорез проводили при 4 °С в течение 3 ч с использованием постоянного напряжения (80 В) в NuPAGE MOPS SDS буфере (Invitrogen, США).

Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в соответствующем буфере (25 мМ Трис, метанол (pH 8,3)) при 350 мА в течение 1,5 ч при 4 °С.

Для блокирования неспецифических взаимодействий и разведения антител использовали 5 % обезжиренное сухое молоко. Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали с первичными антителами (АТ) в течение 16 ч при 4 °С, а затем со вторичными АТ, конъюгированными с HRP (Santa Cruz Biotechnology, США), в течение 1 ч. Экспрессию белков определяли в системе визуализации хемилюминесценции Fusion Solo S (Vilber Lourmat, Франция). Эксперименты проводили в трех повторностях.

Иммунофлуоресцентная микроскопия. Для проведения иммунофлуоресцентного окрашивания исследуемых образцов опухолевые клетки засеивали на покровные стекла, предварительно покрытые поли-L-лизин (Sigma-Aldrich, США), и культивировали в 6-луночных плоскодонных планшетах (Corning Inc., США) в течение 48 ч, а затем в исследуемую культуру клеток вносили вышеуказанные химические соединения и культивировали в течение 8 ч. После инкубации покровные стекла с клетками фиксировали 4 % раствором формальдегида в течение 15 мин при комнатной температуре. После трехкратного отмыва фосфатно-солевым буфером клетки инкубировали в блокирующем растворе (фосфатно-солевой буфер с 5 % козьей сывороткой и 0,3 % Triton X-100) в течение 60 мин при комнатной температуре. Далее к клеткам добавляли АТ к p-H3 (Ser10), конъюгированные со вторичными АТ Alexa Fluor 488 (Cell Signaling, США) и разведенные в соотношении 1: 200 в фосфатно-солевом буфере, содержащем 1 % бычий сывороточный альбумин и 0,3 % Triton X-100 (инкубация в течение 16 ч при 4 °С). После трехкратного отмыва фосфатно-солевым буфером к клеткам добавляли ядерный краситель DAPI (Sigma-Aldrich, США).

Для исследования тубулиновых микротрубочек покровные стекла с клетками фиксировали смесью метанола и ацетона (соотношение 1: 1) в течение 20 мин при –20 °С. После блокирования неспецифических сайтов связывания клеточные образцы инкубировали с первичными моноклональными АТ к α -тубулину (Sigma-Aldrich, США) в течение 16 ч при 4 °С. После отмыва фосфатно-солевым буфером клетки инкубировали со вторичными АТ, конъюгированными с тexasским красным (Invitrogen, США), в течение 60 мин при комнатной температуре. В дальнейшем проводили окрашивание ядер красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США).

Для индукции деполимеризации микротрубочек клетки предварительно подвергали холодному шоку (планшеты с клетками находились на льду в течение 1 ч) и далее культивировали в предварительно подогретой до 37 °С культуральной среде в присутствии исследуемых соединений в течение 2 ч для стимуляции полимеризации тубулина. Далее проводили описанную выше окраску на α -тубулин. Клетки визуализировали на флуоресцентном микроскопе Olympus BX63 (Olympus, Япония).

Для каждого экспериментального условия были проведены 2 повтора.

Проточная цитофлуориметрия. Анализ клеточного цикла в опухолевых клетках выполняли на проточном цитофлуориметре Guava Muse (Luminex, США) с использованием набора CellCycleKit (Luminex, США) в соответствии с протоколом производителя. Были проведены 5 повторов для каждого экспериментального условия.

Статистическую обработку данных проводили с помощью теста Краскела–Уоллиса с последующим тестом Манна–Уитни–Уилкоксона с корректировкой Бенджамини–Хохберга в программном обеспечении R (R Foundation for Statistical Computing, Австрия; доступно онлайн: <https://www.R-project.org/>, по состоянию на 25.04.2023).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На начальном этапе исследования было обнаружено, что инкубация опухолевых клеток с фенотипом МЛУ с соединениями ПК-61 и ПК-84 приводит к накоплению клеток округлой формы (рис. 1). Аналогичные результаты получены при культивировании опухолевых клеток с винбластином.

С учетом результатов проведенного нами ранее компьютерного моделирования, показавших, что колхициновый домен тубулина является наиболее вероятным сайтом связывания ПК с тубулином [30], следующим этапом исследований стало изучение способности данных соединений влиять на процессы полимеризации тубулина на клеточном уровне. С этой целью клетки сублинии HCC1806 Tx-R культивировали с вышеуказанными ПК, а также ХП винбластином

и паклитакселом в течение 8 ч, после чего проводили иммунофлуоресцентное окрашивание для выявления структурных изменений в α -тубулине. Было обнаружено, что в результате культивирования опухолевых клеток с ПК наблюдается диффузное окрашивание α -тубулина (рис. 2). Аналогичная картина наблюдалась при культивировании опухолевых клеток с винбластином, что свидетельствует о нарушении процессов полимеризации микротрубочек тубулина. В то же время инкубация опухолевых клеток с паклитакселом приводила к образованию характерных тяжей и пучков тубулина, что говорит о нарушении процессов динамического равновесия белков цитоскелета в сторону их стабилизации (см. рис. 2).

Аналогичные результаты были получены в экспериментах на клетках, предварительно подвергнутых «холодовому шоку», что позволило оценить динамику полимеризации микротрубочек после их разрушения в результате часовой инкубации клеток при 4 °С и последующего культивирования клеток в физиологических условиях (37 °С в течение 2 ч) для последующей инициации процессов полимеризации тубулина. Как и ожидалось, после «разрушения» сети тубулина в результате воздействия на клетки «холодового шока» нормализация условий их культивирования приводила к восстановлению сетчатой структуры данного белка, что являлось отражением процессов активной сборки микротрубочек (рис. 3). В то же время в клетках, культивированных после «холодового шока» в присутствии винбластина, а также ПК, аналогичных изменений не наблюдалось, что подтверждало их способность ингибировать процессы сборки микротрубочек и полимеризации тубулина (см. рис. 3).

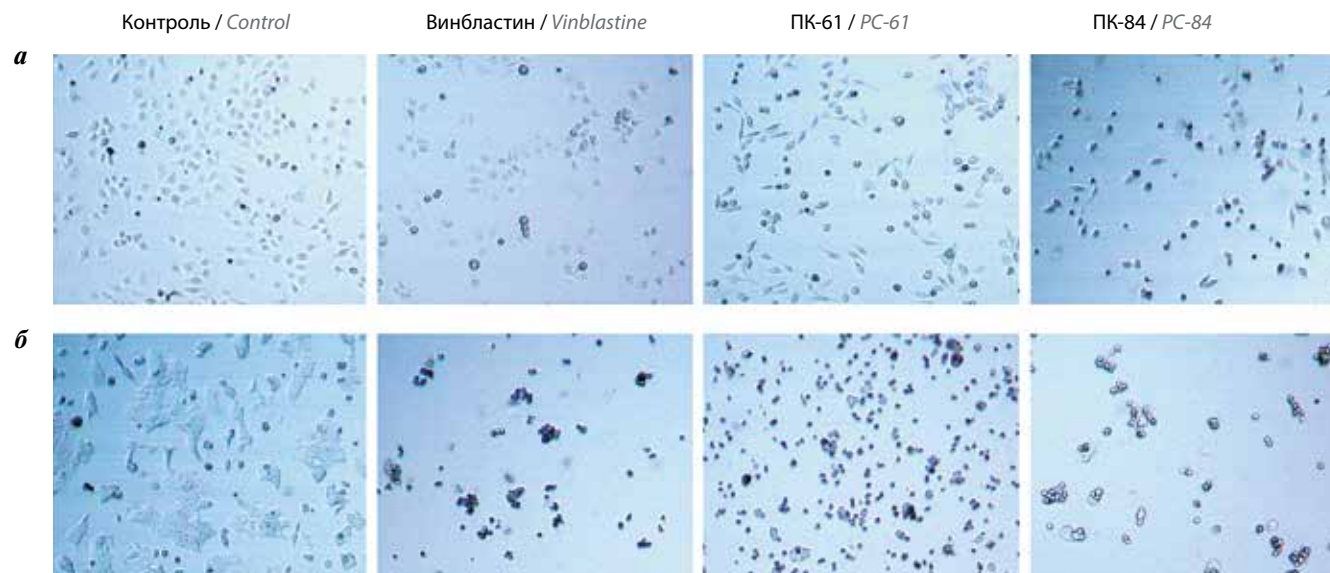


Рис. 1. Морфологические изменения в клетках сублинии HCC1806 Tx-R (а) и SaOS-2 Dox-R (б), культивированных в течение 24 ч в присутствии растворителя (диметилсульфоксида) (отрицательный контроль), винбластина (0,01 мкМ) (положительный контроль), пиррол-карбоксамидов 61 (ПК-61) и 84 (ПК-84) (10 мкМ). $\times 10$

Fig. 1. Changes in morphology of HCC1806 Tx-R (a) and SaOS-2 Dox-R (b) cancer cells treated by pyrrole-carboxamides 61 (PC-61) and 84 (PC-84) (10 μ M), vinblastine (0,01 μ M) (positive control), dimethyl sulfoxide (negative control) for 24 h. $\times 10$

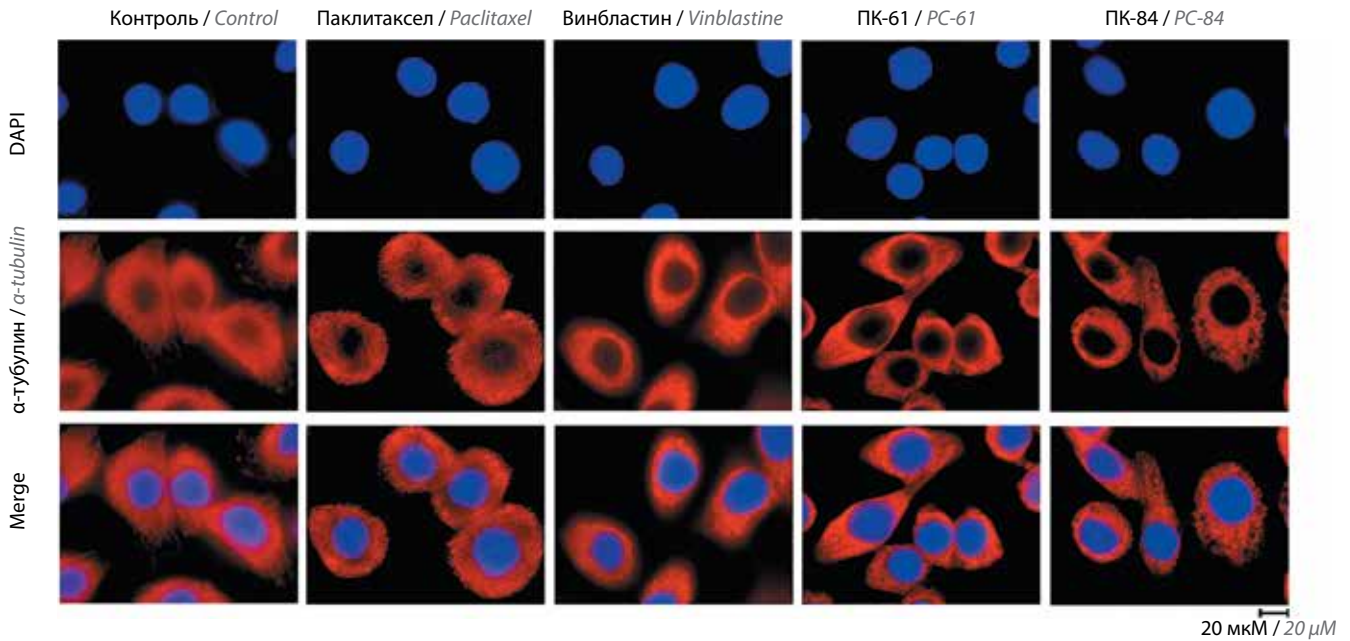


Рис. 2. Ингибирование сборки микротрубочек в опухолевых клетках линии HCC1806 Tx-R под влиянием пиррол-карбоксамидов (ПК). Клетки HCC1806 Tx-R инкубировали с диметилсульфоксидом (контроль), паклитакселом (10 мкМ), винбластином (0,01 мкМ), ПК-61 и ПК-84 (10 мкМ) в течение 8 ч, а затем фиксировали смесью метанола и ацетона и окрашивали моноклональными антителами к α -тубулину (красный цвет) и ядерным красителем DAPI (синий цвет). $\times 100$

Fig. 2. Pyrrole-carboxamides (PCs) disrupt the microtubules network in cancer cells. HCC1806 Tx-R breast cancer cells were treated with dimethyl sulfoxide (control), Paclitaxel (10 μM), Vinblastine (0,01 μM), PC-61 and PC-84 (10 μM) for 8 h, fixed with a mixture of methanol and acetone, and stained with monoclonal antibodies targeting α -tubulin (red). DAPI nuclear staining (blue) was used to outline the nuclei. $\times 100$

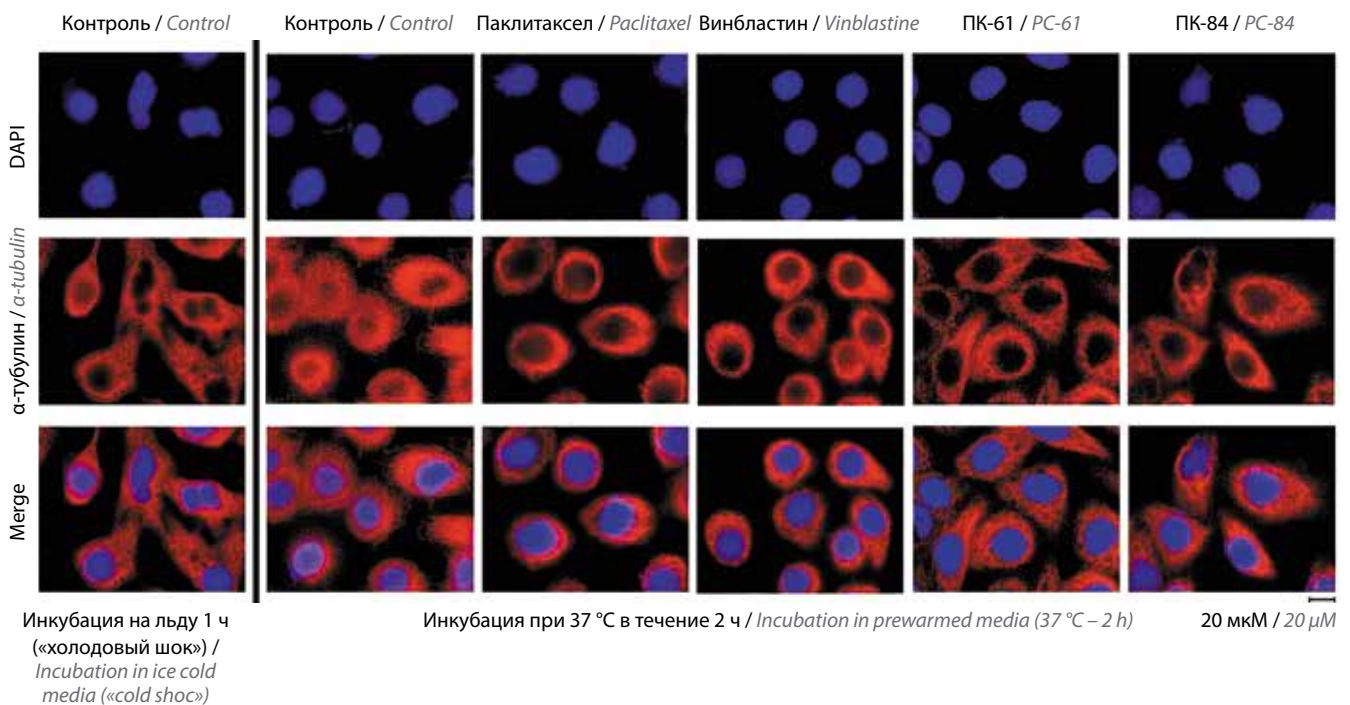


Рис. 3. Ингибирование сборки микротрубочек в опухолевых клетках линии HCC1806 Tx-R под влиянием пиррол-карбоксамидов (ПК), предварительно подвергшихся «холодовому шоку». Клетки сублинии HCC1806 Tx-R инкубировали на льду в течение 1 ч, затем при 37 °С в течение 2 ч в присутствии диметилсульфоксида (контроль), паклитаксела (10 мкМ), винбластина (0,01 мкМ), ПК-61 и ПК-84 (10 мкМ). Клетки фиксировали смесью метанола и ацетона и окрашивали моноклональными антителами к α -тубулину (красный цвет) и ядерным красителем DAPI (синий цвет). $\times 100$

Fig. 3. Pyrrole-carboxamides (PCs) inhibit the microtubules assembly in cancer cells. HCC1806 were incubated in ice-cold culture medium (“cold shock”) within 1 h in presence of dimethyl sulfoxide (control), Paclitaxel (10 μM), Vinblastine (0,01 μM), PC-61 and PC-84 (10 μM). After 1 h, the media were replaced with pre-warmed medium (37 °C) and cells were further cultured for 2 h to initiate tubulin polymerization. Cells were fixed with a mixture of methanol and acetone, and stained with monoclonal antibodies targeting α -tubulin (red). DAPI nuclear staining (blue) was used to outline the nuclei. $\times 100$

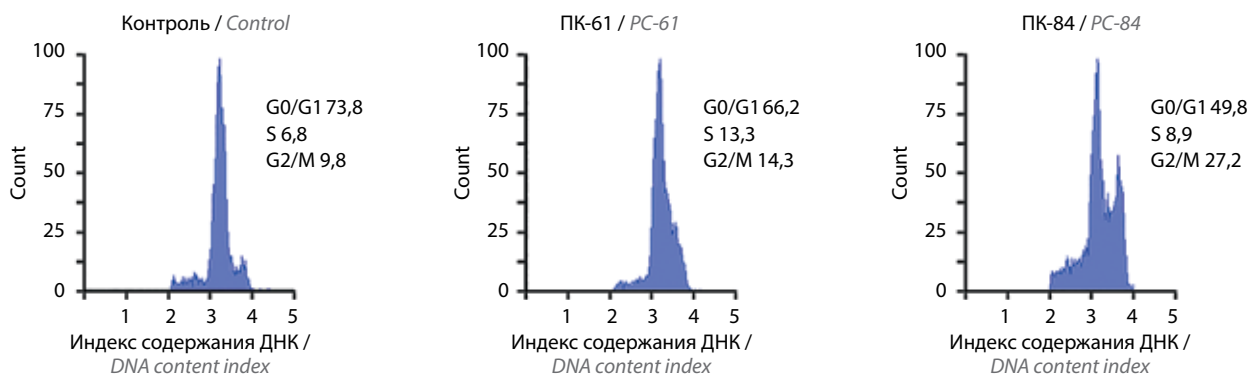


Рис. 4. Накопление опухолевых клеток линии SaOS-2 Dox-R в G2/M-фазе клеточного цикла под влиянием пиррол-карбоксамидов (ПК). Репрезентативные изображения распределения фаз клеточного цикла в клетках сублинии остеосаркомы SaOS-2 Dox-R, культивируемых в присутствии диметилсульfoxида (контроль), ПК-61 и ПК-84 (10 мкМ) в течение 12 ч. S – синтетическая фаза клеточного цикла; G0 – фаза покоя клеточного цикла; G1 – пресинтетическая фаза клеточного цикла; G2 – постсинтетическая фаза клеточного цикла; M – фаза митоза клеточного цикла

Fig. 4. Accumulation of SaOS-2 Dox-R cancer cells in the G2/M phases after treatment with pyrrole-carboxamides (PCs). Representative histograms illustrating the changes in cell cycle profile of SaOS-2 Dox-R cells treated with dimethyl sulfoxide (negative control), PC-61, and PC-84 (10 μM) for 12 h. S – the synthetic phase of the cell cycle; G0 – the resting phase of the cell cycle; G1 – the presynthetic phase of the cell cycle; G2 – the post-synthetic phase of the cell cycle; M – the mitosis phase of the cell cycle

Таблица 1. Распределение фаз клеточного цикла в клетках сублинии остеосаркомы SaOS-2 Dox-R после воздействия пиррол-карбоксамидов 61 (ПК-61) и ПК-84 (10 мкМ) (n = 5)

Table 1. Cell cycle distribution in SaOS-2 Dox-R cancer subline treated with pyrrole-carboxamide 61 (PC-61) and PC-84 (10 μM) (n = 5)

Группа Group	G0/G1	S	G2/M
Контроль Control	75,8 ± 2,7	5,80 (5,5–5,9)	9,4 ± 3,4
ПК-61	67,9 ± 2,3*	9,6 ± 2,1*	15,1 ± 2,5*
ПК-84	48,0 (48–48,5) **	11,1 ± 0,9 *	28,30 (27,6–29) *

* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

Примечание. Нормально распределенные данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; ненормально распределенные данные – как медиана (межквартильный интервал). S – синтетическая фаза клеточного цикла; G0 – фаза покоя клеточного цикла; G1 – пресинтетическая фаза клеточного цикла; G2 – постсинтетическая фаза клеточного цикла; M – фаза митоза клеточного цикла.

Note. Normally, distributed data are presented as mean ± standard deviation, non-normally distributed data – as median (interquartile range).

S – the synthetic phase of the cell cycle; G0 – the resting phase of the cell cycle; G1 – the presynthetic phase of the cell cycle; G2 – the post-synthetic phase of the cell cycle; M – the mitosis phase of the cell cycle.

Таким образом, снижение уровня конfluентности опухолевых клеточных культур и повышение количества клеток округлой формы при их инкубации с ПК (см. рис. 1) могли быть результатом нарушения процессов полимеризации белка тубулина в опухолевых клетках, что приводило к остановке клеточного цикла в одной из точек рестрикции. Для подтверждения правомочности данной гипотезы проведен анализ фаз клеточного цикла в опухолевых клетках. Результаты проточной цитофлуориметрии показывают увеличение количества клеток сублинии SaOS-2 Dox-R в фазах G2/M после их инкубации с ПК (рис. 4).

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла представлен в табл. 1. Аналогичные данные были получены в отношении клеток сублинии HCC1806 Tx-R.

С учетом накопления клеток округлой формы после воздействия на опухолевые клетки ПК (рис. 1) и накопления клеток в G2/M-фазах клеточного цикла (рис. 4) в дальнейшем было проведено изучение уровня экспрессии маркеров M-фазы в клетках, культивируемых с ПК. Результаты иммунофлуоресцентной микроскопии, представленные на рис. 5, показывают, что после воздействия ПК на опухолевые клетки сублинии HCC1806 Tx-R происходит значительное увеличение числа клеток, экспрессирующих гистон 3, фосфорилированный по остаткам серина в положении 10 (p-H3 (Ser10)), являющийся, как известно, общепринятым маркером митоза. Аналогичные данные были получены в отношении винбластина, но не паклитаксела, что являлось косвенным свидетельством наличия резистентности к паклитакселу у данной опухолевой сублинии.

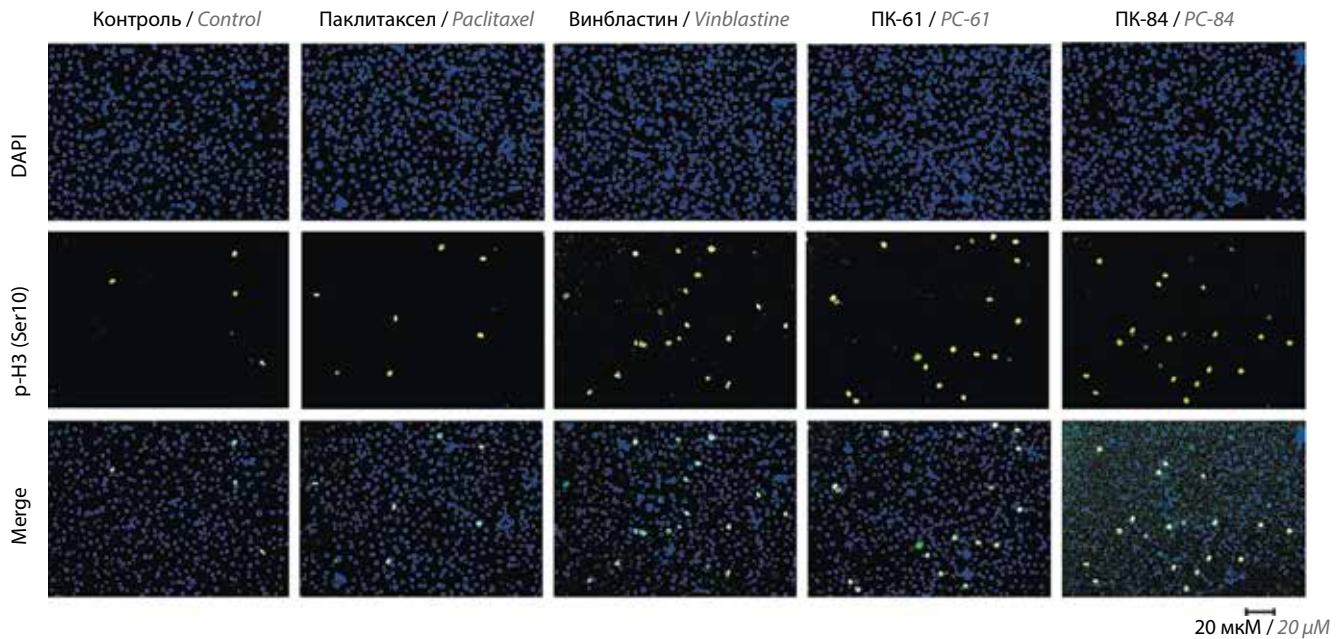


Рис. 5. Накопление опухолевых клеток линии HCC1806 Tx-R в M-фазе под влиянием пиррол-карбоксамидов (ПК). Репрезентативные изображения клеток сублинии HCC1806 Tx-R, инкубированных в присутствии диметилсульфоксида (отрицательный контроль), паклитаксела (1 мкМ), винбластина (0,01 мкМ, положительный контроль), ПК-61 (10 мкМ) и ПК-84 (10 мкМ) в течение 8 ч. Клетки фиксировали 4 % параформальдегидом и окрашивали антителами к p-H3 (Ser10), конъюгированными с флуорохромом Alexa 488 (зеленый цвет) и ядерным красителем DAPI (синий цвет). $\times 10$

Fig. 5. Pyrrole-carboxamides (PCs) induce accumulation of HCC1806 Tx-R breast cancer cells in M-phase. The representative images of cancer cells treated with dimethyl sulfoxide (negative control), paclitaxel (1 μ M), and vinblastine (0.01 μ M) (positive control), PC-61 and 84 (10 μ M) for 8 h. The cells were fixed with 4 % paraformaldehyde and immunostained by using Alexa 488-conjugated anti-p-H3 (Ser10) antibody (green color). Cell nuclei were outlined by staining with DAPI (blue color). $\times 10$

Повышение экспрессии p-H3 (Ser10) в опухолевых клетках после воздействия на них ПК и винбластина было также подтверждено методом иммуноблоттинга (рис. 6). Помимо этого, было обнаружено значительное усиление экспрессии фосфорилированной формы белка NUMA (p-NuMa (Ser395)), также являющегося маркером M-фазы клеточного цикла (см. рис. 6). Напротив, после воздействия на опухолевые клетки ПК экспрессия p-Cdk2 (Tyr15), циклина A2, B1 и Mdm2 снижалась. Следует отметить, что в опухолевых клетках, культивированных с винбластином, изменения в экспрессии большинства вышеуказанных белков были менее выраженными по сравнению с ПК, что свидетельствует о большей (по сравнению с ХП) способности синтезированных нами химических соединений вызывать нарушения регуляции клеточного цикла в опухолевых клетках с фенотипом МЛУ.

Следствием выраженных нарушений в регуляции клеточного цикла опухолевых сублиний рака молочной железы и остеосаркомы с фенотипом МЛУ явилась их последующая гибель, о чем свидетельствовали данные колориметрического MTS-теста. Значения половинных концентраций соединений, ингибирующие жизнеспособность опухолевых клеток (IC50), представлены в табл. 2.

Чтобы выяснить, явилась ли цитотоксическая активность ПК *in vitro* следствием активации апоптоза в опухолевых клетках, проведен анализ экспрессии маркеров апоптоза (расщепленные формы каспазы-3

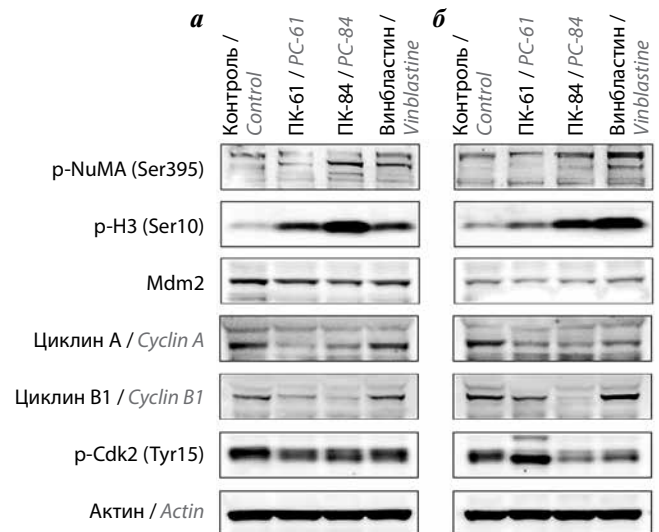


Рис. 6. Нарушения регуляции клеточного цикла в опухолевых клетках сублиний HCC1806 Tx-R и SaOS-2 Dox-R под влиянием пиррол-карбоксамидов 61 (ПК-61) и 84 (ПК-84). Уровень экспрессии p-NuMA (Ser395), p-H3 (Ser10), Mdm2, циклинов A2 и B1, p-Cdk2 (Tyr15) в клетках сублиний HCC1806 Tx-R (a) и SaOS-2 Dox-R (б) после их культивирования с диметилсульфоксидом (отрицательный контроль), ПК-61, 84 (10 мкМ) и винбластином (0,01 мкМ) в течение 48 ч. Уровень экспрессии актина использовали в качестве контроля белковой нагрузки в исследуемых образцах

Fig. 6. Pyrrole-carboxamides 61 (PC-61) and 84 (PC-84) induce abnormalities of cell cycle regulation in HCC1806 Tx-R and SaOS-2 Dox-R cancer sublines. Immunoblot analysis for the expression of p-NuMA (Ser395), p-H3 (Ser10), Mdm2, cyclins A2 and B1, and p-Cdk2 (Tyr15) in HCC1806 Tx-R (a) and SaOS-2 Dox-R (б) cells treated with dimethyl sulfoxide (negative control), PC-61 and 84 (both 10 μ M), and Vinblastine (0.01 μ M) for 48 h. Actin stain was used as a loading control

Таблица 2. Значения IC_{50} (мкМ) для пиррол-карбоксамидов 61 (ПК-61) и 84 (ПК-84), доксорубицина (Dox), паклитаксела (Tx) и индекс резистентности в сублиниях HCC1806 Tx-R и SaOS-2 Dox-R ($n = 3$)

Table 2. IC_{50} values (in the micromolar range) for pyrrole-carboxamides 61 (PC-61) and 84 (PC-84), doxorubicin (Dox), paclitaxel (Tx) and resistance index in HCC1806 Tx-R and SaOS-2 Dox-R cancer sublines ($n=3$)

Клеточная линия Cell line	ПК-61 PC-61	ПК-84 PC-84	Dox	Tx
HCC1806 Tx-R	13,5 ± 0,9	7,2 ± 0,3	1,8 ± 0,5 [34]	5,4 ± 1 [34]
HCC1806	8,4 ± 0,3 [30]	7,2 ± 0,6 [30]	0,22 ± 0,004 [34]	0,22 ± 0,01 [34]
Индекс резистентности сублинии HCC1806 Tx-R Resistance index of HCC1806 Tx-R subline	1,6	1	81,8 [34]	24,5 [34]
SaOS-2 Dox-R	5,3 ± 0,1	9,1 ± 0,4	0,97±0,12	0,000000039 ± 0,000000008
SaOS-2	2,3 ± 0,07	5,1 ± 0,03	0,16±0,02	0,0000001196 ± 0,0000000209
Индекс резистентности сублинии SaOS-2 Dox-R Resistance index of SaOS-2 Dox-R subline	2,3	1,8	6,1	30,7

и поли(АДФ-рибоза)-полимеразы до и после воздействия на них ПК. Действительно, мы обнаружили значительное увеличение экспрессии маркеров апоптоза в клеточных сублиниях HCC1806 Tx-R и SaOS-2 Dox-R после воздействия на них ПК (рис. 7). Следует отметить, что ПК проявляли большую проапоптотическую активность для обеих клеточных сублиний по сравнению с винбластином.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на довольно успешные результаты клинического применения ХП, основной мишенью для которых являются микротрубочки, длительное использование данных лекарственных средств в составе моно- и комбинированной терапии многих злокачественных новообразований имеет ряд серьезных ограничений, включающих в себя низкую биодоступность большинства ХП данной группы, а также тяжелые побочные системные эффекты (например, периферическая нейропатия, миелосупрессия и др.). Кроме того, быстрое развитие вторичной резистентности опухолей к данным ХП является одним из серьезных и клинически значимых факторов, снижающих их эффективность при длительном использовании. Вторичная резистентность к ХП данной группы может являться следствием различных механизмов, включающих в себя активацию АВС-транспортеров, обеспечивающих усиленную экскрецию ХП из опухолевых клеток [35], мутации *TUB*, изменения изоформ тубулина и его посттрансляционные модификации [23] и т.д. Вышеизложенное является мощным драйвером для разработки и последующего внедрения в практическую онкологию новых ХП с аналогичным механизмом действия, способных эффективно обходить вышеуказанные адаптационные механизмы в опухолевых клетках, в том числе с признаками МЛУ.

Известно, что производные химических соединений на основе пиррола и пиразола широко используются для поиска потенциальных кандидатов при разработке новых лекарственных соединений, обладающих противоопухолевой активностью. Результаты исследований последних лет, в том числе нашей научной группы, иллюстрируют их выраженные антипролиферативные и цитотоксические

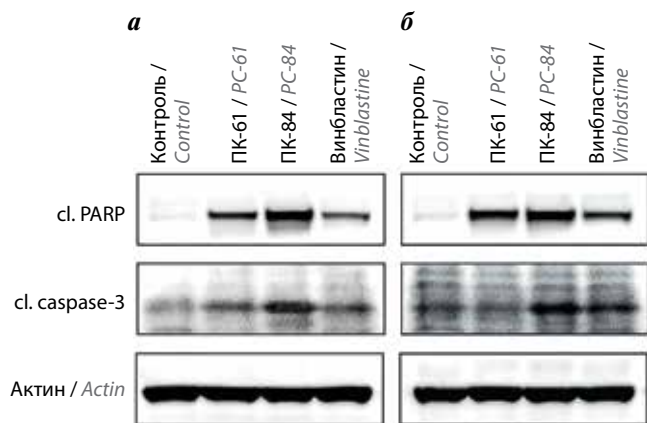


Рис. 7. Индукция апоптоза в опухолевых клетках сублиний HCC1806 Tx-R и SaOS-2 Dox-R под влиянием пиррол-карбоксамидов 61 (ПК-61) и 84 (ПК-84). Уровень экспрессии расщепленных форм поли(АДФ-рибоза)-полимеразы и каспазы-3 (cl. PARP, cl. caspase-3) в клетках сублиний HCC1806 Tx-R (а) и SaOS-2 Dox-R (б) после их культивирования с диметилсульфоксидом (отрицательный контроль), ПК-61, ПК-84 (10 мкМ) и винбластином (0,01 мкМ) в течение 48 ч. Актин использовался в качестве контроля белковой нагрузки в исследуемых образцах

Fig. 7. Pyrrole-carboxamides 61 (PC-61) and 84 (PC-84) induce apoptosis of HCC1806 Tx-R and SaOS-2 Dox-R cancer sublines. Immunoblot analysis for apoptosis markers (e. g., cleaved forms of poly(ADP-ribose)-polymerases and caspase-3) in HCC1806Tx-R breast cancer (A) and SaOS-2 Dox-R osteosarcoma (B) after treatment with dimethyl sulfoxide (negative control), PC-61 and PC-84 (10 μM), and vinblastine (0,01 μM) for 48 h. Actin stain is used as a loading control

эффекты в отношении опухолевых клеток различного происхождения как *in vitro*, так и *in vivo*. Например, было показано, что химическое соединение N-(2-хлорпиридин-4-ил)-5-(4-метилфенил)-1-(хинолин-2-ил)-1H-пиразол-3-карбоксамид обладает выраженным антипролиферативным и цитотоксическим эффектами в отношении различных опухолевых клеточных линий *in vitro*, включая гепатоцеллюлярную карциному человека, рак молочной железы и толстой кишки, посредством нарушения регуляции клеточного цикла и накопления опухолевых клеток в G1-фазе клеточного цикла [36]. Производные 4,5-дигидро-1H-тиено[2',3':2,3]тиэпино[4,5-с]пиразол-3-карбоксамиды эффективны в отношении опухолевой клеточной линии аденокарциномы легкого A549, у которой была обнаружена гиперэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR). Результаты молекулярного докинга показали высокий уровень гомологии между данным химическим соединением и ингибитором EGFR-сигнального пути гефитинибом в отношении их связывания как с EGFR, так и с конформационно измененной формой данного рецептора, обусловленной его активацией, т. е. фосфорилированием [37]. Согласно данным недавно проведенных исследований, производные 4-бензоиламино-1H-пиразол-3-карбоксамиды являются мощными ингибиторами CDK2-киназы и проявляют высокую антипролиферативную активность в отношении опухолевых клеточных линий различного происхождения по сравнению с нетрансформированными клетками [38]. О производных 1-этилпиразол-3-карбоксамиды также сообщалось, что они являются эффективными ингибиторами фактора, индуцируемого гипоксией 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1), что подавляет HIF-1-опосредованный ответ на гипоксию посредством влияния на уровень экспрессии карбоангидразы IX [39]. Проведенный анализ взаимосвязи между структурой и функцией данных соединений показал, что наибольшей цитотоксической активностью, коррелировавшей со способностью ингибировать активность изоферментов карбоангидразы, обладали бензолсульфонамиды [40–43].

Результаты других исследований, в том числе наших, иллюстрируют взаимосвязь противоопухолевой активности пиррол-содержащих соединений и их способности влиять на динамическое состояние тубулина, что индуцирует апоптоз опухолевых клеток в результате остановки клеточного цикла в M-фазе (митотическая катастрофа). Одно из первых сообщений об эффективности соединений на основе пиррола, приводящих к дестабилизации микротрубочек, было опубликовано еще в 2007 г. и показало высокую активность тетразамещенного бромированного пиррола JG03–14 в отношении микротрубочек, что, в свою очередь, приводило к образованию аберрантных митотических волокон, накоплению опухолевых клеток в G2/M-фазах клеточного цикла и последующей активации вну-

треннего (митохондриально-опосредованного) пути апоптоза [44]. Известно, что JG03–14 является аналогом комбретастина А-4 – природного продукта, полученного из южноафриканского дерева *Combretum caffrum* и являющегося хорошо известным агентом природного происхождения, дестабилизирующим микротрубочки. Несмотря на высокую биологическую активность комбретастина А-4 в отношении микротрубочек, основным препятствием для клинического применения этого вещества является его цис-изоформа олефинового мостика, которая довольно быстро трансформируется в менее активную транс-изоформу. Для предотвращения перехода из цис- в транс-изоформу и стабилизации структуры олефиновый мостик комбретастина А-4 был заменен пиррольным кольцом, что привело к созданию целого ряда аналогов JG03–14 с мощной противоопухолевой активностью [45]. Другие исследователи обнаружили, что цис-рестриктированные аналоги комбретастина А-4, которые содержат пиррольное кольцо, расположенное между двумя арильными кольцами, также проявляют высокую антипролиферативную активность в отношении опухолевых клеточных линий различного происхождения из-за их способности ингибировать полимеризацию тубулина, блокировать клеточный цикл в метафазе и активировать митохондриально-опосредованный путь апоптоза [46].

Следует отметить, что во всех сообщениях, представленных выше, подчеркивалось, что активность соединений на основе пиррола в отношении деполимеризации тубулина обусловлена их связыванием с колхициновым доменом в молекуле тубулина. Эти данные согласуются с результатами исследований нашей научной группы, изучающей противоопухолевую активность пиррол-3-карбоксилатов на моделях как *in vitro*, так и *in vivo*. Например, мы обнаружили, что цитотоксическая и антипролиферативная активность этих соединений также обусловлена их способностью вмешиваться в динамическое состояние микротрубочек путем ингибирования полимеризации тубулина [25–27]. Это, в свою очередь, приводило к остановке клеточного цикла опухолевых клеток в M-фазе и индуцировало их апоптоз в результате незавершенности клеточного цикла.

На основании полученных нами ранее данных были синтезированы новые химические соединения, относящиеся к ПК, для их последующего изучения в качестве эффективных ингибиторов полимеризации тубулина, обладающих высокой активностью в отношении опухолевых клеток эпителиального происхождения (рак молочной железы, легких, простаты и др.). В частности, в результате комплексного анализа биологической активности и компьютерного моделирования 38 новых химических соединений обнаружены 2 лидерных соединения (ПК-61 и ПК-84), обладающих наименьшей энергией связывания с колхициновым доменом в молекуле тубулина и максимальной

биологической активностью в отношении широкого спектра опухолевых клеток эпителиального происхождения как *in vitro*, так и *in vivo* [30].

Было также показано, что данные химические соединения способны нарушать процессы полимеризации тубулина [30]. В рамках настоящего исследования мы показали высокую цитотоксическую и проапоптотическую активность данных соединений в отношении опухолевых клеток с признаками МЛУ. Воздействие ПК на опухолевые клетки приводило к выраженным изменениям в их морфологии, схожим с изменениями, происходящими под влиянием тубулин-деполимеризующего ХП винбластин. Способность ПК-61 и ПК-84 нарушать динамическое состояние белков цитоскелета также подтверждена результатами иммунофлуоресцентной микроскопии, показавшими диффузное распределение α -тубулина в клетках, культивированных с ПК, а также с винбластином (см. рис. 2, 3). В результате нарушения формирования сети микротрубочек после воздействия ПК в опухолевых клетках наблюдались дезрегуляция клеточного цикла и их селективное накопление в М-фазе, о чем свидетельствовало значительное увеличение числа p-H3-Ser10-положительных клеток (см. рис. 5), также сопровождаемое увеличением уровня экспрессии данного белка в опухолевых клетках (см. рис. 6). Нарушения регуляции клеточного цикла после воздействия на опухолевые клетки ПК подтверждались изменениями в экспрессии других белков-регуляторов клеточного цикла, а именно Mdm2, p-Cdk-Tyr15 и циклинов B1 и A2 (см. рис. 6). Это согласуется с изменениями в морфологии клеток, культивированных с ПК (см. рис. 1), и данными проточной цитофлуориметрии, показавшими существенное увеличение числа клеток в G2/M-фазах клеточного цикла (см. рис. 4). Результатом нарушений регуляции клеточного цикла опухолевых клеток явилась их гибель по механизму апоптоза, о чем свидетельствовали повышенные уровни экспрессии расщепленных форм поли(АДФ-рибоза)-полимераза и каспазы-3 (см. рис. 7).

Таким образом, соединения 2-амино-1-бензамидо-5-(2-(нафтилен-2-ил)-2-оксоэтилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1-Н-пиррол-3-карбоксамид (ПК-61)

и 22-амино-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-1-[2-(фениламино)-бензамидо]-4,5-дигидро-1Н-пиррол-карбоксамид (ПК-84) обладают выраженной цитотоксической и проапоптотической активностью в отношении опухолевых клеточных сублиний различного происхождения с ранее доказанными фенотипическими признаками резистентности к ХП. Данная активность ПК явилась следствием способности вышеуказанных химических соединений нарушать процессы динамического равновесия белков цитоскелета, в частности тубулина, препятствуя его полимеризации. Это, в свою очередь, приводит к нарушениям в регуляции клеточного цикла, селективному накоплению клеток в М-фазе и последующей их гибели по механизму апоптоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было показано, что 2 соединения, относящихся к группе пиррол-карбоксамидов (ПК-61 и ПК-84), проявляют высокую цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток с признаками МЛУ как эпителиального, так и мезенхимального происхождения *in vitro*. Противоопухолевая активность этих соединений обусловлена их способностью к деполимеризации тубулина, что приводит к нарушению формирования сети микротрубочек в опухолевых клетках, вызывая тем самым остановку клеточного цикла в М-фазе и запуская гибель клеток по механизму апоптоза. Это показывает, что ПК, имеющие высокое сродство к колхициновому сайту связывания в тубулине, должны рассматриваться как перспективный класс противоопухолевых соединений и, следовательно, могут использоваться в качестве основы для разработки нового класса ХП с описанным выше механизмом действия. Изучение стабильности ПК в плазме, их способностей всасываться в желудочно-кишечном тракте и проникать через гематоэнцефалический барьер в настоящее время является предметом наших исследований, результаты которых будут важными для последующей оценки перспективности разработки и внедрения ПК в качестве лекарственных препаратов для терапии пациентов с солидными злокачественными новообразованиями, в том числе с фенотипом МЛУ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Parker A.L., Kavallaris M., McCarroll J.A. Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Front Oncol* 2014;4:1–19. DOI: 10.3389/fonc.2014.00153
2. Dumontet C., Jordan M.A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9(10):790–803. DOI: 10.1038/nrd3253
3. Gigant B., Wang C., Ravelli R.B. et al. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* 2005;435(7041):519–22. DOI: 10.1038/nature03566
4. Ravelli R.B., Gigant G., Curmi B. et al. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* 2004;428(6979):198–202. DOI: 10.1038/nature02393
5. Yang J., Wang Y., Wang T. et al. Pironetin reacts covalently with cysteine-316 of α -tubulin to destabilize microtubule. *Nat Commun* 2016;7:12103. DOI: 10.1038/ncomms12103
6. Prota A.E., Setter J., Waight A.B. et al. Pironetin binds covalently to α Cys316 and perturbs a major loop and helix

- of α -tubulin to inhibit microtubule formation. *J Mol Biol* 2016;428(15):2981–8. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.06.023
7. Steinmetz M.O., Prota A.E. Microtubule-targeting agents: strategies to hijack the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 2018;28(10):776–92. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.05.001
 8. Fanale D., Bronte G., Passiglia F. et al. Stabilizing versus destabilizing the microtubules: a double-edge sword for an effective cancer treatment option? *Anal Cell Pathol* 2015;2015:690916. DOI: 10.1155/2015/690916
 9. Mooberry S.L., Tien G., Hernandez A.H. et al. Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents. *Cancer Res* 1999;59(3):653–60.
 10. West L.M., Northcote P.T., Battershill C.N., Peloruside A. A potent cytotoxic macrolide isolated from the New Zealand marine sponge *Mycale* sp. *J Org Chem* 2000;65(2):445–9. DOI: 10.1021/jo991296y
 11. Prota A.E., Bargsten K., Northcote P.T. et al. Structural basis of microtubule stabilization by laulimalide and peloruside A. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014;53(6):1621–5. DOI: 10.1002/anie.201307749
 12. Munshi N., Jeay S., Li Y. et al. ARQ 197, a novel and selective inhibitor of the human c-met receptor tyrosine kinase with antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 2010;9(6):1544–53. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1173
 13. Katayama R., Aoyama A., Yamori T. et al. Cytotoxic activity of tivantinib (ARQ 197) is not due solely to c-MET inhibition. *Cancer Res* 2013;73(10):3087–96. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3256
 14. Aoyama A., Katayama R., Oh-Hara T. et al. Tivantinib (ARQ 197) exhibits antitumor activity by directly interacting with tubulin and overcomes ABC transporter-mediated drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2014;13(12):2978–90. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0462
 15. Gumireddy K., Reddy M.V.R., Cosenza S.C. et al. ONO1910, a non-ATP-competitive small molecule inhibitor of Plk1, is a potent antitumor agent. *Cancer Cell* 2005;7:275–86. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.02.009
 16. Jost M., Chen Y., Gilbert L.A. et al. Combined CRISPR/a-based chemical genetic screens reveal that rigosertib is a microtubule-destabilizing agent. *Mol Cell* 2017;68(1):210–23. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.09.012
 17. Park H., Hong S., Hong S. Nocodazole is a high-affinity ligand for the cancer-related kinases ABL, c-KIT, BRAF, and MEK. *Chem Med Chem* 2012;7(1):53–6. DOI: 10.1002/cmdc.201100410
 18. Guo X., Zhang X., Li Y. et al. Nocodazole increases the ERK activity to enhance MKP-1 expression which inhibits p38 activation induced by TNF- α . *Mol Cell Biochem* 2012;364(1–2):373–80. DOI: 10.1007/s11010-012-1239-5
 19. Tanabe K. Microtubule depolymerization by kinase inhibitors: unexpected findings of dual inhibitors. *Int J Mol Sci* 2017;18(12):2508. DOI: 10.3390/ijms18122508
 20. Ramirez-Rios S., Michallet S., Peris L. et al. A new quantitative cell-based assay reveals unexpected microtubule stabilizing activity of certain kinase inhibitors, clinically approved or in the process of approval. *Front Pharmacol* 2020;11:543. DOI: 10.3389/fphar.2020.00543
 21. Krishna R., Mayer L.D. Multidrug resistance (MDR) in cancer: mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000;11(4):265–83. DOI: 10.1016/S0928-0987(00)00114-7
 22. Mechetner E., Kyshtoobayeva A., Zonis S. et al. Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expressing by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clin Cancer Res* 1998;4(2):389–98.
 23. Kavallaris M., Kuo D.Y., Burkhart C.A. et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isoforms. *J Clin Invest* 1997;100(5):1282–93. DOI: 10.1172/JCI119642
 24. Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer* 2010;10(3):194–204. DOI: 10.1038/nrc2803
 25. Зыкова С.С., Бойчук С.В., Галембикова А.Р. и др. 3-гидрокси-1,5-диарил-4-пивалоил-2,5-дигидро-2-пирролоны нарушают процессы митоза и индуцируют гибель опухолевых клеток *in vitro*. *Цитология* 2014;56:439–42. Zykova S.S., Boychuk S.V., Galimbekova A.R. et al. 3-hydroxy-1,5-diaryl-4-pivaloyl-2,5-dihydro-2-pyrrolone disrupt mitosis processes and induce the death of tumor cells *in vitro*. *Citologiya = Cytology* 2014;56:439–42. (In Russ.).
 26. Boichuk S., Galembikova A., Zykova S. et al. Ethyl-2-amino-pyrrole-3-carboxylates are novel potent anticancer agents that affect tubulin polymerization, induce G2/M cell-cycle arrest, and effectively inhibit soft tissue cancer cell growth *in vitro*. *Anti-Cancer Drugs* 2016;27(7):620–34. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000372
 27. Boichuk S., Galembikova A., Dunaev P. et al. Ethyl-2-amino-pyrrole-3-carboxylates are active against imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors *in vitro* and *in vivo*. *Anti-Cancer Drugs* 2019;30(5):475–84. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000753
 28. Carta D., Bortolozzi R., Sturlese M. et al. Synthesis, structure-activity relationships and biological evaluation of 7-phenyl-pyrroloquinolinone 3-amide derivatives as potent antimetabolic agents. *Eur J Med Chem* 2017;127:643–60. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.10.026
 29. Brindisi M., Ulivieri C., Alfano G. et al. Structure-activity relationships, biological evaluation and structural studies of novel pyrrolonaphthoxazepines as antitumor agents. *Eur J Med Chem* 2019;162:290–320. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.11.004
 30. Boichuk S., Galembikova A., Syuzov K. et al. The design, synthesis, and biological activities of pyrrole-based carboxamides: the novel tubulin inhibitors targeting the colchicine-binding site. *Molecules* 2021;26(19):5780. DOI: 10.3390/molecules26195780
 31. Boichuk S., Galembikova A., Sitenkov A. et al. Establishment and characterization of a triple negative basal-like breast cancer cell line with multi-drug resistance. *Oncol Lett* 2017;14(4):5039–45. DOI: 10.3892/ol.2017.6795
 32. Zykova S., Kizimova I., Syutkina A. et al. Synthesis and cytostatic activity of (E)-ethyl-2-amino-5-(3,3-dimethyl-4-oxobutylidene-4-oxo-1-(2-phenylaminobenzamido)-4,5-dihydro-1H-pyrrol-3-carboxylate. *Pharm Chem J* 2020;53:895–8. DOI: 10.1007/s11094-020-02096-z
 33. Boichuk S., Bikinieva F., Valeeva E. et al. Establishment and characterization of multi-drug resistant p53-negative osteosarcoma SaOS-2 subline. *Diagnostics* 2023;13:2646. DOI: 10.3390/diagnostics13162646
 34. Boichuk S., Dunaev P., Mustafin I. et al. Infigratinib (BGJ 398), a pan-FGFR inhibitor, targets P-glycoprotein and increases chemotherapeutic-induced mortality of multidrug-resistant tumor cells. *Biomedicines* 2022;10(3):601. DOI: 10.3390/biomedicines10030601
 35. Distefano M., Scambia G., Ferlini C. et al. Antitumor activity of paclitaxel (taxol) analogues on MDR-positive human cancer cells. *Anticancer Drug Des* 1998;13(5):489–99.
 36. Pirol Ş.C., Çalıřkan B., Durmaz I. et al. Synthesis and preliminary mechanistic evaluation of 5-(p-tolyl)-1-(quinolin-2-yl)pyrazole-3-carboxylic acid amides with potent anti-proliferative activity on human cancer cell lines. *Eur J Med Chem* 2014;87:140–9. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.09.056
 37. Ke J., Lu Q., Wang X. et al. Discovery of 4,5-dihydro-1H-thieno[2',3':2,3]thiopyrrolo[4,5-c]pyrazole-3-carboxamide derivatives as the potential epidermal growth factor receptors for tyrosine kinase inhibitors. *Molecules* 2018;23:1980. DOI: 10.3390/molecules23081980
 38. Lin T., Li J., Liu L. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of 4-benzoylamino-1H-pyrazole-3-carboxamide derivatives as potent CDK2 inhibitors. *Eur J Med Chem* 2021;215:113281. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113281
 39. Yasuda Y., Arakawa T., Nawata Y. et al. Design, synthesis, and structure-activity relationships of 1-ethylpyrazole-3-carboxamide compounds as novel hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2015;23(8):1776–87. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.02.038

40. Gul H.I., Mete E., Eren S.E. et al. Designing, synthesis and bioactivities of 4-[3-(4-hydroxyphenyl)-5-aryl-4,5-dihydropyrazol-1-yl]benzenesulfonamides. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2017;32(1):169–75. DOI: 10.1080/14756366.2016.1243536
41. Gul H.I., Yamali C., Bulbul M. et al. Anticancer effects of new dibenzenesulfonamides by inducing apoptosis and autophagy pathways and their carbonic anhydrase inhibitory effects on hCA I, hCA II, hCA IX, hCA XII isoenzymes. *Bioorg Chem* 2018;78:290–7. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.03.027
42. Gul H.I., Yamali C., Sakagami H. et al. New anticancer drug candidates sulfonamides as selective hCA IX or hCA XII inhibitors. *Bioorg Chem* 2018;77:411–9. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.01.021
43. Yamali C., Sakagami H., Uesawa Y. et al. Comprehensive study on potent and selective carbonic anhydrase inhibitors: synthesis, bioactivities and molecular modelling studies of 4-(3-(2-arylidenehydrazine-1-carbonyl)-5-(thiophen-2-yl)-1H-pyrazole-1-yl) benzenesulfonamides. *Eur J Med Chem* 2021;217:113351. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113351
44. Mooberry S.L., Weiderhold K.N., Dakshnamurthy S. et al. Identification and characterization of a new tubulin-binding tetrasubstituted brominated pyrrole. *Mol Pharmacol* 2007;72(1):132–40. DOI: 10.1124/mol.107.034876
45. Da C., Telang N., Barelli P. et al. Pyrrole-based antitubulin agents: two distinct binding modalities are predicted for C-2 analogues in the colchicine site. *ACS Med Chem Lett* 2012;3(1):53–7. DOI: 10.1021/ml200217u
46. Romagnoli R., Oliva P., Salvador M.K. et al. A facile synthesis of diaryl pyrroles led to the discovery of potent colchicine site antimetabolic agents. *Eur J Med Chem* 2021;214:113229. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113229

Благодарность. Авторы выражают благодарность профессору кафедры общей и органической химии Пермской государственной фармацевтической академии Н.М. Игидову за помощь в синтезе ПК, изученных в данном исследовании.

Acknowledgment. The authors acknowledge Professor N.M. Igidov from Perm State Academy of Pharmacy for the help in synthesis of PCs used in present study.

Вклад авторов

А.Р. Галембикова: разработка концепции и дизайна исследования, проведение исследования, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи, редактирование, окончательное утверждение версии статьи;
 П.Д. Дунаев: иммунофлуоресцентный анализ, анализ и интерпретация данных;
 Ф.Ф. Бикиниева: вестерн-блоттинг, анализ и интерпретация данных;
 И.Г. Мустафин: цитофлуориметрический анализ, анализ и интерпретация данных;
 С.С. Зыкова, П.Б. Копнин: научное консультирование;
 Ф.И. Мухутдинова: участие в выполнении экспериментов по иммунофлуоресцентной микроскопии;
 Е.А. Сарбазян: анализ и интерпретация данных;
 С.В. Бойчук: разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи, редактирование, окончательное утверждение версии статьи.

Authors' contribution

A.R. Galembikova: development of the concept and design of the study, research, analysis and interpretation of data, article writing, editing, in the final approval of the version of the article;
 P.D. Dunaev: immunofluorescence analysis, data analysis and interpretation;
 F.F. Bikinieva: Western blotting, analysis and interpretation of data;
 I.G. Mustafin: flow cytometry, analysis and interpretation of data;
 S.S. Zykov, P.B. Kopnin: scientific consulting;
 F.I. Mukhutdinova: participation in performing experiments on immunofluorescence microscopy;
 E.A. Sarbazyan: analysis and interpretation of data;
 S.V. Boichuk: development of the concept and design of the study, analysis and interpretation of data, article writing, editing, in the final approval of the version of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.Р. Галембикова / A.R. Galembikova: <https://orcid.org/0000-0002-0293-2974>
 П.Д. Дунаев / P.D. Dunaev: <https://orcid.org/0000-0002-5449-4435>
 Ф.Ф. Бикиниева / F.F. Bikinieva: <https://orcid.org/0000-0002-9012-6525>
 И.Г. Мустафин / I.G. Mustafin: <https://orcid.org/0000-0001-9683-3012>
 С.С. Зыкова / S.S. Zyкова: <https://orcid.org/0000-0002-7395-4951>
 П.Б. Копнин / P.B. Kopnin: <https://orcid.org/0000-0002-2078-4274>
 Ф.И. Мухутдинова / F.I. Mukhutdinova: <https://orcid.org/0009-0004-9666-0130>
 Е.А. Сарбазян / E.A. Sarbazyan: <https://orcid.org/0009-0005-4068-662X>
 С.В. Бойчук / S.V. Boichuk: <https://orcid.org/0000-0003-2415-1084>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-00014) и в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Funding. The study was carried out with the support of the Russian Science Foundation (grant No. 21-75-00014) and was performed as a part of Russia Strategic Academic Leadership Program (PRIORITY-2030) of Kazan Federal University of Ministry of Health.

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

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with the rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia.

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

Статья поступила: 29.05.2023. **Принята к публикации:** 09.06.2023.

Article submitted: 29.05.2023. **Accepted for publication:** 09.06.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-72-81



Механизмы нарушения экспрессии генов р53-респонсивных микроРНК при диффузной В-крупноклеточной лимфоме

Е.Н. Воропаева^{1,2}, Т.И. Поспелова², М.И. Чуркина², А.А. Гуражева¹, О.В. Березина², В.Н. Максимов^{1,2}

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

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

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

Введение. Большое значение для понимания механизмов формирования и прогрессии диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), а также ее чувствительности к лечению имеет более глубокое представление о молекулярных событиях, нарушающих функционирование сигнального пути р53. Белок р53 проявляет свою онкосупрессорную функцию и опосредует противоопухолевые эффекты лекарственных препаратов посредством регуляции транскрипции и/или созревания широкого спектра генов-мишеней, в том числе *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203*. В опухолевой ткани лимфом по сравнению с нормальной лимфоидной тканью показано снижение уровня кодируемых данными генами микроРНК.

Цель исследования – комплексный анализ метилирования генов р53-респонсивных микроРНК *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2*, а также мутаций в ДНК-связывающем домене и разрушения последовательности сигнала к полиаденилированию гена *TP53* при ДВККЛ.

Материалы и методы. Проанализированы 136 образцов ДНК, выделенной из опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ, и 11 образцов ДНК, полученной из лимфатических узлов с реактивной В-клеточной фолликулярной гиперплазией. Определение статуса метилирования генов *MIR-203* и *MIR-129-2* осуществляли методом метил-специфичной полимеразной цепной реакции, генов *MIR-34A* и *MIR-34B/C* – методом метил-чувствительного анализа кривых плавления высокого разрешения. В опухолевых образцах методом полимеразной цепной реакции с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов выполнено генотипирование варианта нуклеотидной последовательности rs78378222, приводящего к разрушению сигнала полиаденилирования, с помощью капиллярного прямого секвенирования по Сэнгеру определена нуклеотидная последовательность района гена *TP53*, кодирующего ДНК-связывающий домен.

Результаты. Выявляемое в лимфатической ткани метилирование носило опухолеспецифичный характер. Частота анализируемых aberrаций в гене *TP53* и метилирования *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* составила 21, 23, 55, 65 и 66 % соответственно. При этом метилирование анализируемых генов р53-респонсивных микроРНК и aberrаций в гене *TP53* в опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ являлись независимыми событиями с тенденцией к взаимному исключению. Вместе с тем показано, что в подавляющем большинстве образцов лимфомы метилирование генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* носило сочетанный характер.

Заключение. Наряду с aberrациями в *TP53*, метилирование генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* может являться частой причиной снижения экспрессии miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-129 и miR-203 при ДВККЛ. Сочетанное метилирование генов *MIR-203*, *MIR-129-2* и *MIR-34B/C*, а также пары *MIR-34B/C* и *MIR-34A* потенциально имеет более выраженный проопухолевый эффект за счет наличия у кодируемых ими микроРНК общих мишеней.

Ключевые слова: ген *TP53*, мутации, rs78378222, микроРНК, метилирование, miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-129, miR-203, лимфома

Для цитирования: Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Чуркина М.И. и др. Механизмы нарушения экспрессии генов р53-респонсивных микроРНК при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(3): 72–81. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-72-81

Mechanisms of impaired expression of p53-responsive microRNA genes in diffuse B-large cell lymphoma

E.N. Voropaeva^{1,2}, T.I. Pospelova², M.I. Churkina², A.A. Gurazheva¹, O.V. Berezina², V.N. Maksimov^{1,2}

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

²Novosibirsk State Medical University, Ministry of Health of Russia; 52 Red Prospect, Novosibirsk 630091, Russia

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

Introduction. A more in-depth description of molecular events that disrupt the functioning of the p53 signaling pathway is important for understanding the mechanisms of formation and progression of diffuse B-large cell lymphoma (DLCL), as well as its sensitivity to treatment. The p53 protein exhibits its oncosuppressive function and mediates the antitumor effects of drugs by regulating transcription and/or maturation of a wide range of target genes, including *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* and *MIR-203*. In the tumor tissue of lymphomas, in comparison with normal lymphoid tissue, a decrease in the level of microRNAs encoded by these genes is shown.

Aim. The aim of this study was to conduct a comprehensive analysis of the methylation of the genes of the p53-responsive microRNAs *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* and *MIR-129-2*, as well as mutations in the DNA-binding domain and destruction of the polyadenylation signal of the *TP53* gene in DLBCL.

Materials and methods. 136 DNA samples isolated from tumor tissue of patients with DLBCL and 11 DNA samples obtained from lymph nodes with reactive B-cell follicular hyperplasia were analyzed. The methylation status of *MIR-203* and *MIR-129-2* genes was determined by the method of methyl-specific polymerase chain reaction, *MIR-34A* and *MIR-34B/C* genes by the method of methyl-sensitive analysis of high-resolution melting curves. In tumor samples, rs78378222 genotyping was performed by polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism, resulting in the destruction of the polyadenylation signal, and the nucleotide sequence of the region of the *TP53* gene encoding the DNA-binding domain was determined by capillary direct sequencing by Sanger.

Results. The methylation detected in lymphoma tissue was tumor-specific. The frequency of analyzed aberrations in the *TP53* gene and methylation of *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* and *MIR-203* was 21, 23, 55, 65 and 66 %, respectively. At the same time, methylation of the analyzed genes of p53-responsive microRNAs and aberrations in the *TP53* gene in the tumor tissue of patients with DLBCL were independent events with a tendency to mutual exclusion. At the same time, it was shown that in the vast majority of lymphoma samples, the methylation of the *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* and *MIR-203* genes was combined.

Conclusion. Along with aberrations in *TP53*, methylation of *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* and *MIR-203* genes may be an important cause of decreased expression of miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-129 and miR-203 in DLBCL. The combined methylation of the *MIR-203*, *MIR-129-2* and *MIR-34B/C* genes, as well as the *MIR-34B/C* and *MIR-34A* pairs, potentially has a more pronounced pro-tumor effect due to the presence of common targets in the microRNAs encoded by them.

Keywords: *TP53* gene, mutations, rs78378222, microRNA, methylation, miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-129, miR-203, lymphoma

For citation: Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Churkina M.I. et al. Mechanisms of impaired expression of p53-responsive microRNA genes in diffuse B-large cell lymphoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Uspekhi Advances in Molecular Oncology* 2023;10(3):72–81. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-72-81

ВВЕДЕНИЕ

Важным этапом развития многих злокачественных новообразований является нарушение функционирования гена *TP53*, которое может возникать на ранних стадиях формирования опухоли или при ее прогрессии [1]. Помимо онкосупрессорной функции путем контроля клеточного цикла и апоптоза, регуляции дифференцировки, репарации ДНК, антиоксидантной защиты и метаболизма, модулирования активности сигнальных путей цитокиновых рецепторов и экспрессии на поверхности клеток молекул, необходимых для презентации эндогенных антигенов и иммунного распознавания, кодируемый данным геном белок p53 опосредует эффект противоопухолевых агентов различной молекулярной направленности [1, 2]. Именно поэтому оценка функционального статуса *TP53* широко используется для стратификации онкологических пациентов на прогностические группы [3].

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) является биологически гетерогенным, наиболее частым типом агрессивных неходжкинских

лимфом. Около 40 % пациентов с данной патологией имеют рефрактерно-рецидивирующее течение заболевания при применении стандартной терапии 1-й линии – ритуксимаба в комбинации с протоколом СНОР (циклофосфан, доксорубицин, винкристин, преднизолон) [4]. Таким образом, отбор больных лимфомой с высоким риском неэффективности лечения и разработка новых подходов терапии, которые будут эффективны у данной когорты пациентов с ДВККЛ, имеют большую актуальность.

Наиболее активно изучаемым при ДВККЛ аспектом aberrаций в гене *TP53* является его мутационный статус [5]. Вместе с тем в настоящее время не предложены терапевтические подходы, преодолевающие неблагоприятное прогностическое значение мутаций в данном гене при лимфоме. Дальнейшего изучения требуют и механизмы устойчивости опухолевых клеток к стандартной терапии в случаях ДВККЛ с отсутствием мутаций в *TP53* [4].

Белок p53 является транскрипционным фактором и большинство своих эффектов реализует через

регуляцию экспрессии мишеней главным образом путем прямого связывания со специфическими последовательностями ДНК, называемыми р53-чувствительными элементами и расположенными в промоторах респонсивных генов. Накапливается все больше свидетельств того, что данный белок проявляет свою онкосупрессорную функцию и опосредует противоопухолевые эффекты лекарственных препаратов посредством регуляции транскрипции и/или созревания широкого спектра микроРНК, в том числе микроРНК-34а, -34b, -34с, -129 и -203 [6–9]. Известно также, что экспрессия перечисленных онкосупрессорных микроРНК снижена при лимфомах [8, 9].

Мутантный статус *TP53* может быть одним из потенциальных, но не единственным механизмом нарушения экспрессии р53-респонсивных молекул. Косвенно об этом свидетельствует тот факт, что в опухолевых клетках с мутациями в данном гене не происходит общее снижение уровня всех регулируемых им мишеней, при этом экспрессия одних из них нарушается в гораздо большей степени, чем других [1].

Изменения в 3'-нетранслируемой последовательности гена *TP53* также могут иметь прямое биологическое действие на функцию р53 [10]. Так, вариант нуклеотидной последовательности rs78378222 в 3'-нетранслируемой последовательности гена приводит к изменению сигнала к полиаденилированию ААТААА на ААТАСА, нарушению процессинга 3'-конца матричной РНК и формированию функционального дефицита *TP53*.

Гены *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* расположены в CpG-богатых регионах, и aberrантное метилирование также может иметь большое значение в нарушении их экспрессии при опухолях [8, 9]. Однако, в отличие от злокачественных новообразований эпителиального происхождения и сарком, эпигенетические нарушения в данных генах при лимфомах мало изучены.

Таким образом, более глубокое представление о лежащих в основе развития ДВККЛ молекулярных событиях, затрагивающих сигнальный путь р53, имеет большое значение для понимания механизмов формирования и прогрессии опухоли, а также ее чувствительности к лечению.

Цель исследования – комплексный анализ метилирования генов р53-респонсивных микроРНК *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2*, а также мутаций в ДНК-связывающем домене и разрушения последовательности сигнала полиаденилирования гена *TP53* при ДВККЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association) 2000 г. и протоколом к Конвенции о правах человека и биомедицине (Protocol to the Convention on Human Rights and Biomedicine) 1999 г.

Проанализированы 136 образцов ДНК, выделенной из опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ (с содержанием опухолевых клеток не менее 50 %), и 11 образцов ДНК, полученной из лимфатических узлов с реактивной В-клеточной фолликулярной гиперплазией. С FFPE-блоков брались срезы толщиной 10–12 мкм. Выделение ДНК проводили методом фенольно-хлороформной экстракции с применением гуанидина. Оценку и контроль качества выделенных нуклеиновых кислот выполняли на BioTek Epoch (BioSPX, Бельгия).

Бисульфитную конверсию выделенной ДНК проводили с применением наборов EZ DNA Methylation-Gold Kit. Для контроля полноты конверсии применяли набор Human Methylated and Unmethylated DNA Control Kit (рис. 1). Определение статуса метилирования генов *MIR-203* и *MIR-129-2* осуществляли методом метил-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР), генов *MIR-34A* и *MIR-34B/C* – методом метил-чувствительного анализа кривых плавления высокого разрешения (табл. 1).

В опухолевых образцах описанным ранее методом ПЦР с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов выполнено генотипирование rs78378222, приводящего к разрушению сигнала полиаденилирования [7].

Методом капиллярного прямого секвенирования по Сэнгеру определена нуклеотидная последовательность *TP53* (экзоны 5–10) в соответствии с протоколом Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer, IARC). Анализ осуществляли методом капиллярного электрофореза на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Результаты секвенирования анализировали с помощью программ SeqScape и Chromas. В качестве референсной использовалась последовательность гена *TP53* NG_017013.

Количественный анализ сочетанного выявления метилирования изученных генов и aberrаций в *TP53* проводили путем вычисления двоичного логарифма отношений шансов (\log_2 odds ratio) и одностороннего точного критерия Фишера (p -value) с поправкой на множественность сравнений с помощью процедуры Бенджамини–Хохберга (q -value). С помощью онлайн-сервиса OncoPrinter [14] получена картина сочетанного выявления изучаемых молекулярно-генетических нарушений. Мутационный спектр гена *TP53* был визуализирован в формате графика «леденец на палочке» с помощью программы Lollipop [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке мутационного профиля гена *TP53* и rs78378222 в 3'-нетранслируемой последовательности показано, что в целом частота анализируемых aberrаций в группе исследования составила 21 % (29/136). У 10/из 136 (7,4 %) человек выявлены множественные нарушения.

Распределение aberrаций по типам было следующим: разрушение сигнала полиаденилирования –

Таблица 1. Последовательности праймеров для MS-ПЦР и MS-HRM и длины ампликонов анализируемых генов микроРНК

Table 1. Primers sequences for MS-PCR and MS-HRM and lengths of amplicons of analyzed microRNA genes

Метод Method	Ген Gene	Последовательность праймеров Primers sequences	Длина ампликона (п. н.) Amplicon length (b. p.)	Температура отжига праймеров, °С Primer annealing temperature, °C	Источник Reference
MS-HRM	MIR-34A	F 5'-tttttttttagtggaggagatg-3' R 5'-ccaacaacaaccsaacaaca-3'	155	64	[11]
	MIR-34B/C	F 5'-ttgtattaaaataaggtatagatatta-3' R 5'-cgcttccaacatcttctct-3'	99	56	
МС-ПЦР MS-PCR	MIR-203	MF 5'-gagtatttcggttagacgagac-3' MR 5'-cctttatacagcgaaccg-3'	287	60	[12]
		UMF 5'-tttgagtattttggttagatgagat-3' UMR 5'-aacacctttatacaacaacca-3'			
	MIR-129-2	MF 5'-gagttgggggatcgccgac-3' MR 5'-atataccgactcttcgattcggc-3'	189	62	
		UMF 5'-gagttgggggattgtggat-3' UMR 5'-aatataccaactcttcaattcacca-3'	188	60	[13]

Примечание. MS-HRM – methyl-sensitive high-resolution melting curves analysis, метил-чувствительный анализ кривых плавления высококого разрешения, MS-ПЦР – метил-специфичная полимеразная цепная реакция, п. н. – пар нуклеотидов.

Note. MS-HRM – methyl-sensitive high-resolution melting curves analysis; MS-PCR – methyl-specific polymerase chain reaction, b. p. – base pairs.

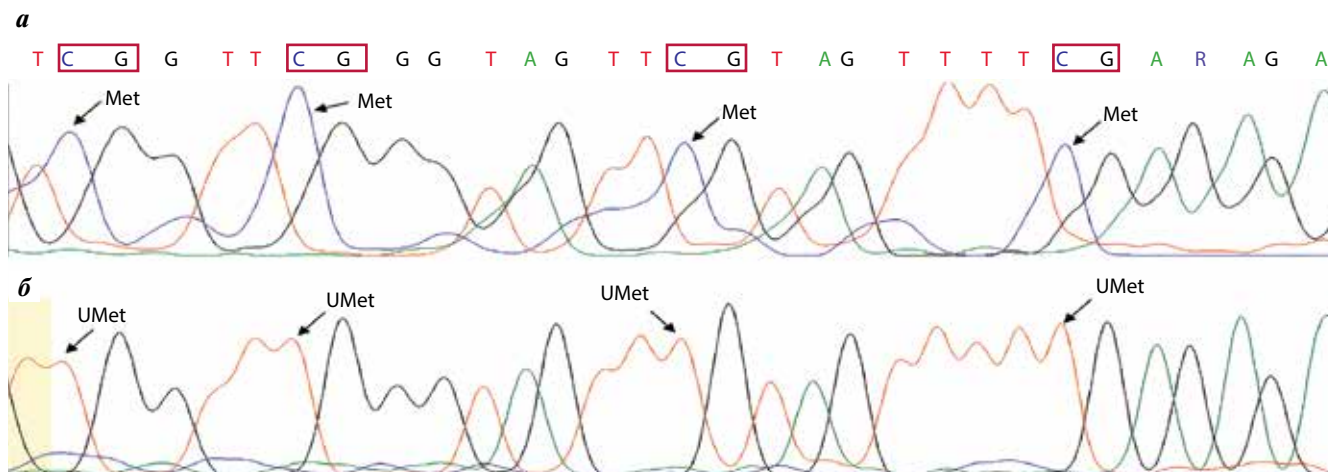


Рис. 1. Фрагмент хроматограммы бисульфитного сиквенса CpG-островка гена MIR-129-2: а – метилированная ДНК; б – неметилированная ДНК. Met – цитозин в метилированном состоянии; UMet – тимин на месте цитозина в неметилированном состоянии. Красной рамкой выделены CpG-динуклеотиды

Fig. 1. A fragment of the CpG island bisulfite sequence chromatogram of the MIR-129-2 gene: а – methylated DNA; б – unmethylated DNA. Met – cytosine in the methylated state; UMet – thymine in place of cytosine in the unmethylated state, CpG dinucleotides are highlighted in red frame

17,0 % (9/53); интронные мутации с неизвестным эффектом – 22,6 % (12/53); миссенс-замены – 39,6 % (21/53); сеймсенс – 13,2 % (7/53) и нонсенс-замены – 3,8 % (2/53); мутации, приводящие к нарушению сплайсинга молекулы РНК, – 1,9 % (1/53); – мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания в гене TP53, – 1,9 % (1/53) (табл. 2).

Все мутации, за исключением A189Pfs (98,1 %), представляли собой однонуклеотидные замены. Неоднократно в группе исследования отмечены миссенс-замены p.W146R, p.T155I и p.V273C, а также нонсенс-замены p.R213X* и с.1175T>G, приводящие к нарушению полиаденилирования.

Расположение мутаций по последовательности TP53 представлено на рис. 2. Биоинформационный анализ с применением программы Polyphen2 показал, что 2/3 (14 из 18; 77,8 %) миссенс-замен являлись возможно патогенными и ранее были описаны при злокачественных новообразованиях (табл. 3 и 4).

В ходе анализа статуса метилирования генов MIR-203, MIR-129-2, MIR-34A и MIR-34B/C отрицательный и положительный контроли из набора Human Methylated and Unmethylated DNA Control Kit (Zymo Research, США) показали ожидаемые результаты. Ни один образец ДНК, выделенной из ткани лимфатических узлов с реактивной гиперплазией, не имел

Таблица 2. Общая характеристика результатов секвенирования гена TP53

Table 2. General characteristics of the TP53 gene sequencing results

3/НТО 3/-UTR	Расположение мутаций Mutations localization					
	Интроны Introns		Кодирующая последовательность Coding sequence			
	С неизвестным эффектом With the unknown effect	Влияние на сплайсинг Impact on splicing	Нонсенс Nonsense	Сдвиг рамки Frame shift	Миссенс Missense	Синонимичные Synonymous
c.1175T>G#	IVS4–30T>C*	IVS6–36G>C	p.SR213X*	p.SA189Pfs	p.SL130F	p.V157V
	IVS5+43G>T				p.SW146R*	
	IVS5–17T>C				p.ST155I*	
	IVS7+31G>C*				p.SR156C	p.SS166S
	IVS8+10C>A*				p.SM160V	
	IVS8+20A>G				p.SV173L	
	IVS8+37A>G				p.SH178D	p.H179H
	IVS9+12T>C*				p.R196Q	
					p.SR197G	
					p.ST211S	p.SL252L
					p.SV218A	
					p.SG244S	
					p.SR249S	p.V272V
					p.SV272E	
p.SV273C*						
p.SA276V	p.SG302G					
p.SE285Q	p.A307A					
p.SG293R						

*Мутации, встречающиеся в группе исследования 2 раза. #Мутация, встречающаяся в группе исследования 9 раз.

Примечание. НТО – нетранслируемая область.

*Mutations encountered 2 times in the study group. #Mutation that occurs 9 times in the study group.

Note. UTR – untranslated region.

метиляции изучаемых генов микроРНК. Частота метилирования генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* в опухолевой ткани ДВККЛ составила 23, 55, 66 и 65 % соответственно.

Совместное выявление метилирования генов микроРНК и мутаций в *TP53* для каждого из образцов группы исследования представлено на рис. 3. Согласно полученным данным отсутствие метилирования хотя бы одного из изученных генов наблюдалось лишь в 11,0 % (15/136) случаев лимфомы, в подавляющем же большинстве образцов метилирование носило сочетанный характер. Так, в 24,3 % (33/136) случаев имело место метилирование 2, в 44,1 % (60/136) – 3 и в 11,1 % (15/136) – всех 4 проанализированных генов.

Вместе с тем метилирование анализируемых генов p53-респонсивных микроРНК и абберации в гене *TP53* в опухолевой ткани больных ДВККЛ, напротив, носили независимый характер с тенденцией к взаимному исключению (табл. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Участие микроРНК в лимфогенезе подтверждено в ходе моделирования новообразований на животных. Абберантная их экспрессия не только инициирует развитие, но и способствует увеличению темпов опухолевой прогрессии злокачественных лимфом [9]. При этом увеличивается число исследований, показывающих важную роль микроРНК в функционировании сигнального пути белка p53 [16].

Таблица 3. Анализ патогенности выявленных миссенс-мутаций в гене *TP53* с помощью онлайн-программы Polyphen2

Table 3. Analysis of the identified *TP53* gene missense mutations pathogenicity using the Polyphen2 online program

Мутация Mutation	Прогноз Prognosis	Уровень патогенности Pathogenicity level
p.SL130F	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SW146R	Непатогенная Non-pathogenic	0,01
p.ST155I	Патогенная Pathogenic	0,99
p.SR156C	Непатогенная Non-pathogenic	0,02
p.SM160V	Вероятно патогенная Probably pathogenic	0,41
p.SV173L	Патогенная Pathogenic	0,98
p.SH178D	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SR196Q	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SV197G	Патогенная Pathogenic	1,00
p.ST211S	Непатогенная Non-pathogenic	0,17
p.SV218A	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SG244S	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SR249S	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SV272E	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SR273C	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SA276V	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SE285Q	Патогенная Pathogenic	1,00
p.SG293R	Непатогенная Non-pathogenic	0,02

Ранее нами проводился анализ мутационного профиля *TP53* и статуса метилирования генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* в небольшой группе ($n = 73$) образцов ДВККЛ [17]. Было показано, что метилирование анализируемых генов р53-репсонсивных микроРНК и мутации *TP53* в опухолевой ткани

ДВККЛ у большей части пациентов имели тенденцию к взаимному исключению.

Настоящее исследование позволило уточнить частоты анализируемых ранее молекулярно-генетических нарушений и расширить их спектр. На выборке из 136 образцов ДНК, выделенной из опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ, выполнен комплексный анализ механизмов, нарушающих экспрессию микроРНК-34а, -4б, -34с, -129 и -203, а именно: метилирования генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203*, а также мутационного статуса и разрушения сигнала полиаденилирования гена *TP53*.

Показано, что метилирование анализируемых генов микроРНК является распространенным событием при ДВККЛ. Отсутствие метилирования хотя бы одного из изученных генов имело место лишь в каждом 10-м случае лимфомы. Частота метилирования *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* в опухолевой ткани лимфомы составила 23, 55, 66 и 65 % соответственно, что согласуется с полученными ранее данными [17].

В подавляющем большинстве опухолевых образцов метилирование носило сочетанный характер. Установлено, что даже с учетом поправки на множественность сравнений метилирование *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2*, а также *MIR-34B/C* и *MIR-34A* при лимфоме достоверно коррелирует друг с другом.

Можно предположить, что сочетанное метилирование данных генов при ДВККЛ является механизмом, который потенциально дерегулирует несколько функционально связанных генов, вовлеченных в отдельный путь патогенеза опухоли, и/или затрагивает сразу несколько путей лимфогенеза, а следовательно, имеет более выраженный проопухолевый эффект. Это подтверждается функциональной ассоциацией микроРНК семейства miR-34, микроРНК-129 и микроРНК-203 за счет наличия у них общих мишеней [8, 9, 17]. В данной работе показано, что абберации, приводящие к функциональному дефициту *TP53*, обнаруживаются в каждом 5-м образце ДВККЛ. При этом разрушение сигнала полиаденилирования составило 17,0 % данных аббераций.

Поскольку большая часть выявленных в анализируемой выборке образцов лимфомы мутаций приходится на ДНК-связывающий домен, обеспечивающий регуляцию генов-мишеней белка р53, они могут вызывать нарушение экспрессии микроРНК-129 и микроРНК семейства miR-34.

В отличие от последних, экспрессия микроРНК-203 регулируется белком р53 на посттранскрипционном уровне путем ускорения процессинга ее в ядре. В этой связи интересны данные о том, что транскрипционно неактивные мутантные варианты р53, например, выявленная в группе исследования мутация в «горячем» кодоне гена *TP53* p.SR273, могут препятствовать функциональной сборке белкового комплекса в составе с Drosha [18].

Таблица 4. Связь мутаций, выявленных в кодирующей части гена *TP53*, со злокачественными опухолямиTable 4. Association of mutations detected in the coding part of the *TP53* gene with malignant tumors

Мутация Mutation	Экзон Exon	Злокачественное новообразование Malignant neoplasm
p.SL130F	5	Опухоли эпителиальных тканей и центральной нервной системы Tumors of epithelial tissues and central nervous system
p.SW146R	5	Диффузная В-крупноклеточная лимфома Diffuse large B-cell lymphoma
p.ST155I	5	Хронический лимфолейкоз, НК/Т-клеточная лимфома Chronic lymphocytic leukemia, NK/T-cell lymphoma
p.SR156C	5	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukemia
p.SM160V	5	Опухоли эпителиальных тканей Tumors of epithelial tissues
p.SV173L	5	Хронический лимфолейкоз, диффузная В-крупноклеточная лимфома Chronic lymphocytic leukemia, diffuse large B-cell lymphoma
p.SH178D	5	Опухоли эпителиальных тканей Tumors of epithelial tissues
p.SR196Q	6	Острый миелоидный лейкоз, аденокарцинома прямой кишки, меланома радужки, плоскоклеточная карцинома тимуса Acute myeloid leukemia, rectal adenocarcinoma, iris melanoma, thymic squamous cell carcinoma
p.SV197G	6	Т-клеточная лимфома, плоскоклеточная карцинома легких, карцинома почки T-cell lymphoma, squamous cell carcinoma of the lung, carcinoma of the kidney
p.ST211S	6	Опухоли эпителиальных тканей Tumors of epithelial tissues
p.SV218A	6	Опухоли эпителиальных тканей Tumors of epithelial tissues
p.SG244S	7	Опухоли эпителиальных тканей Tumors of epithelial tissues
p.SR249S	7	Хронический лимфолейкоз, гепатоцеллюлярная карцинома, аденокарцинома толстой кишки Chronic lymphocytic leukemia, hepatocellular carcinoma, colon adenocarcinoma
p.SV272E	8	Диффузная В-крупноклеточная лимфома Diffuse large B-cell lymphoma
p.SR273C	8	Опухоли центральной нервной системы, хронический лимфолейкоз, мантийноклеточная лимфома, диффузная В-крупноклеточная лимфома Central nervous system tumors, chronic lymphocytic leukemia, mantle cell lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma
p.SA276V	8	Опухоли эпителиальных тканей Tumors of epithelial tissues
p.SE285Q	8	Опухоли эпителиальных тканей, тератома яичника Tumors of epithelial tissues, ovarian teratoma
p.SG293R	8	Опухоли эпителиальных тканей Tumors of epithelial tissues

В целом было показано, что в ряде случаев метилирование *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34B/C* и *MIR-34A* и аберрации гена *TP53* в опухолевой ткани ДВККЛ сочетаются. Однако в большинстве образцов они не только являются независимыми событиями, но и имеют склонность к взаимному исключению.

Вероятно, как аберраций *TP53* (мутаций или разрушения сигнала полиаденилирования), так и метилирования генов изучаемых микроРНК может быть доста-

точно для нарушения регуляторной сети белка p53 при лимфоме (рис. 4). Данное предположение подкрепляется наличием положительных обратных связей между p53 и активируемыми им молекулами. Например, микроРНК-34a участвует в стабилизации белка путем нацеливания на деацетилазу SIRT1 [9].

Наконец, высокая частота выявления опухолеспецифичного метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34B/C* и *MIR-34A* при ДВККЛ указывает

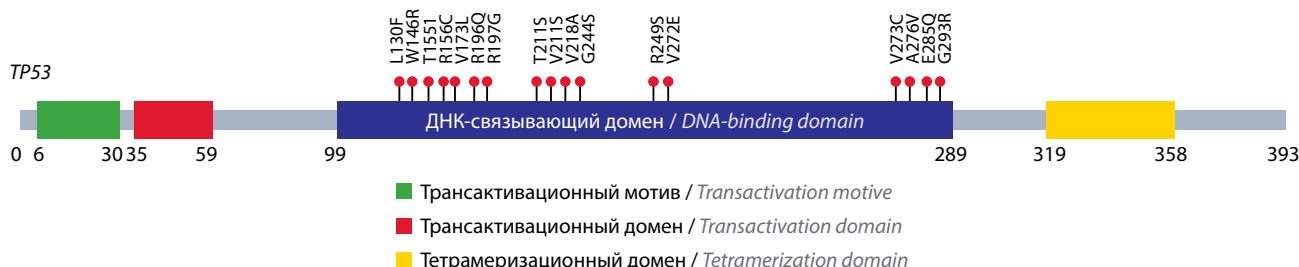


Рис. 2. Распределение миссенс-мутаций в гене TP53, выявленных в группе исследования
Fig. 2. Distribution of missense mutations in the TP53 gene identified in the study group



Рис. 3. Метилирование генов MIR-203, MIR-129–2, MIR-34A и MIR-34B/C и aberrации (разрушение сигнала полиадеилирования и мутации) в гене TP53 в опухолевой ткани больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Случаи с метилированием и aberrациями выделены розовым цветом
Fig. 3. MIR-203, MIR-129–2, MIR-34A and MIR-34B/C genes methylation and aberrations (destruction of polyadenylation and mutation signal) in the TP53 gene in the tumor tissue of diffuse B-large cell lymphoma patients. Cases with methylation and aberrations are highlighted in pink

Таблица 5. Анализ сочетанного выявления aberrаций в гене TP53 и метилирования генов изучаемых p53-респонсивных микроРНК
Table 5. Analysis of combined detection of TP53 gene aberrations and studied p53-responsive miRNAs genes methylation

Ген 1 Gene 1	Ген 2 Gene2	Частота сочетанного выявления, абс. Frequency of combined detection, abs.	Log2 Odds Ratio	p-value	q-value	Связь Tendency
MIR-34A	MIR-34B/C	26	2,571	<0,001	0,001	Сочетание Co-occurrence
MIR-129-2	MIR-203	68	1,880	<0,001	0,002	Сочетание Co-occurrence
MIR-34B/C	MIR-129-2	58	1,723	0,001	0,002	Сочетание Co-occurrence
MIR-34B/C	MIR-203	57	1,426	0,006	0,009	Сочетание Co-occurrence
MIR-34A	MIR-203	22	0,411	0,339	0,407	Сочетание Co-occurrence
MIR-34A	MIR-129-2	21	0,192	0,468	0,468	Сочетание Co-occurrence
MIR-34A	TP53	5	-0,624	0,297	0,424	Взаимное исключение Mutual exclusivity
MIR-129-2	TP53	18	-0,269	0,412	0,458	Взаимное исключение Mutual exclusivity
MIR-34B/C	TP53	14	-0,507	0,264	0,424	Взаимное исключение Mutual exclusivity
MIR-203	TP53	17	-0,600	0,225	0,424	Взаимное исключение Mutual exclusivity

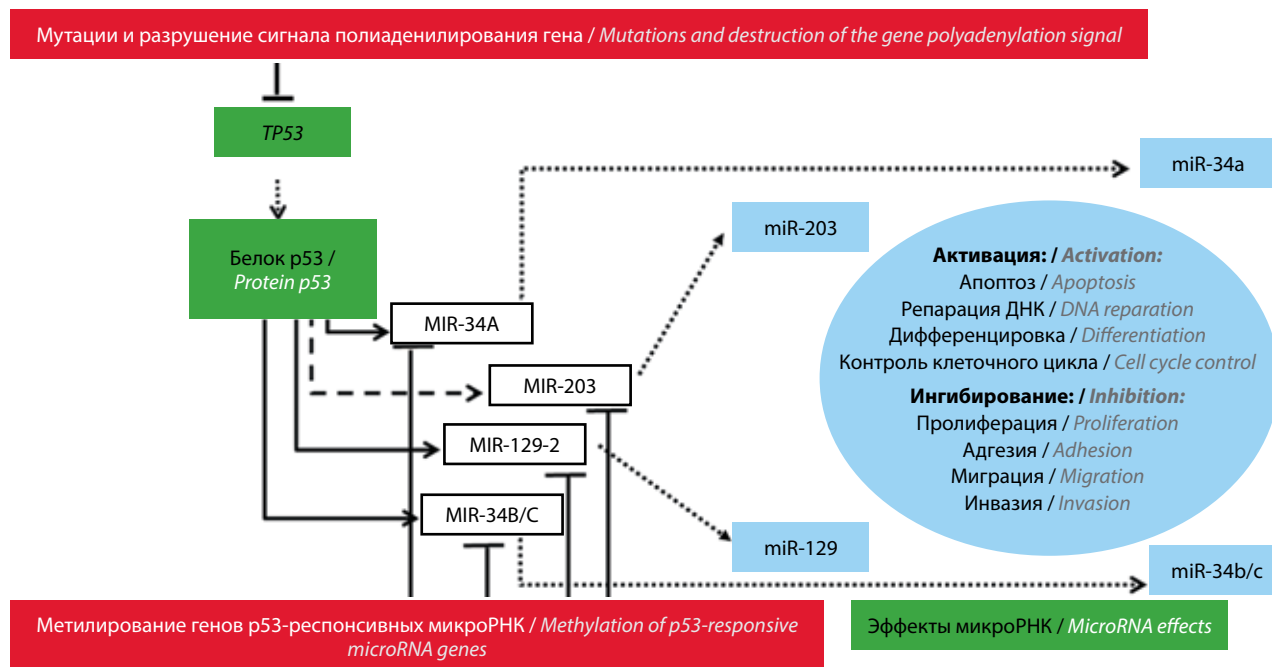


Рис. 4. Механизмы нарушения экспрессии p53-респонсивных микроРНК
Fig. 4. Mechanisms of impaired expression of p53-responsive microRNAs

на необходимость их дальнейшего изучения в качестве потенциальных мишеней для таргетной терапии данной опухоли. Возможными направлениями могут быть использование ингибиторов метилирования ДНК, таких как производные 5-азациитидина, которые уже одобрены для лечения отдельных злокачественных новообразований крови, и синтетические аналоги микроРНК. Последние после попадания в клетку включаются в эффекторный комплекс, функционально замещают дерегулированные эндогенные микроРНК и восстанавливают сигнальные пути, функционирующие в норме [9, 19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, метилирование генов микроРНК *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* является биомаркером для дифференциальной диагностики ДВККЛ и реактивных изменений в лимфатических узлах. Наряду с абберациями в гене *TP53* абберантное метилирование может быть частой независимой причиной снижения экспрессии микроРНК семейства *mir-34*, микроРНК-129 и микроРНК-203 при ДВККЛ, что указывает на необходимость дальнейшего изучения таргетных подходов лечения данной патологии, основанных на эпигенетических механизмах.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Donehower L.A., Soussi T., Korkut A. et al. Integrated analysis of *TP53* gene and pathway alterations in the cancer genome atlas. *Cell Rep* 2019;28(5):1370–84. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.07.001
- Cortez M.A., Ivan C., Valdecanas D. et al. PDL1 regulation by p53 via miR-34. *J Natl Cancer Inst* 2016;108(1):djv303. DOI: 10.1093/jnci/djv303
- Robles A.I., Harris C.C. Clinical outcomes and correlates of *TP53* mutations and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2(3):a001016. DOI: 10.1101/cshperspect.a001016
- Lu T.X., Young K.H., Xu W., Li J.Y. *TP53* dysfunction in diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016;97:47–55. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.08.006
- Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Воевода М.И., Максимов В.Н. Результаты комплексного анализа статуса гена *TP53* у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. *Гематология и трансфузиология* 2016; 61(3):138–43. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-138-143
- Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Voevoda M.I., Maksimov V.N. The results of comprehensive analysis of *TP53* gene status in patients with diffuse large cell lymphoma. *Gematologiya i transfusiologiya = Hematology and Transfusiology* 2016;61(3):138–43. (In Russ.). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-138-143
- Arribas A.J., Gómez-Abad C., Sánchez-Beato M. et al. Splenic marginal zone lymphoma: comprehensive analysis of gene expression and miRNA profiling. *Mod Pathol* 2013;26(7):889–901. DOI: 10.1038/modpathol.2012.220
- Craig V.J., Cogliatti S.B., Rehrauer H. et al. Epigenetic silencing of microRNA-203 dysregulates ABL1 expression and drives Helicobacter-associated gastric lymphomagenesis. *Cancer Res* 2011;71(10):3616–24. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3907
- Воропаева Е.Н., Березина О.В., Чуркина М.И. и др. Абберантная экспрессия и метилирование генов отдельных микроРНК при лимфопролиферативных заболеваниях: обзор литературы. *J of Siberian Medical Sciences* 2021;4:108–33. DOI: 10.31549/2542-1174-2021-4-108-133

- Voropaeva E.N., Berezina O.V., Churkina M.I. et al. Aberrant expression and methylation of individual microRNAs genes in lymphoproliferative diseases: a literature review. *Journal of Siberian Medical Sciences* 2021;4:108–33. (In Russ.). DOI: 10.31549/2542-1174-2021-4-108-133
9. Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Березина О.В. и др. Метилирование генов p53-респонзивных онкосупрессорных микроРНК при гемобластозах. *Сибирский онкологический журнал* 2022;21(2):130–42. DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-2-130-142
- Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Berezina O.V. et al. Methylation of p53-responsive oncosuppressive microRNA genes in hemoblastosis. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2022;21(2):130–42. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-2-130-142
10. Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Воевода М.И. и др. Обнаружение полиморфизма rs78378222 гена *TP53* в опухолевой ткани больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. *Сибирский научный медицинский журнал* 2016;36(5):20–7. DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-2-130-142
- Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Voevoda M.I. et al. Detection of the rs78378222 polymorphism of the *TP53* gene in the tumor tissue of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal* 2016;36(5):20–7. (In Russ.).
11. Asmar F., Hother C., Kulosman G. et al. Diffuse large B-cell lymphoma with combined *TP53* mutation and *MIR34A* methylation: another “double hit” lymphoma with very poor outcome? *Oncotarget* 2014;5:1912–25. DOI: 10.18632/oncotarget.1877
12. Chim C.S., Wong K.Y. Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies. *J Cell Mol Med* 2011;15(12):2760–7. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01274.x
13. Wong K.Y., Kim R.L.H., Wong Y.L. et al. Epigenetic inactivation of the *MIR129-2* in hematological malignancies. *J Hematol Oncol* 2013;6:16. DOI: 10.1186/1756-8722-6-16
14. Gao J., Aksoy B.A., Dogrusoz U. et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013;6(269):pl1. DOI: 10.1126/scisignal.2004088
15. Jay J.J., Brouwer C. Lollipops in the clinic: information dense mutation plots for precision medicine. *PLoS One* 2016;11(8):e0160519. DOI: 10.1371/journal.pone.0160519
16. Piovon C., Palmieri D., Di Leva G. et al. Oncosuppressive role of p53-induced miR-205 in triple negative breast cancer. *Mol Oncol* 2012;6(4):458–72. DOI: 10.1016/j.molonc.2012.03.003
17. Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Чуркина М.И. и др. Комплексный анализ метилирования генов p53-респонзивных микроРНК и мутаций гена *TP53* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. *Медицинская генетика* 2022;21(11):62–6. DOI: 10.25557/2073-7998.2022.11.62-66
- Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Churkina M.I. et al. Complex analysis of p53-responsive microRNA genes methylation and *TP53* gene mutations in diffuse large B-cell Lymphoma. *Medicinskaya genetika = Medical Genetics* 2022;21(11):62–6. (In Russ.). DOI: 10.25557/2073-7998.2022.11.62-66
18. Solé C., Larrea E., Di P.G. et al. miRNAs in B-cell lymphoma: molecular mechanisms and biomarker potential. *Cancer Lett* 2017;405:79–89. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.07.020
19. Ивкин Д.Ю., Лисицкий Д.С., Захаров Е.А. и др. МикроРНК как перспективные диагностические и фармакологические агенты. *Астраханский медицинский журнал* 2015;4:8–25. DOI: 10.25557/2073-7998.2022.11.62-66
- Ivkin D.Yu., Lisitsky D.S., Zakharov E.A. et al. MicroRNAs as promising diagnostic and pharmacological agents. *Astrahanskij medicinskij zhurnal = Astrakhan Medical Journal* 2015;4:8–25. (In Russ.).

Вклад авторов

Е.Н. Воропаева: разработка концепции и дизайна исследования, сбор и обработка материала, написание чернового варианта статьи, редактирование;

Т.И. Поспелова, В.Н. Максимов: участие в разработке концепции, дизайна исследования, научное редактирование, редактирование;

О.Б. Березина, М.И. Чуркина, А.А. Гуражева: сбор и обработка материала, выполнение лабораторных исследований, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contribution

E.N. Voropaeva: development of the concept and design of research, collection and processing of material, writing a draft version of the article, editing;

T.I. Pospelova, V.N. Maksimov: participation in the development of the concept, design of research, scientific editing, editing;

O.B. Berezina, M.I. Churkina, A.A. Gurazheva: collection and processing of the material, performing laboratory tests, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID authors

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

Т.И. Поспелова / T.I. Pospelova: <https://orcid.org/0000-0002-1261-5470>

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

А.А. Гуражева / A.A. Gurazheva: <https://orcid.org/0000-0003-1547-624X>

О.В. Березина / O.V. Berezina: <https://orcid.org/0000-0003-4584-658X>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-00222).

Funding. The research was supported by the Russian Science Found (grant No. 22-25-00222).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 129 от 30 ноября 2020 г.).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with the rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the Novosibirsk State Medical University of the Ministry of Health of Russia (protocol No. 129, November 30, 2020).

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

Статья поступила: 01.03.2023. **Принята к публикации:** 21.07.2023.

Article submitted: 01.03.2023. **Accepted for publication:** 21.07.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-82-89



Экспрессия белков цитоскелета – цитокератинов и бета-III тубулина в клетках культур меланомы человека из коллекции НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина

Т.А. Богуш, И.Э. Мизаева, А.А. Башарина, А.Н. Гришанина, М.А. Барышникова, О.С. Бурова, А.А. Рудакова, В.С. Косоруков

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

Контакты: Анна Александровна Башарина basharinaa@inbox.ru

Введение. Несмотря на достижения в лечении меланомы, результаты терапии нельзя признать удовлетворительными, и поиск новых препаратов и эффективных комбинаций лекарств продолжается. Разрабатываются препараты, направленные на снижение метастатического потенциала опухолей, – мигростатики. Точкой приложения этой группы препаратов могут являться белки цитоскелета опухолевой клетки, к которым относятся промежуточные филаменты – цитокератины (ЦК) и белок микротрубочек бета-III тубулин (TUBB3).

Цель исследования – формирование панели культур клеток меланомы с охарактеризованной экспрессией ЦК и TUBB3 для создания информативной клеточной модели *in vitro* для скрининга и изучения мигростатиков.

Материалы и методы. Исследован молекулярный фенотип 21 культуры клеток меланомы из коллекции клеточных линий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, из которых 18 культур получены из метастазов опухоли в лимфатические узлы, мягкие ткани или подкожно. Оценка уровня экспрессии TUBB3 и *de novo* экспрессии ЦК в клетках, экспрессирующих виментин (Вим) (ЦК + Вим), проведена иммунофлуоресцентным методом, ассоциированным с проточной цитометрией.

Результаты. Экспрессия TUBB3 выявлена во всех исследованных культурах, *de novo* экспрессия ЦК – в 20 из 21 культуры. Исключение составила первичная увеальная меланома 92-1, не экспрессирующая ЦК + Вим. Оба показателя значительно различались между клетками исследованной панели: коэкспрессия ЦК + Вим – от 0 до 91 %, TUBB3 – от 18 до 86 %. Корреляции между уровнями экспрессии TUBB3 и ЦК + Вим не выявлено (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,11$; $p = 0,65$). Выделены 3 группы культур клеток с разным соотношением уровня экспрессии TUBB3 и коэкспрессии ЦК + Вим: 1) сходный уровень показателей экспрессии маркеров; 2) уровень коэкспрессии ЦК + Вим в большей или меньшей степени превышает показатель для TUBB3; 3) уровень экспрессии TUBB3 в разной степени превышает показатель коэкспрессии ЦК + Вим.

Заключение. Сформирована панель из 21 культуры клеток меланомы человека, в которых количественно охарактеризована экспрессия ЦК и TUBB3 – белков цитоскелета, ответственных за миграционную активность опухолевых клеток. Группы культур с разным соотношением показателей экспрессии этих маркеров могут быть использованы для скрининга и доклинической оценки потенциальных мигростатиков, которые уменьшают метастатический потенциал меланомы и могут снижать резистентность к таксанам.

Ключевые слова: культуры клеток меланомы человека, бета-III тубулин, цитокератины, мигростатики, цитостатики, панель клеток

Для цитирования: Богуш Т.А., Мизаева И.Э., Башарина А.А. и др. Экспрессия белков цитоскелета – цитокератинов и бета-III тубулина в клетках культур меланомы человека из коллекции НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(3):82–9. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-82-89

Expression of the cytoskeletal proteins – cytokeratins and beta-III tubulin in human melanoma cell lines from the collection of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology

T.A. Bogush, I.E. Mizaeva, A.A. Basharina, A.N. Grishanina, M.A. Baryshnikova, O.S. Burova, A.A. Rudakova, V.S. Kosorukov

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

Contacts: Anna Aleksandrovna Basharina *basharinaa@inbox.ru*

Introduction. Despite advances in the treatment of melanoma, the results of therapy cannot be considered satisfactory, and the search for new drugs and effective combinations of medicine continues. The drugs are being developed aimed at reducing the metastatic tumor potential – migrastatics. The targets of the drugs can be cytoskeletal proteins of tumor cells – cytokeratin (CK) intermediate filaments and microtubule protein beta-III tubulin (TUBB3).

Aim. To estimate of the CK and TUBB3 expression in melanoma cell lines to form an informative *in vitro* cell model for screening and studying migrastatics.

Materials and methods. The molecular phenotype of 21 human melanoma cell lines from the collection of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, and 18 of which were isolated from tumor metastases in the lymph nodes, soft tissues or subcutaneously. The level of TUBB3 expression and *de novo* expression of CKs in vimentin-expressing cells (CK + Vim) were assessed by an immunofluorescent method and flow cytometry.

Results. Beta-III tubulin expression was detected in all cultures studied, *de novo* expression of CKs was found in 20/21 lines. The exception was primary uveal melanoma 92-1, that did not express CK + Vim. Both parameters significantly differed between the cells of the studied panel: CK + Vim co-expression – from 0 to 91 %, TUBB3 – from 18 to 86 %. No correlation was found between the expression level of TUBB3 and CK + Vim (Pearson's correlation coefficient $r = 0.11$; $p = 0.65$). Three groups of the cell lines with different ratio of TUBB3 expression and CK + Vim co-expression were identified: 1) similar level of expression of both markers; 2) the level of co-expression of CK + Vim more or less high than the index for TUBB3; 3) the level of TUBB3 expression more or less high than the index for CK + Vim co-expression.

Conclusion. A panel of 21 human melanoma cell lines was formed with quantitatively estimated expression of cytoskeletal proteins responsible for the migration activity of tumor cells – CKs and TUBB3. Groups of the lines with different expression ratio of the markers can be used for screening and preclinical evaluation potential migrastatics that reduce the metastatic potential of melanoma and may reduce resistance to taxanes.

Keywords: human melanoma cell lines, beta-III tubulin, cytokeratins, migrastatics, cytostatics, cell panel

For citation: Bogush T.A., Mizaeva I.E., Basharina A.A. et al. Expression of the cytoskeletal proteins – cytokeratins and beta-III tubulin in human melanoma cell lines from the collection of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(3):82–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-82-89

ВВЕДЕНИЕ

Меланома – агрессивное злокачественное новообразование, которое характеризуется высокой частотой метастазирования даже при небольшом размере первичного очага. Несмотря на достижения в лечении этого заболевания, результаты терапии нельзя признать удовлетворительными, и поиск новых препаратов и эффективных комбинаций лекарств продолжается [1]. В частности, разрабатываются препараты, направленные на снижение метастатического потенциала опухолей, – так называемые мигростатики [2, 3].

Важнейшей потенциальной точкой приложения этой группы лекарств являются белки цитоскелета опухолевой клетки, к которым относятся промежуточные филаменты цитокератины (ЦК) и белок микротрубочек бета-III тубулин (TUBB3).

Цитокератины являются облигатным маркером эпителиальных новообразований, однако их экспрессия обнаружена и в клетках меланомы, экспрессирующих виментин (Вим). При этом в фундаментальных исследованиях на культурах клеток показано, что *de novo* экспрессия ЦК увеличивает динамическую активность клеток меланомы, а именно повышает скорость миграции клеток через поры мембраны [4, 5] и инвазии через матригель [4–6]. Напротив, нокдаун ЦК в культуре клеток меланомы уменьшает скорость инвазии через матригель, а также заживления раны [7].

В клинических исследованиях продемонстрировано, что высокий уровень экспрессии матричной РНК

ЦК коррелирует с поздней стадией заболевания и низкими показателями общей выживаемости больных меланомой [8]. Более того, экспрессия ЦК чаще выявляется в метастатических меланомах и потому рассматривается как показатель дедифференцировки этого новообразования [9–12].

Что касается белка микротрубочек TUBB3, который конститутивно экспрессируется в ткани меланомы, его ингибирование в клетках культур меланомы приводит к нарушению динамики микротрубочек и снижает метастатический потенциал опухолевых клеток [13, 14]. При этом в клинических исследованиях показано, что снижение уровня экспрессии TUBB3 в опухоли является неблагоприятным фактором прогноза и коррелирует с худшими показателями безрецидивной и общей выживаемости [15, 16].

Важнейшая биологическая характеристика TUBB3 заключается в том, что этот белок в опухолях разного генеза является мишенью противоопухолевых препаратов из группы таксанов. Гиперэкспрессия TUBB3 ассоциирована с резистентностью к этим лекарственным средствам, тогда как при ингибировании TUBB3 чувствительность опухолей к таксанам восстанавливается [17].

Целью исследования явилось формирование панели культур клеток меланомы с охарактеризованной экспрессией этих важнейших белков цитоскелета – ЦК и TUBB3 для создания информативной клеточной модели *in vitro* для скрининга и изучения соединений,

ингибирующих метастатический потенциал опухолей и резистентность к противоопухолевым таксанам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток меланомы. В работе исследована 21 культура клеток меланомы из коллекции клеточных линий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Три культуры клеток меланомы получены из первичного опухолевого узла: 92-1 – увеальная меланома; Mel May и A-375 – меланома кожи. Культуры клеток Mel H, Mel Cher, Mel Si, A-052, Mel Rac, Mel II, Mel Bgf, Mel Hn, Mel Gi, Mel Gus, Mel Me, Mel Ibr, Mel Mtp, Mel Ch, Mel Ki, Mel Kor, A-875 и Mel R получены из метастазов меланомы кожи в лимфатические узлы, мягкие ткани или подкожно.

Клетки культивировали в среде RPMI-1640 («Панэко») с 10 % телячьей эмбриональной сывороткой (Biosera) в инкубаторе при +37 °C в атмосфере 5 % CO₂. В экспериментах использовали клетки сформированного монослоя.

Клетки инкубировали в течение 15 мин при 37 °C в растворе Версена («Панэко»), снимали с подложки, суспендировали, осаждали центрифугированием при 1000 оборотах в течение 5 мин при комнатной температуре. В полученном осадке клетки фиксировали 4 % раствором формальдегида (pH 7,4).

Иммунофлуоресцентный анализ и проточная цитометрия. Оценку экспрессии TUBB3 проводили с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии [18]. Кратко, одноклеточную суспензию инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре в темноте с первичными моноклональными антителами к TUBB3 (клон EP1569Y, Abcam) в конечном разведении 1: 8000. После однократной отмывки 20-кратным объемом 0,5 % раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA) добавляли вторичные антитела, конъюгированные с DyLight 650 (ab98729, Abcam) в конечном разведении 1: 500, и инкубировали в течение 1,5 ч при +4 °C в темноте. Далее клетки инкубировали в течение 15 мин с ДНК-красителем Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) для дальнейшего удаления из анализа дебриса и конгломератов клеток. Анализ проводили после двукратной отмывки 20-кратным объемом 0,5 % раствора BSA.

Специфическая флуоресценция клеток рассчитана в программе FlowJo v.10.0.8 с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Оценивали уровень экспрессии TUBB3 (в процентах): число специфически флуоресцирующих клеток относительно контроля (инкубация клеток только с вторичными антителами). Различия в величине показателей экспрессии маркеров в повторных экспериментах на одной и той же культуре клеток не превысили 5 %, поэтому в иллюстративный материал включены результаты одного из типичных экспериментов.

Для оценки *de novo* экспрессии ЦК в клетках культуры меланом использован ассоциированный с проточ-

ной цитометрией метод двойного иммунофлуоресцентного окрашивания, разработанный в нашей лаборатории [19]. Кратко, одноклеточную суспензию клеток инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте с первичными моноклональными антителами к ЦК 5/6/8/17/19 (клон MNF116, DAKO). После однократной отмывки 20-кратным объемом 0,5 % раствора BSA к клеткам добавляли антитела к мезенхимальному белку Вим (клон SP20, Bioss) и инкубировали в тех же условиях. Конечное разведение обоих первичных антител – 1: 2000. По завершении инкубации клетки отмывали 20-кратным объемом 0,5 % раствора BSA, одноклеточную суспензию клеток инкубировали в течение 1,5 ч при +4 °C в темноте с двумя вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом DyLight 488 (ab96871, Abcam) или DyLight 650 (ab98729, Abcam) в конечном разведении 1: 240 и 1: 500 соответственно. Далее клетки инкубировали в течение 15 мин с ДНК-красителем Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) для дальнейшего удаления из анализа дебриса и конгломератов клеток. Анализ проводили после двукратной отмывки 20-кратным объемом 0,5 % раствора BSA. Уровень *de novo* экспрессии ЦК определяли как отношение (%) числа клеток, коэкспрессирующих ЦК и Вим, к общему числу опухолевых клеток, экспрессирующих Вим.

Флуоресценцию клеток измеряли на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter). Для визуализации распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции использовали гистограммы и точечные диаграммы, построенные в программе WinMDI 2.9.

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка данных проведена с помощью программы GraphPad Prism 9.2 (GraphPad Software). Нормальность распределения образцов по уровню экспрессии маркеров оценена с помощью критерия Шапиро–Уилка. Коэффициент корреляции Пирсона использован для оценки ассоциативной связи между показателями экспрессии TUBB3 и ЦК. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Количественные показатели уровня *de novo* экспрессии цитокератинов и бета-III тубулина в культурах клеток меланомы. Результаты количественной оценки уровня *de novo* экспрессии ЦК и белка TUBB3 в клетках 21 культуры меланомы представлены на рис. 1 и в таблице. Видно, что оба показателя значительно различаются между клетками исследуемой панели: коэкспрессия ЦК и Вим (ЦК + Вим) – от 0 до 91 %, TUBB3 – от 18 до 86 %. Важно отметить, что коэкспрессия ЦК + Вим выявлена во всех 18 культурах клеток метастатической меланомы и в 2 из 3 культур первичной меланомы. *De novo* экспрессия ЦК не обнаружена только в первичной увеальной меланоме. Иными словами, включенные в панель культуры, за исключением

одной, по этому показателю следует отнести к агрессивному типу опухолей.

Характер распределения показателей экспрессии маркеров в исследованной группе культур был нормальным, поэтому их сравнение проведено по средним значениям, которые оказались близкими: 53,2 и 57,4 % для ЦК + Вим и TUBB3 соответственно.

Достаточное для статистических оценок количество исследованных культур ($n = 21$) позволило нам ответить на фундаментально важный вопрос о наличии корреляции между уровнем коэкспрессии ЦК + Вим и экспрессией TUBB3 при сравнении показателей в одних и тех же клеточных культурах. С учетом нормальности распределения обоих показателей для этой цели использован метод Пирсона, который

не выявил корреляции, что указывает на отсутствие общих механизмов регуляции экспрессии этих опухолевых маркеров.

Подгруппы культур клеток меланомы с разным соотношением уровня коэкспрессии цитокератинов и виментина и экспрессии бета-III тубулина в одной и той же культуре. С учетом высокой гетерогенности исследуемой панели клеток меланом по уровню коэкспрессии ЦК + Вим и TUBB3, сформированы группы с разным соотношением показателей в одной и той же культуре (рис. 2).

Первая группа культур характеризуется сходным уровнем показателей экспрессии маркеров приблизительно от 40 до 80 %. Во 2-й группе клеток уровень коэкспрессии ЦК + Вим в большей или меньшей степени превышает показатель для TUBB3. В 3-й группе соотношение противоположное: уровень экспрессии TUBB3 в разной степени превышает показатель коэкспрессии ЦК + Вим. Интересна культура клеток первичной увеальной меланомы с высокой (65 %) экспрессией TUBB3 при отсутствии *de novo* экспрессии ЦК.

Примеры результатов, характеризующих культуры клеток меланомы по уровню коэкспрессии цитокератинов и виментина и экспрессии бета-III тубулина (иммунофлуоресцентный анализ и проточная цитометрия). Примеры реальных результатов иммунофлуоресцентного анализа, ассоциированного с проточной цитометрией, которые использованы для характеристики культур клеток меланомы по уровню коэкспрессии ЦК + Вим и экспрессии TUBB3, представлены на рис. 3. Приведены примеры культур с разным соотношением уровней экспрессии маркеров в разных подгруппах культур, включенных в клеточную панель (см. рис. 2).

Из 1-й подгруппы представлены результаты исследования культуры А-052 с высокой и приблизительно одинаковой экспрессией TUBB3 и коэкспрессией ЦК + Вим: 74 и 66 % соответственно. Из 2-й подгруппы продемонстрированы результаты исследования

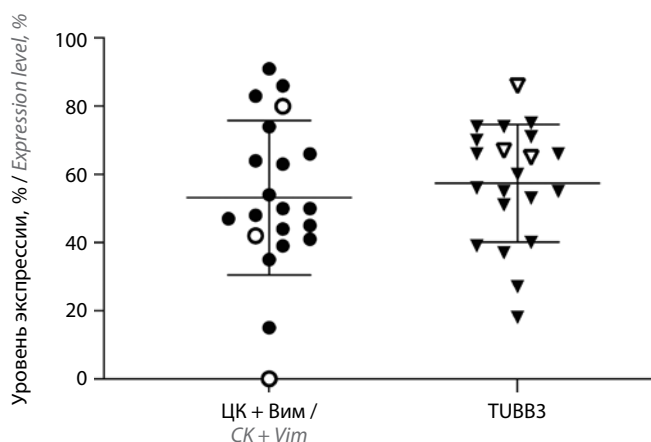


Рис. 1. Количественные показатели уровня коэкспрессии цитокератинов и виментина (ЦК + Вим) и экспрессии белка бета-III тубулина (TUBB3) в клетках 21 культуры меланомы. Белыми символами отмечены показатели уровня экспрессии маркеров в культурах клеток меланомы, полученных из первичных опухолей
Fig. 1. Quantitative data of cytokeratin and vimentin (CK + Vim) co-expression and beta-III tubulin expression in cells of 21 melanoma lines. White symbols indicate the levels of markers' expression in cell lines isolated from primary melanomas

Уровень коэкспрессии цитокератинов и виментина (ЦК + Вим) и экспрессии бета-III тубулина (TUBB3) в культурах клеток меланом ($n = 21$), %
 Level of cytokeratin and vimentin (CK + Vim) co-expression and beta-III tubulin (TUBB3) expression in melanoma cell lines ($n = 21$), %

Маркер Marker	$M \pm SD$	Me [Q1; Q3]	Min	Max	Проверка на нормальность распределения, p^* Normality test, p^*	Коэффициент корреляции Пирсона, r Pearson correlation coefficient, r
ЦК + Вим CK + Vim	$53,2 \pm 22,6$	50,0 [41,5; 70,0]	0,0	91,0	0,47	0,11; $p = 0,65$
TUBB3	$57,4 \pm 17,2$	60,0 [45,5; 70,5]	18,0	86,0	0,34	

*Нулевая гипотеза о нормальности распределения показателя в выборке, оцененная с помощью критерия Шапиро–Уилка (принималась при $p > 0,05$).

*The Shapiro–Wilk test was used to assess the null hypothesis about normality of the index distribution (it was accepted at $p > 0.05$).

Примечание. $M \pm SD$ – среднее арифметическое значение \pm стандартное отклонение; Me [Q1; Q3] – медиана [нижний квартиль; верхний квартиль]; min – минимальное значение; max – максимальное значение.

Note. $M \pm SD$ – arithmetic mean value \pm standard deviation; Me [Q1; Q3] – median [lower quartile; upper quartile]; min – minimum value; max – maximum value.

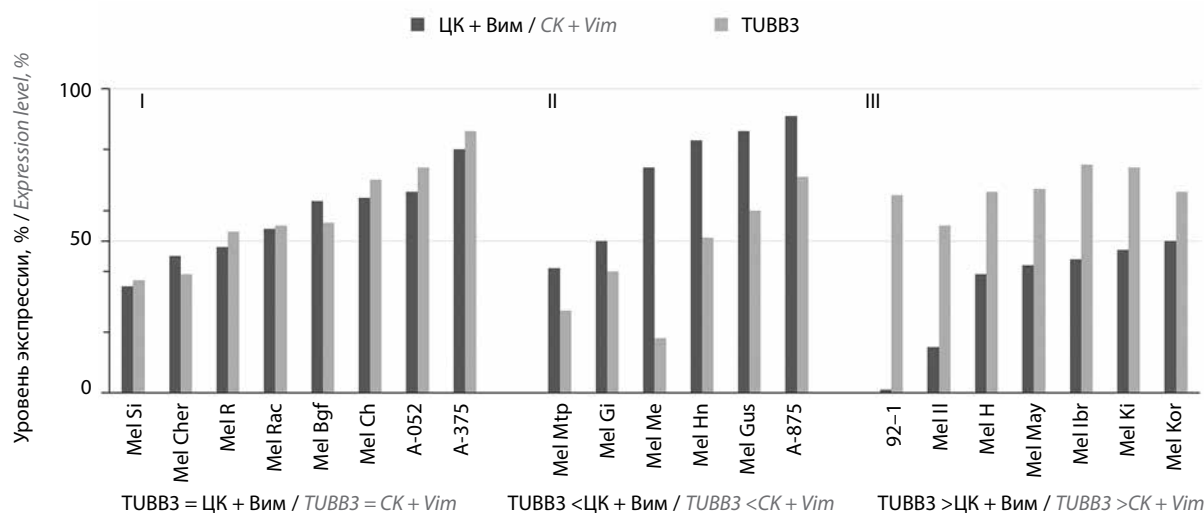


Рис. 2. Группы культур клеток меланомы с разным соотношением уровней коэкспрессии цитокератинов и виментина (ЦК + Вим) и экспрессии бета-III тубулина (TUBB3). Римскими цифрами обозначены номера групп

Fig. 2. Groups of melanoma cell cultures with different ratios of cytokeratin and vimentin (CK + Vim) co-expression and beta-III tubulin (TUBB3) expression. Roman numerals indicate group numbers

культуры Mel Me с низкой экспрессией TUBB3 (18 %) и высоким уровнем коэкспрессии ЦК + Вим (74 %). Из 3-й подгруппы представлены результаты для клеток линии Mel H, в которых высокий уровень экспрессии TUBB3 (66 %) сочетается с умеренным показателем коэкспрессии ЦК + Вим (39 %). От других культур отличалась культура клеток первичной увеальной меланомы 92-1, в которой при высоком уровне экспрессии TUBB3 (65 %) не выявлена *de novo* экспрессия ЦК.

Следует отметить важную деталь. При иммунофлуоресцентном окрашивании культур, представленных на рис. 3, отчетливо видна экспрессия специфического мезенхимального белка Вим во всех клетках (верхний левый квадрант в диаграммах «Вим»). В то же время уровень экспрессии ЦК в разных культурах различается, и в 100 % случаев *de novo* экспрессия ЦК выявляется в клетках меланомы только в коэкспрессии с конститутивным мезенхимальным белком Вим (верхний и нижний квадранты в диаграммах «ЦК + Вим»). Аналогичные результаты получены при исследовании всех культур, включенных в сформированную панель клеток меланомы.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время одним из трендов, направленных на повышение эффективности лекарственной терапии опухолей разного генеза, в том числе меланом, является разработка новых классов противоопухолевых препаратов, в частности так называемых мигростатиков, нацеленных на снижение метастатического потенциала опухолевых клеток [2]. Отметим, что скрининг химических соединений — потенциальных претендентов на создание новых лекарств — начинается с экспериментов *in vitro*, поэтому формирование панелей клеточных культур разного генеза, охарактеризованных по экспрессии тех или иных

мишеней новых препаратов, является неотъемлемой частью подобного рода исследований.

В работе сформирована панель клеточных культур меланомы, которые охарактеризованы по количественным показателям экспрессии важнейшей потенциальной точки приложения мигростатиков — промежуточных филаментов ЦК и белка микротрубочек TUBB3. Согласно результатам фундаментальных исследований, экспрессия ЦК увеличивает миграционную активность клеток меланомы *in vitro* [4–7], а в клинических исследованиях показано, что *de novo* экспрессия ЦК в клетках меланомы повышает агрессивность течения этого заболевания [8, 9]. Что касается белка TUBB3, уже получены экспериментальные данные, согласно которым препараты, нацеленные на микротрубочки, могут быть использованы как мигростатики [20, 21], и эффективность некоторых из них уже оценивается в клинических исследованиях [22].

De novo экспрессия ЦК выявлена в 20 культурах клеток из 21 культуры меланом, из которых 18 культур получены из метастазов опухоли в лимфатические узлы, мягкие ткани или подкожно. И только в культуре 92-1, полученной из первичной увеальной меланомы, ЦК не экспрессировались. Следует отметить, что ЦК выявлены в клетках меланомы только в коэкспрессии с конститутивным белком меланомы Вим. По уровню коэкспрессии ЦК + Вим клетки различались значительно, и это позволяет использовать пары культур «высокая экспрессия маркера — низкая экспрессия маркера» для выявления как ингибирующего, так и стимулирующего воздействия на экспрессию ЦК при скрининге и изучении новых мигростатиков.

Что касается белка TUBB3, его экспрессия, как и Вим, выявлена в 100 % исследованных культур меланомы. При этом в сформированную панель вошли

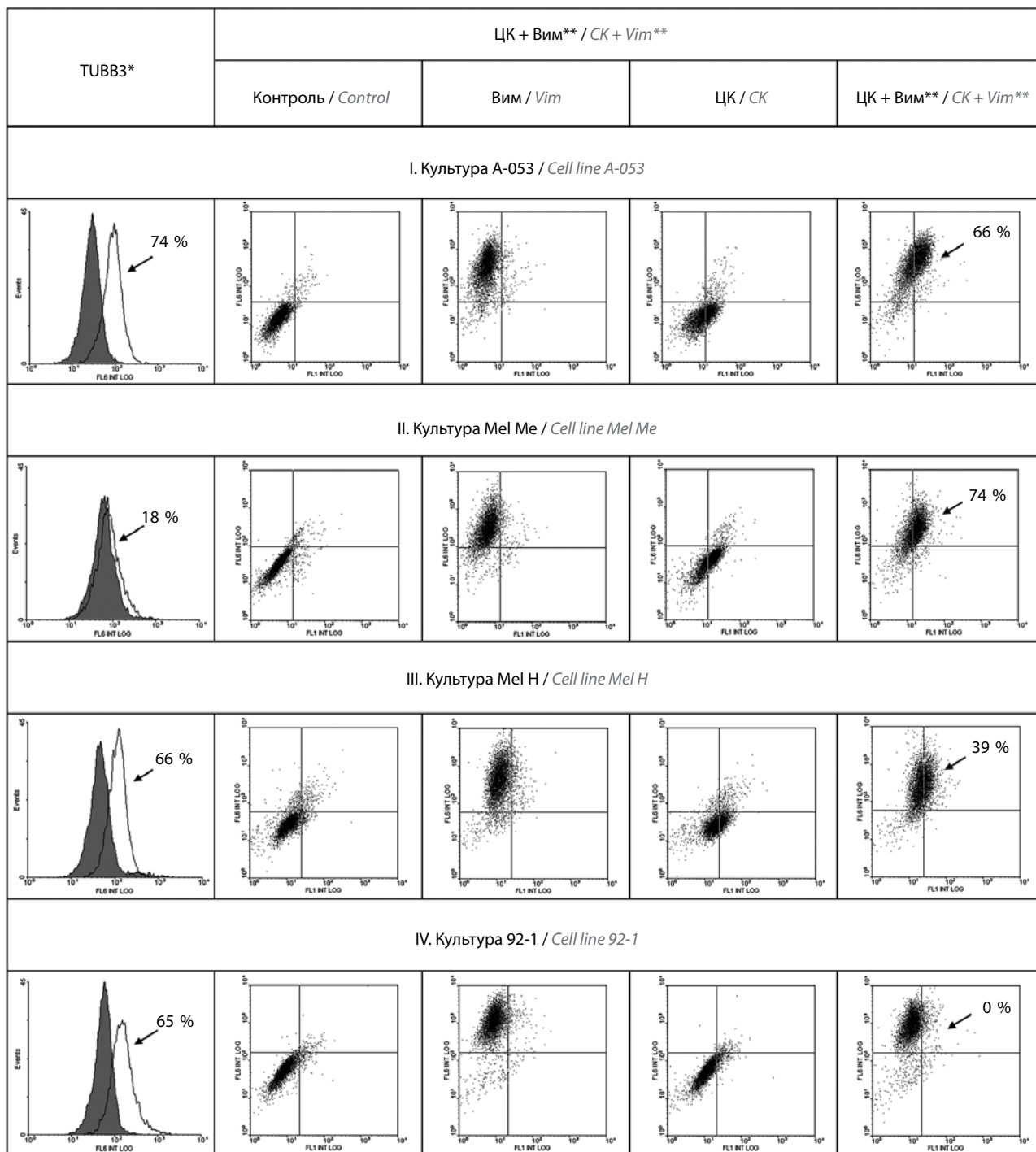


Рис. 3. Примеры результатов иммунофлуоресцентного анализа и проточной цитометрии культур клеток меланомы по уровню коэкспрессии цитокератинов и виментина (ЦК + Вим) и экспрессии бета-III тубулина (TUBB3). *Уровень экспрессии TUBB3: серые гистограммы – контроль (инкубация клеток только с вторичными антителами); белые – после инкубации с моноклональными антителами к TUBB3. По оси абсцисс – количество исследованных клеток; по оси ординат – интенсивность флуоресценции (y. e.). **Уровень экспрессии Вим, ЦК и коэкспрессии ЦК + Вим: по оси абсцисс – интенсивность внутриклеточной флуоресценции (y. e.) красителя DyLight 488; по оси ординат – DyLight 650. На диаграммах: контроль – autofлуоресценция клеток после инкубации с вторичными антителами (нижний левый квадрант); Вим – клетки, экспрессирующие Вим (левый верхний квадрант); ЦК – клетки, экспрессирующие ЦК (нижний правый квадрант); ЦК + Вим – клетки, коэкспрессирующие ЦК + Вим (верхний правый квадрант). Цифры указывают уровень экспрессии TUBB3 и коэкспрессии ЦК + Вим (%)

Fig. 3. Examples of the results of immunofluorescent analysis and flow cytometry of melanoma cell lines by the level of cytokeratin and vimentin (CK + Vim) co-expression and beta-III tubulin (TUBB3) expression. *TUBB3 expression level: gray histograms are control (incubation of cells with secondary antibodies only); white ones are after incubation with monoclonal antibodies to TUBB3. The abscissa shows the number of examined cells; along the y-axis, fluorescence intensity (a. u.). **The level of expression of Vim, CK and CK + Vim co-expression: abscissa and ordinate show the intensity of intracellular fluorescence (a. u.) of the dyes DyLight 488 and DyLight 650 respectively. On the diagrams: control is autofluorescence of cells after incubation with secondary antibodies (lower left quadrant); Vim – cells expressing Vim (upper left quadrant); CK – cells expressing CK (lower right quadrant); CK + Vim – cells co-expressing CK + Vim (upper right quadrant). The numbers indicated the level of TUBB3 expression and CK + Vim co-expression

культуры как с низким, так и с высоким уровнем экспрессии TUBB3. Изучение на парах таких культур новых соединений позволит выявить стимулирующий и ингибирующий эффекты потенциального мигростатика. При этом обнаружение ингибирующего воздействия будет указывать на «двойной» позитивный эффект нового соединения: как ингибитора метастатической активности клеток, так и резистентности к таксанам, поскольку известно, что резистентность клеток меланомы к препаратам таксанового ряда коррелирует с высокой экспрессией TUBB3 [15, 23].

И наконец, следует отметить разнообразность молекулярных фенотипов культур меланомы, включенных в сформированную панель. Клетки с разным соотношением экспрессии исследованных маркеров могут быть интересны с точки зрения выявления особенностей воздействия новых соединений не только на экспрессию белков цитоскелета, но и на резистентность клеток к таксанам. Представляют интерес и ответы на фундаментальные вопросы о различиях биологических характе-

ристик клеток с разным соотношением экспрессии белков цитоскелета, например, по их ростовым характеристикам в культуре и при трансплантации животным, по степени морфологической дифференцировки и т. д.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сформирована панель, включающая 21 культуру клеток меланомы человека из коллекции ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, в которых количественно охарактеризована экспрессия белков цитоскелета, ответственных за миграционную активность опухолевых клеток, — промежуточных филаментов ЦК и белка микротрубочек TUBB3. Группы культур с разным соотношением показателей экспрессии этих маркеров могут быть использованы для скрининга и доклинической оценки потенциальных мигростатиков, которые уменьшают метастатический потенциал меланомы и способны снижать резистентность к таксанам.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Skudalski L., Waldman R., Kerr P.E., Grant-Kels J.M. Melanoma: an update on systemic therapies. *J Am Acad Dermatol* 2022;86(3):515–24. DOI: 10.1016/j.jaad.2021.09.075
- Gandalovičová A., Rosel D., Fernandes M. et al. Migrastatics-anti-metastatic and anti-invasion drugs: promises and challenges. *Trends Cancer* 2017;3(6):391–406. DOI: 10.1016/j.trecan.2017.04.008
- Maiques O., Fanshawe B., Crosas-Molist E. et al. A preclinical pipeline to evaluate migrastatics as therapeutic agents in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 2021;125(5):699–713. DOI: 10.1038/s41416-021-01442-6
- Chu Y.W., Seftor E.A., Romer L.H., Hendrix M.J. Experimental coexpression of vimentin and keratin intermediate filaments in human melanoma cells augments motility. *Am J Pathol* 1996;148(1):63–9.
- Hendrix M.J., Seftor E.A., Chu Y.W. et al. Coexpression of vimentin and keratins by human melanoma tumor cells: correlation with invasive and metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(3):165–74. DOI: 10.1093/jnci/84.3.165
- Hendrix M.J., Seftor E.A., Seftor R.E. et al. Biologic determinants of uveal melanoma metastatic phenotype: role of intermediate filaments as predictive markers. *Lab Invest* 1998;78(2):153–63.
- Zhang K., Liang Y., Zhang W. et al. KRT81 knockdown inhibits malignant progression of melanoma through regulating interleukin-8. *DNA Cell Biol* 2021;40(10):1290–7. DOI: 10.1089/dna.2021.0317
- Han W., Hu C., Fan Z.J., Shen G.L. Transcript levels of keratin 1/5/6/14/15/16/17 as potential prognostic indicators in melanoma patients. *Sci Rep* 2021;11(1):1023. DOI: 10.1038/s41598-020-80336-8
- Plotzke J.M., Zhao R., Hrycaj S.M. et al. Immunohistochemical expression of PAX8, PAX2, and cytokeratin in melanomas. *J Cutan Pathol* 2021;48(10):1246–51. DOI: 10.1111/cup.14041
- Plaza J.A., Suster D., Perez-Montiel D. Expression of immunohistochemical markers in primary and metastatic malignant melanoma: a comparative study in 70 patients using a tissue microarray technique. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007;15(4):421–5. DOI: 10.1097/PAI.0b013e318032ea5d
- Ben-Izhak O., Stark P., Levy R. et al. Epithelial markers in malignant melanoma. A study of primary lesions and their metastases. *Am J Dermatopathol* 1994;16(3):241–6. DOI: 10.1097/00000372-199406000-00003
- Safadi R.A., Bader D.H., Abdullah N.I., Sughayer M.A. Immunohistochemical expression of keratins 6, 7, 8, 14, 16, 18, 19, and MNF-116 pancytokeratin in primary and metastatic melanoma of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2016;121(5):510–9. DOI: 10.1016/j.oooo.2015.11.016
- Altansy M.O., Ganguly A., Amrein M. et al. Beta3-tubulin is critical for microtubule dynamics, cell cycle regulation, and spontaneous release of microvesicles in human malignant melanoma cells (A375). *Int J Mol Sci* 2020;21(5):1656. DOI: 10.3390/ijms21051656
- Orfanidis K., Wäster P., Lundmark K. et al. Evaluation of tubulin β -3 as a novel senescence-associated gene in melanocytic malignant transformation. *Pigment Cell Melanoma Res* 2017;30(2):243–54. DOI: 10.1111/pcmr.12572
- Akasaka K., Maesawa C., Shibasaki M. et al. Loss of class III beta-tubulin induced by histone deacetylation is associated with chemosensitivity to paclitaxel in malignant melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2009;129(6):1516–26. DOI: 10.1038/jid.2008.406
- Shimizu A., Kaira K., Yasuda M. et al. Decreased expression of class III β -tubulin is associated with unfavourable prognosis in patients with malignant melanoma. *Melanoma Res* 2016;26(1):29–34. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000208
- Мамичев И.А., Богущ Т.А., Богущ Е.А. и др. Белок микротрубочек β III-тубулин: строение, экспрессия и функции в нормальных и опухолевых клетках. *Антибиотики и химиотерапия* 2018;63(7–8):79–90.
- Mamichev I.A., Bogush T.A., Bogush E.A. et al. Microtubule protein β III-tubulin: structure, expression and functions in normal and tumor cells. *Antibiotiki i himioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy* 2018;63(7–8):79–90. (In Russ.).
- Bogush T.A., Basharina A.A., Safarov Z.M. et al. Molecular diagnostics of the involvement of visually normal mucosa in the

- malignancy process in urothelial bladder cancer. *Mol Biol* 2022;56:592–9. DOI: 10.1134/S0026893322040033
19. Bogush T.A., Basharina A.A., Eliseeva B.K. et al. A new approach to epithelial-mesenchymal transition diagnostics in epithelial tumors: double immunofluorescent staining and flow cytometry. *Biotechniques* 2020;69(4):257–63. DOI: 10.2144/btn-2020-0024
20. Kralova V., Hanušová V., Caltová K. et al. Flubendazole and mebendazole impair migration and epithelial to mesenchymal transition in oral cell lines. *Chem Biol Interact* 2018;293:124–32. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.07.026
21. Meco D., Attinà G., Mastrangelo S. et al. Emerging perspectives on the antiparasitic mebendazole as a repurposed drug for the treatment of brain cancers. *Int J Mol Sci* 2023;24(2):1334. DOI: 10.3390/ijms24021334
22. Rebastinib plus antitubulin therapy with paclitaxel or eribulin in metastatic breast cancer. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02824575>
23. Mhaidat N.M., Thorne R.F., de Bock C.E. et al. Melanoma cell sensitivity to Docetaxel-induced apoptosis is determined by class III beta-tubulin levels. *FEBS Lett* 2008;582(2):267–72. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.12.014

Благодарность. Авторы благодарят М.А. Маяк за помощь в проведении иммунофлуоресцентного анализа.

Acknowledgement. The authors thank M.A. Maiaik for assistance with immunofluorescence analysis.

Вклад авторов

Т.А. Богущ: идея, обработка полученных данных, написание текста статьи;
И.Э. Мизаева: проведение иммунофлуоресцентного анализа, обработка полученных данных;
А.А. Башарина: обработка полученных данных, написание текста статьи;
А.Н. Гришанина: подготовка одноклеточных суспензий культур клеток;
М.А. Барышникова: культивирование клеток, написание текста статьи, научное редактирование;
О.С. Бурова, А.А. Рудакова: культивирование клеток, подготовка клеток к анализу;
В.С. Косоруков: идея, научное редактирование, общее руководство работой.

Authors' contribution

T.A. Bogush: idea, processing the data, article writing;
I.E. Mizaeva: conducting immunofluorescent analysis, processing the data;
A.A. Basharina: processing the data, article writing;
A.N. Grishanina: preparation of single-cell suspensions of cell cultures;
M.A. Baryshnikova: cell cultivation, article writing, scientific editing;
O.S. Burova, A.A. Rudakova: cell cultivation, preparation of cells for analysis;
V.S. Kosorukov: idea, scientific editing, general work management.

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.А. Богущ / T.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>
И.Э. Мизаева / I.E. Mizaeva: <https://orcid.org/0000-0002-3338-9679>
А.А. Башарина / A.A. Basharina: <https://orcid.org/0000-0002-4739-7733>
А.Н. Гришанина / A.N. Grishanina: <https://orcid.org/0000-0002-4277-9222>
М.А. Барышникова / M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>
О.С. Бурова / O.S. Burova: <https://orcid.org/0000-0001-8897-0172>
А.А. Рудакова / A.A. Rudakova: <https://orcid.org/0000-0001-7266-7689>
В.С. Косоруков / V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение о субсидии № 075-15-2021-1060 от 28.09.2021) и в рамках научно-исследовательской работы ФГБУ «Национальный медицинский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России 2023–2025 гг. (регистрационный № 123021500076-3).

Funding. The work was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of Russia (subsidy agreement No. 075-15-2021-1060, september 28, 2021) and the research project of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of 2023–2025 (No. 123021500076-3).

Статья поступила: 13.04.2023. **Принята к публикации:** 24.07.2023.

Article submitted: 13.04.2023. **Accepted for publication:** 24.07.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-90-97



Прогностическая тонкоигольная аспирационная биопсия увеальной меланомы: молекулярно-генетические факторы риска развития метастазов

В.А. Яровая¹, И.А. Левашов¹, А.Р. Зарецкий², Л.В. Чудакова², В.В. Назарова³, А.Д. Матяева¹, Л.В. Демидов³, А.А. Яровой¹

¹ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России; Россия, 127486 Москва, Бескудниковский бульвар, 59а;

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

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 23

Контакты: Вера Андреевна Яровая verandreevna@gmail.com

Введение. Для определения прогноза заболевания при увеальной меланоме активно используются молекулярно-генетические методы исследования материала первичной опухоли, который может быть получен в рамках органосохраняющего лечения с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии (ТИАБ). Молекулярно-генетическое тестирование и ТИАБ в отечественной практике имеют ряд особенностей, связанных с хирургической техникой, методикой молекулярно-генетического тестирования и классификационными подходами.

Цель – представить собственный опыт применения молекулярно-генетических методов в прогнозировании риска развития метастазов у пациентов с увеальной меланомой на основе материала ТИАБ.

Материалы и методы. Был проанализирован материал ТИАБ, полученный от 151 пациента. Тонкоигольную аспирационную биопсию с прогностической целью выполняли одновременно с органосохраняющим лечением (брахитерапией или стереотаксической радиохирургией). В ходе молекулярно-генетического исследования осуществляли анализ мутаций в генах *GNAQ*, *GNA11*, *EIF1AX* и *SF3B1* (методами высокочувствительной мутационно-специфической полимеразной цепной реакции в реальном времени и полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием продуктов этой реакции по Сэнгеру) и количества копий генов *PPARG* и *MYC* (методом флуоресцентной гибридизации *in situ*). Также проводили цитологическое исследование всех образцов, полученных при ТИАБ.

Результаты. Уровень информативности материала ТИАБ составил 91 %, медиана срока наблюдения – 36 мес. За этот период отдаленные метастазы выявлены у 12 пациентов из 151. Частота встречаемости молекулярно-генетических нарушений в целом соотносится с данными других крупных исследований. Оригинальная прогностическая панель впервые продемонстрировала возможность определения прогноза пациента в зависимости от делеции гена *PPARG*, наличие которой ассоциировано с низкими показателями выживаемости ($p < 0,01$). Мутации в генах *EIF1AX* и *SF3B1*, амплификация гена *MYC* и клеточный тип опухоли по результатам цитологического исследования не продемонстрировали статистической значимости.

Заключение. Используемые нами у пациентов с увеальной меланомой технологии ТИАБ и молекулярно-генетического тестирования продемонстрировали надежность и высокую информативность. Ряд прогностических факторов требуют дальнейшего исследования с более длительными сроками наблюдения за пациентами.

Ключевые слова: офтальмоонкология, молекулярная онкология, увеальная меланомы, прогнозирование, выживаемость

Для цитирования: Яровая В.А., Левашов И.А., Зарецкий А.Р. и др. Прогностическая тонкоигольная аспирационная биопсия увеальной меланомы: молекулярно-генетические факторы риска развития метастазов. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(3):90–7. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-90-97

Prognostic fine needle aspiration biopsy of uveal melanoma: Molecular and genetic factors of metastasis risk

V.A. Yarovaya¹, I.A. Levashov¹, A.R. Zaretsky², L.V. Chudakova², V.V. Nazarova³, A.D. Matyaeva¹, L.V. Demidov³, A.A. Yarovoy¹

¹S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Ministry of Health of Russia; 59a Beskudnikovskiy Boulevard, Moscow 127486, Russia;

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

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia;

Contacts: Vera Andreevna Yarovaya verandreevna@gmail.com

Introduction. Molecular genetic testing is actively used for prognostication in patients with uveal melanoma (UM). Tissue for genetic analysis may be obtained either by surgical excision or through fine-needle aspiration biopsy (FNAB). Performing genetic testing and FNAB in each institution can differ in surgical techniques and laboratory methodologies.

Aim. To present our own experience of performing FNAB-based molecular genetic testing for prognostication in patients with uveal melanoma.

Materials and methods. Prognostic FNAB ($n = 151$) were combined with brachytherapy or stereotactic surgery. Genetic testing was performed by methods based on polymerase chain reaction (*GNAQ*, *GNA11*, *EIF1AX* and *SF3B1* mutations) and fluorescence *in situ* hybridization (copy numbers of *PPARG* and *MYC* genes); cytology of FNAB material was also assessed.

Results. Fine-needle aspiration biopsy material was informative in 91 % of cases. At the median follow-up of 36 months, 12 cases of distant metastases were detected. Occurrence of the assessed mutations and copy numbers were related to other representative studies. *PPARG* deletion was shown to be a significant prognostic factor for metastasis-free survival ($p < 0,01$), which was demonstrated for the first time; *EIF1AX* and *SF3B1* mutations, *MYC* amplification and cytological class were not shown to be significantly associated with survival in our study.

Conclusion. FNAB-based molecular genetic testing for prognostication in patients with uveal melanoma was shown to be a reliable and highly informative approach. Some of the prognostic factors need to be evaluated further with longer follow-up.

Keywords: ocular oncology, molecular oncology, uveal melanoma, prognostication, survival

For citation: Yarovaya V.A., Levashov I.A., Zaretsky A.R. et al. Prognostic fine needle aspiration biopsy of uveal melanoma: Molecular and genetic factors of metastasis risk. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(3):90–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-90-97

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярно-генетические методы исследования в современной онкологии используются чаще всего для подбора таргетной терапии, несколько реже — для уточнения диагноза и еще реже — для определения прогностических факторов [1–3]. Прогностические факторы — это биологические или клинические маркеры, позволяющие уточнить шансы на реализацию различных исходов заболевания, например, вероятность развития метастазирования. Одним из редких примеров активного использования молекулярно-генетических методов в прогнозировании течения онкологического заболевания является их применение при увеальной меланоме (УМ).

Увеальная меланомы — наиболее распространенное злокачественное внутриглазное новообразование, клеточным субстратом которого являются меланоциты сосудистой оболочки глаза [3–5]. Показатели локального контроля первичного очага УМ даже при органосохраняющем лечении находятся на уровне 70–98 % [3, 6, 7]. Тем не менее УМ характеризуется сравнительно низким уровнем выживаемости: 5-летняя общая выживаемость при данном типе опухоли составляет около 80 %, 10-летняя — 50–70 % [8, 9]. Такие показатели обусловлены прежде всего отсутствием эффективных методов системной терапии — как в адьювантном режиме, так и при лечении метастатической болезни.

Вероятность возникновения метастазов УМ зависит от ряда факторов: клинических (возраст пациента,

размеры, локализация и особенности роста опухоли), морфологических (клеточный тип опухоли, митотическая активность, инфильтрация лимфоцитами и др.) и молекулярно-генетических (мутации в генах и хромосомные aberrации) [3, 5, 10]. Изучение молекулярно-генетических особенностей УМ позволило улучшить понимание механизмов и рисков метастазирования данной опухоли, а выявление соответствующих прогностических маркеров стало центральным звеном в определении прогноза заболевания.

Успех применения генетических методов в прогнозировании заболевания во многом обусловлен относительно узким и уникальным мутационным профилем УМ. По данным литературы, наиболее часто встречаются мутации в генах *GNA11*, *GNAQ*, *EIF1AX*, *SF3B1* и *BAP1*, а также хромосомные aberrации — нарушения количества копий обширных участков хромосом 1, 3, 6 и 8 [3, 5, 10–13]. Мутации в гене *BAP1* ассоциированы с моносомией по короткому плечу хромосомы 3 (что неудивительно с учетом того, что ген *BAP1* физически расположен именно на 3p) и являются наиболее существенным молекулярным фактором плохого прогноза при УМ. Мутации в гене *EIF1AX* при данной опухоли связаны с самым благоприятным прогнозом и ожидаемой продолжительностью жизни как у здоровых людей. Мутации в гене *SF3B1* ассоциированы с промежуточным прогнозом и отсроченными метастазами, возникающими спустя 7 и более лет после установления диагноза. Наконец, мутации

в генах *GNA11* и *GNAQ* являются драйверными, т. е. участвуют в начальных процессах онкогенеза, однако, по имеющимся данным, не оказывают существенного влияния на показатели выживаемости [4, 14].

В зависимости от представленных нарушений и использованных молекулярно-генетических методов авторы используют различные классификационные подходы. Наиболее распространенным методом стратификации является профилирование генной экспрессии (gene expression profiling, GEP), разделяющее все опухоли на 2 класса; результаты этой классификации ассоциированы со статусом хромосомы 3 (дисомия хромосомы 3 – класс 1, более благоприятный; моносомия – класс 2, менее благоприятный) [15]. Более детальное разделение на подклассы и подтипы предполагает учет других прогностических факторов: наличия мутаций в генах *EIF1AX* и *SF3B1*, статуса хромосом 1, 6 и 8. В зависимости от этих особенностей авторы могут использовать различные прогностические панели [4, 15–17].

В отечественной практике молекулярно-генетические методы прогнозирования течения УМ на материале первичной опухоли, полученном либо по результатам энуклеации, либо с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии (ТИАБ), широко не используются в связи с отсутствием возможности проведения данного исследования на бюджетной основе и предвзятости отдельных специалистов-офтальмологов в отношении технологии ТИАБ. В то же время применение ТИАБ в отечественной практике имеет ряд особенностей, связанных с хирургической техникой, методикой молекулярно-генетического тестирования и классификационными подходами [12, 18–23].

Цель исследования – представить собственный опыт применения молекулярно-генетических методов в прогнозировании риска развития метастазов у пациентов с УМ на основе материала ТИАБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За период с января 2017 г. по январь 2022 г. в отделении офтальмоонкологии и радиологии Национального медицинского исследовательского центра «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» была проведена 151 ТИАБ с прогностической целью. Всем пациентам ТИАБ выполнялась одновременно с органосохраняющим лечением в качестве первичного метода терапии или в течение нескольких дней от его начала (брахитерапия – в 136 (90 %), стереотаксическая радиохирургия гамма-нож – в 15 (10 %)). Тонкоигольная аспирационная биопсия проводилась по стандартной технологии, описанной ранее [20]. Все пациенты подписали информированное согласие на обработку персональных данных, диагностические исследования и лечение.

Молекулярно-генетическое исследование выполнялось методами высокочувствительной мутационно-специфической полимеразной цепной реакции в ре-

альном времени (ПЦР-РВ), ПЦР с последующим секвенированием продуктов этой реакции по Сэнгеру и флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH).

Анализ мутаций в *GNAQ* и *GNA11* проводился 151 пациенту, *EIF1AX* и *SF3B1* – 144 и 142 соответственно (количество копий генов *PPARG* и *MYC* оценивалось у 121 и 122 пациентов соответственно). Тест на делецию гена *PPARG* использовали для определения статуса короткого плеча хромосомы 3, тест на амплификацию гена *MYC* – для выявления статуса длинного плеча хромосомы 8.

Также проводилось цитологическое исследование, по результатам которого определялся клеточный тип опухоли: как по стандартной трехчастной классификации (веретенноклеточная, смешанноклеточная или эпителиоидноклеточная УМ), так и по упрощенной бинарной (присутствие или отсутствие эпителиоидных клеток) [24].

Средний срок наблюдения за пациентами, прошедшими ТИАБ и находящимися на диспансерном наблюдении, составил 33 мес (минимум – 2 мес, максимум – 70 мес, медиана – 34 мес). Критерии включения в анализ показателей выживаемости: наличие на момент исследования актуальной информации о больных в архиве учреждения (по данным диспансерного наблюдения или, при отсутствии актуальной информации, по заключениям офтальмологов, терапевтов, онкологов или патологоанатомов, полученных через органы здравоохранения по месту жительства), срок наблюдения при отсутствии метастазов более 12 мес. Критериями исключения являлись установленная метастатическая болезнь до проведения локального лечения, эндовитреальные вмешательства в течение всего срока наблюдения, наличие >1 опухолевого очага и билатеральная УМ.

Анализ риска метастазирования проводился по типу «случай–контроль»: 2 группы пациентов – с метастазами («случай») и без них («контроль») – сравнивались на основе частоты встречаемости предполагаемого влияющего фактора и по методу Каплана–Майера. Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение Google Sheets (Google LLC), Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft) и GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Software, LLC). Для оценки достоверности различий между количественными значениями 2 выборок применяли U-критерий Манна–Уитни; для сравнения качественных признаков – критерии χ^2 и Фишера. Безрецидивную выживаемость (выживаемость до выявления метастазов) оценивали с помощью метода Каплана–Майера с проверкой значимости различий по логранговому критерию. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общая информативность материала ТИАБ, определяемая как возможность верификации диагноза УМ

цитологическим или молекулярно-генетическим методом, составила 91 % ($n = 138$). Таким образом, в 9 % ($n = 13$) случаев не обнаружено никаких молекулярно-генетических и цитологических признаков УМ, оцениваемых в рамках данного исследования, что, однако, не исключало клинически установленный диагноз УМ.

Встречаемость мутаций в информативных образцах составила 44 % ($n = 61$) для гена *GNAQ*, 43 % ($n = 59$) для гена *GNA11*, 18 % ($n = 25$) для гена *EIF1AX* и 18 % ($n = 25$) для гена *SF3B1*. В информативных образцах, в которых проводился анализ на делецию гена *PPARG* и амплификацию гена *MYC*, встречаемость этих молекулярных нарушений составила 31 ($n = 36$) и 54 % ($n = 64$) соответственно. Драйверные мутации (в генах *GNAQ* или *GNA11*) были обнаружены в 78 % ($n = 108$) информативных образцов; в большинстве случаев они оказывались взаимоисключающими (в 5 случаях отмечались обе мутации). Результаты попарного анализа взаимовстречаемости молекулярных нарушений в информативных образцах УМ в рамках настоящего исследования представлены в таблице.

Попарный анализ взаимовстречаемости молекулярных нарушений в исследованных образцах продемонстрировал высокосignимые различия ($p < 0,01$) при сравнении групп с мутациями в генах *GNAQ* и *GNA11*. Умеренно значимые различия были обнаружены при сравнении образцов с мутациями в гене

EIF1AX и с молекулярными нарушениями в генах *GNAQ*, *SF3B1* и *PPARG* (показатель p составил 0,047; 0,03 и 0,03 соответственно), а также при сравнении образцов с нарушениями количества копий генов *PPARG* и *MYC* ($p = 0,02$).

По результатам цитологического исследования в 20 % случаев клеточный тип опухоли определить не удалось. В оставшихся случаях встречаемость веретенноклеточной меланомы составила 79 %, эпителиоидноклеточной – 11 % и смешанноклеточной – 10 % (в соответствии с классическим принципом определения клеточного типа УМ). Согласно бинарному принципу определения клеточного типа, в соответствии с которым выявляется наличие (>10 % эпителиоидных клеток) или отсутствие эпителиоидного компонента (≤ 10 % эпителиоидных клеток), встречаемость клеточных типов составила 30 и 70 % соответственно [24].

В группу пациентов, в которой проводился анализ показателей выживаемости в соответствии с критериями включения и исключения, вошли 133 больных. Средний срок наблюдения в ней составил 36 мес (медиана – 36 мес, минимум – 2 мес, максимум – 70 мес). За это время отмечены 12 случаев метастазирования УМ (метастазы в печени – 9 случаев, в легких – 1, множественные метастазы – 2).

Риск развития метастазов в зависимости от наличия мутаций, ассоциированных с уровнем выживаемости,

Взаимовстречаемость молекулярных нарушений

Cross-incidence of molecular abnormalities

Ген Gen		GNAQ (n = 138)		GNA11 (n = 138)		EIF1AX (n = 131)		SF3B1 (n = 129)		PPARG (n = 117)		MYC (n = 118)	
		Mt	WT	Mt	WT	Mt	WT	Mt	WT	Mt	WT	Mt	WT
GNAQ	Mt	–	–	5	56	16	44	13	46	12	39	27	24
	WT	–	–	54	23	9	62	12	58	24	42	37	30
GNA11	Mt	5	54	–	–	10	46	12	44	18	36	30	24
	WT	56	23	–	–	15	60	13	60	18	45	34	30
EIF1AX	Mt	16	9	10	15	–	–	1	24	2	18	12	8
	WT	44	62	46	60	–	–	24	79	31	60	50	42
SF3B1	Mt	13	12	12	13	1	24	–	–	5	18	14	10
	WT	46	58	44	60	24	79	–	–	28	57	47	38
PPARG	Mt	12	24	18	18	2	31	5	28	–	–	13	23
	WT	39	42	36	45	18	60	18	57	–	–	49	31
MYC	Mt	27	37	30	34	12	50	14	47	13	49	–	–
	WT	24	30	24	30	8	42	10	38	23	31	–	–

Примечание. Mt – молекулярное нарушение в соответствующем гене; WT – в соответствующем гене молекулярных нарушений не обнаружено. Статистическая значимость оценивалась по точному двустороннему критерию Фишера (ячейки зеленого цвета – $p < 0,05$, белого – $p > 0,05$).

Note. Mt – molecular abnormality in a corresponding gene; WT – no abnormalities found in the corresponding gene. Statistical significance was calculated using Fisher's exact two-sided test (green cells – $p < 0.05$, white cells – $p > 0.05$).

оценивался по типу «случай–контроль»: пациенты были разделены на 2 группы – с метастазами («случай») и без них («контроль»). Сравнение проводилось на основе предполагаемого влияющего фактора (мутации в генах *GNAQ*, *GNA11*, *EIF1AX*, *SF3B1*, *PPARG*, *MYC* и клеточный тип) по критерию χ^2 .

Статистически значимые различия определялись при делеции гена *PPARG*, наличие которой ассоциировано с негативным прогнозом ($p < 0,01$). Различия не были статистически значимы для молекулярных нарушений в генах *GNAQ* ($p = 0,99$), *GNA11* ($p = 0,31$) *EIF1AX* ($p = 0,1$), *SF3B1* ($p = 0,09$) и *MYC* ($p = 0,44$). Аналогичный анализ показателей выживаемости проводился в зависимости от клеточного типа как по традиционной трехчастной классификации, так и по предложенной нами двухчастной; в обоих случаях статистически значимые различия не были выявлены ($p = 0,27$ и $0,62$ соответственно).

В ходе анализа по методу Каплана–Майера получены схожие результаты статистически значимые различия показателей выживаемости в зависимости от наличия или отсутствия молекулярного нарушения определялись только для делеции гена *PPARG* ($p < 0,01$), различия не были статистически значимы для молекулярных нарушений в генах *EIF1AX* ($p = 0,11$), *SF3B1* ($p = 0,10$), *MYC* ($p = 0,53$), *GNAQ* ($p = 0,93$) и *GNA11* ($p = 0,22$) по логранговому критерию. График выживаемости по методу Каплана–Майера представлен на рисунке.

ОБСУЖДЕНИЕ

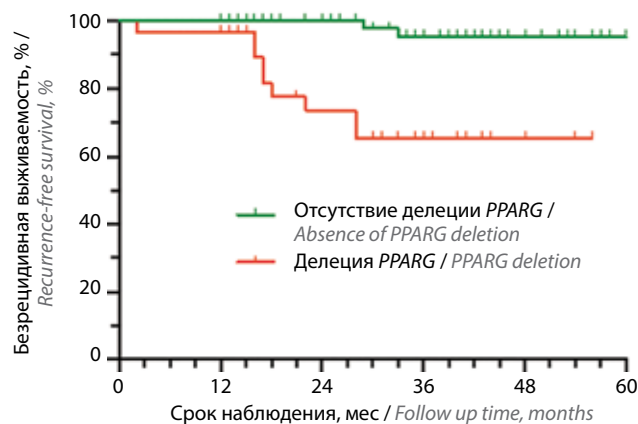
Генетический анализ опухолевого материала является частью комплексного подхода к ведению пациентов с УМ [1, 3, 5]. В специализированных офтальмоонкологических центрах Европы и США такой анализ осуществляется на материале как энуклеированных глаз, так и ТИАБ, в то время как в российской практике этот подход все еще не является общепризнанным. Данная работа представляет собой описание молекулярно-генетических результатов первого масштабного

отечественного опыта применения ТИАБ с прогностической целью у пациентов с УМ.

Информативность ТИАБ зависит от размеров опухоли и техники получения биопсии (использование иглы или витреотома, диаметра инструмента) и, по данным различных исследований, варьирует от 22 до 100 % [18, 22, 23, 25]. Как правило, низкий уровень информативности может наблюдаться при биопсии опухолей небольшого размера или при цитологическом анализе материала [26, 27]. Информативность генетического материала, по результатам различных исследований, находится на сравнительно высоком уровне: 85–100 %. По нашим данным, в 91 % образцов удалось провести молекулярно-генетический анализ.

По результатам наиболее крупных исследований, мутации *GNAQ* и *GNA11* в ткани УМ можно обнаружить в 57 и 41 % образцов соответственно, что соотносится с полученными нами результатами: эти мутации были выявлены в 44 и 43 % случаев соответственно [21, 28]. Мутации в генах *EIF1AX* и *SF3B1* и амплификация гена *MYC*, по данным литературы, встречаются в 8–21, 10–24 и 70 % случаев УМ [12, 21, 28, 29]. Представленная информация в целом соотносится с результатами нашего исследования: встречаемость мутаций в гене *EIF1AX* в исследованной группе образцов составила 18 %, в гене *SF3B1* – 18 %, амплификации гена *MYC* – 54 %. Вероятнее всего, разница обусловлена применением различных молекулярно-генетических методов идентификации мутаций. Информации о частоте встречаемости делеции гена *PPARG* в литературе найти не удалось; по нашим данным, эта мутация обнаружена в 31 % образцов. Анализ нарушений количества копий генов *PPARG* и *MYC* является отличительной особенностью нашей прогностической панели, в основе которой тем не менее лежат многократно валидированные принципы прогностической классификации УМ. Согласно этим принципам одними из главных прогностических факторов являются статусы хромосом 3 и 8 [3, 5, 10–13, 30].

В ходе анализа взаимовстречаемости молекулярных нарушений было показано, что в большинстве случаев мутации *GNAQ* и *GNA11* являются взаимоисключающими ($p < 0,01$), что полностью соответствует результатам предыдущих исследований [4, 14, 31]. При оценке попарной частоты встречаемости мутаций в гене *EIF1AX* с другими молекулярными нарушениями получены статистически значимые результаты для молекулярных нарушений в генах *GNAQ*, *PPARG* и *SF3B1*, однако в случае с *GNAQ* такой результат является скорее пограничным ($p = 0,047$) и требует дополнительной проверки. В то же время анализ взаимовстречаемости молекулярных нарушений в генах *EIF1AX*, *PPARG* и *SF3B1* демонстрирует намного более высокий уровень статистической значимости, что указывает на редкость сочетания этих мутаций, которые по своей прогностической сути во многом являются противоположными.



Безрецидивная выживаемость в зависимости от наличия делеции гена *PPARG* по методу Каплана–Майера
 Recurrence-free survival depending on the presence of *PPARG* gene deletion per the Kaplan-Meier method

В наиболее крупных исследованиях, посвященных изучению клеточного типа УМ на гистологическом материале энуклеированных глаз, веретенноклеточная меланома была выявлена в 34–44 % случаев, смешанноклеточная – в 35–62 %, эпителиоидноклеточная – в 3–21 % [24, 32, 33]. В нашем исследовании встречаемость данной патологии составила 79 %, смешанноклеточной – 10 %, эпителиоидноклеточной – 11 %. Представленную разницу во встречаемости веретенноклеточной УМ, вероятно, можно объяснить определенной степенью клеточной гетерогенности опухоли, а также тем фактом, что возможности цитологического анализа заведомо ограничены по сравнению с гистологическим анализом [34, 35].

Связь с уровнем выживаемости как при оценке риска развития метастазов по типу «случай–контроль», так и по методу Каплана–Майера, показала делеция гена *PPARG*. Данный ген несет информацию о синтезе рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом, – белков-факторов транскрипции с плейотропными эффектами, влияющими на метаболизм жиров и углеводов, развитие атеросклероза, воспалительных и онкологических процессов. Интерес к этой мутации обусловлен ее тесной связью с моносомией хромосомы 3 – главного прогностического фактора УМ [30]. Наше исследование впервые продемонстрировало возможность использования данного молекулярного маркера для оценки прогноза пациентов с УМ.

Наше исследование показало отсутствие статистически значимой связи между наличием мутаций в генах *GNAQ*, *GNA11*, *EIF1AX*, *SF3B1* и амплификации гена *MYC* и безрецидивной выживаемости пациентов с УМ. С учетом данных предыдущих работ, продемонстрировавших исключительно иницилирующую роль мутаций в генах *GNAQ* и *GNA11* в процессе онкогенеза УМ, полученные результаты по этим мутациям являются вполне ожидаемыми [4, 14]. В ходе этого исследования не удалось продемонстрировать прогностическую значимость мутаций в генах *EIF1AX* и *SF3B1* и амплификации *MYC*, что можно объяснить сроками наблюдения (оценивалась только 3-летняя выживаемость, в то время как первое плато безрецидивной выживаемости отмечается после 5–6 лет, а в контексте

анализа мутации *SF3B1* – после 7–10 лет) [8–10]. В то же время необходимо отметить полное отсутствие случаев метастазирования УМ у пациентов с мутациями *EIF1AX* и *SF3B1*, что предварительно подтверждает потенциальную прогностическую ценность этих молекулярно-генетических факторов.

В одном из первых исследований прогностической значимости материала ТИАБ, проведенном в 1996 г., изучался только клеточный тип опухоли [36]. Авторы продемонстрировали статистически значимое влияние клеточного типа, а точнее – количества обнаруженных эпителиоидных клеток, на выживаемость пациентов с УМ. По данным этой работы, веретенноклеточная УМ обнаруживалась в 70–79 % случаев (в зависимости от классификационного подхода). Наш анализ выживаемости в зависимости от клеточного типа опухоли продемонстрировал отсутствие статистически значимого влияния этого фактора, что можно объяснить как относительно малыми сроками наблюдения, так и ограничениями метода, описанными выше [24, 32–34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тонкоигольная аспирационная биопсия УМ при проведении органосохраняющего лечения позволяет получить информативный материал в большинстве случаев (в нашем исследовании – в 91 %).

Высокий уровень информативности и частота встречаемости молекулярных нарушений в основных генах, значимых для УМ, обнаруживаемых в материале биопсии, в целом соотносятся с данными других крупных исследований, что позволяет сделать вывод о надежности используемых технологий биопсии и молекулярно-генетических методов оценки материала.

Использованная нами прогностическая панель продемонстрировала возможность определения прогноза пациентов в зависимости от наличия делеции гена *PPARG*. Остальные прогностические факторы, такие как мутации в генах *EIF1AX* и *SF3B1*, амплификация гена *MYC* и клеточный тип опухоли по результатам цитологического исследования, требуют дальнейшего изучения с более длительными сроками наблюдения за больными.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hoiom V., Helgadottir H. The genetics of uveal melanoma: current in sights. *Appl Clin Genet* 2016;9:147–55. DOI: 10.2147/TACG.S69210
- Olopade O.I., Pichert G. Cancer genetics in oncology practice. *Ann Oncol* 2001;12(7):895–908. DOI: 10.2147/TACG.S69210
- Chattopadhyay C., Kim D.W., Gombos D.S. et al. Uveal melanoma: from diagnosis to treatment and the science in between. *Cancer* 2016;122(15):2299–312. DOI: 10.2147/TACG.S69210
- Royer-Bertrand B., Torsello M., Rimoldi D. et al. Comprehensive Genetic landscape of uveal melanoma by whole-genome sequencing. *Am J Hum Genet* 2016;99(5):1190–8. DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.09.008
- Jager M.J., Shields C.L., Cebulla C.M. et al. Uveal melanoma. *Nat Rev Dis Prim* 2020;6(1):24. DOI: 10.1038/s41572-020-0158-0
- Egger E., Zografos L., Schalenbourg A. et al. Eye retention after proton beam radiotherapy for uveal melanoma. *Int J Radiat Oncol* 2003;55(4):867–80. DOI: 10.1016/S0360-3016(02)04200-1
- Shields C.L., Shields J.A., Perez N. et al. Primary transpupillary thermotherapy for small choroidal melanoma in 256 consecutive cases: outcomes and limitations. *Ophthalmology* 2002;109(2):225–34. DOI: 10.1016/S0161-6420(01)00902-2
- Kaliki S., Shields C., Shields J. Uveal melanoma: estimating prognosis. *Indian J Ophthalmol* 2015;63(2):93. DOI: 10.4103/0301-4738.154367

9. Radivoyevitch T., Zabor E.C., Singh A.D. Uveal melanoma: long-term survival. *PLoS One* 202;16(5):e0250939. DOI: 10.1371/journal.pone.0250939
10. Singh A.D., Zabor E.C., Radivoyevitch T. Estimating cured fractions of uveal melanoma. *JAMA Ophthalmol* 202;139(2):174–81. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2020.5720
11. Shain A.H., Bagger M.M., Yu R. et al. The genetic evolution of metastatic uveal melanoma. *Nat Genet* 2019;51(7):1123–30. DOI: 10.1038/s41588-019-0440-9
12. Shields C.L., Ganguly A., Bianciotto C.G. et al. Prognosis of uveal melanoma in 500 cases using genetic testing of fine-needle aspiration biopsy specimens. *Ophthalmology* 2011;118(2):396–401. DOI: 10.1016/j.ophtha.2010.05.023
13. Зарецкий А.Р., Яровая В.А., Чудакова Л.В. и др. Опыт молекулярного тестирования увеальной меланомы I–III стадии при консервативном и хирургическом лечении. *Вопросы онкологии* 2018;5:625–32. Zaretsky A.R., Yarovaya V.A., Chudakova L.V. et al. Experience of molecular testing of stage I–III uveal melanoma in conservative and surgical treatment. *Voprosy onkologii = Questions of Oncology* 2018;5:625–32. (In Russ.).
14. Dogrusöz M., Jager M.J. Genetic prognostication in uveal melanoma. *Acta Ophthalmol* 2018;96(4):331–47. DOI: 10.1111/aos.13580
15. Onken M.D., Worley L.A., Char D.H. et al. Collaborative Ocular Oncology Group report number 1: prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma. *Ophthalmology* 2012;8(119):1596–603. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.02.017
16. Jager M.J., Brouwer N.J., Esmaeli B. The cancer genome atlas project: an integrated molecular view of uveal melanoma. *Ophthalmology* 2018;125(8):1139–42. DOI: 10.1016/j.ophtha.2018.03.011
17. Robertson A.G., Shih J., Yau C. et al. Integrative analysis identifies four molecular and clinical subsets in uveal melanoma. *Cancer Cell* 2017;32(2):204–20.e15. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.07.003
18. McCannel T.A., Chang M.Y., Burgess B.L. Multi-Year follow-up of fine-needle aspiration biopsy in choroidal melanoma. *Ophthalmology* 2012;119(3):606–10. DOI: 10.1016/j.ophtha.2011.08.046
19. Яровая В.А., Яровой А.А., Коробов Е.Н. и др. Молекулярное тестирование увеальной меланомы. *Находки. Современные технологии в офтальмологии* 2018;(4):297–9. Yarovaya V.A., Yarovoy A.A., Korobov E.N. et al. Molecular testing of uveal melanoma. *Nahodki. Sovremennye tekhnologii v oftal'mologii = Finds. Modern technologies in ophthalmology* 2018;(4):297–9. (In Russ.).
20. Левашов И.А., Яровой А.А., Яровая В.А. и др. Оценка риска метастазирования при проведении «прогностической» тонкоигльной аспирационной биопсии увеальной меланомы. *Злокачественные опухоли* 2022;12(2):29–35. DOI: 10.18027/2224-5057-2022-12-2-29-35 Levashov I.A., Yarovoy A.A., Yarovaya V.A. et al. Assessment of the risk of metastasis during the “prognostic” fine needle aspiration biopsy of uveal melanoma. *Zlokachestvennyye opuholi = Malignant tumors* 2022;12(2):29–35. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2022-12-2-29-35
21. Dogrusöz M., Jager M.J. Genetic prognostication in uveal melanoma. *Acta Ophthalmol* 2018;96(4):331–47. DOI: 10.1111/aos.13580
22. Sellam A., Desjardins L., Barnhill R. et al. Fine needle aspiration biopsy in uveal melanoma: technique, complications, and outcomes. *Am J Ophthalmol* 2016;162:28–34.e1. DOI: 10.1016/j.ajo.2015.11.005
23. Singh A.D., Medina C.A., Singh N. et al. Fine-needle aspiration biopsy of uveal melanoma: outcomes and complications. *Br J Ophthalmol* 2016;100(4):456–62. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2015-306921
24. Яровая В.А., Шацких А.В., Зарецкий А.Р. и др. Прогностическое значение клеточного типа увеальной меланомы. *Архив патологии* 2021;83(4):14. DOI: 10.17116/patol20218304114 Yarovaya V.A., Shatskikh A.V., Zaretsky A.R. et al. Prognostic value of the cell type of uveal melanoma. *Arhiv patologii = Pathology archive* 2021;83(4):14. (In Russ.). DOI: 10.17116/patol20218304114
25. Finn A.P., Materin M.A., Mruthyunjaya P. Choroidal tumor biopsy: a review of the current state and a glance into future techniques. *Retina* 2018;38(1):S79–87. DOI: 10.1097/IAE.0000000000001997
26. Augsburger J.J., Corrêa Z.M., Schneider S. et al. Diagnostic transvitreal fine-needle aspiration biopsy of small melanocytic choroidal tumors in nevus versus melanoma category. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2002;100:225–32.
27. Cohen V.M.L., Dinakaran S., Parsons M.A. et al. Transvitreal fine needle aspiration biopsy: the influence of intraocular lesion size on diagnostic biopsy result. *Eye* 2001;15(2):143–7. DOI: 10.1038/eye.2001.48
28. Yavuziyigitoglu S., Koopmans A.E., Verdijk R.M. et al. Uveal melanomas with SF3B1 mutations. *Ophthalmology* 2016;123(5):1118–28. DOI: 10.1016/j.ophtha.2016.01.023
29. Parrella P., Caballero O.L., Sidransky D. et al. Detection of c-myc amplification in uveal melanoma by fluorescent in situ hybridization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(8):1679–84. PMID 11431428
30. Souri Z., Wierenga A.P.A., van Weeghel C. et al. Loss of BAP1 is associated with upregulation of the NFκB Pathway and Increased HLA class I expression in uveal melanoma. *Cancers (Basel)* 2019;11(8):1102. DOI: 10.3390/cancers11081102
31. Shoushtari A.N., Carvajal R.D. *GNAQ* and *GNA11* mutations in uveal melanoma. *Melanoma Res* 2014;24(6):525–34. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000121
32. Paul E.V., Parnell B.L., Fraker M. Prognosis of malignant melanomas of the choroid and ciliary body. *Int Ophthalmol Clin* 1962;2(2):387–402. DOI: 10.1097/00004397-196206000-00007
33. Callender Colonel G.R., Wilder H.C., Ash J.E. Five hundred melanomas of the choroid and ciliary body followed five years or longer. *Am J Ophthalmol* 1942;25(8):962–7. DOI: 10.1016/S0002-9394(42)90595-6
34. Sidawy M.K., Del Vecchio D.M., Knoll S.M. Fine-needle aspiration of thyroid nodules. *Cancer* 1997;25;81(4):253–9. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142
35. De Lange M.J., Nell R.J., van der Velden P.A. Scientific and clinical implications of genetic and cellular heterogeneity in uveal melanoma. *Mol Biomed* 2021;2(1):25. DOI: 10.1186/s43556-021-00048-x
36. Char D.H., Kroll S.M., Miller T. et al. Irradiated uveal melanomas: cytopathologic correlation with prognosis. *Am J Ophthalmol* 1996;122(4):509–13. DOI: 10.1016/S0002-9394(14)72110-5

Вклад авторов

В.А. Яровая: ведение пациентов с УМ, разработка концепции исследования, сбор, анализ и интерпретация данных;
 И.А. Левашов: разработка дизайна исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;
 А.Р. Зарецкий: разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, научное редактирование;
 Л.В. Чудакова: проведение молекулярно-генетических тестов, сбор и анализ данных;
 В.В. Назарова: ведение пациентов с УМ, разработка дизайна исследования, анализ и интерпретация данных;
 А.Д. Матяева: сбор, анализ и интерпретация данных;
 Л.В. Демидов: разработка концепции исследования, научное редактирование;
 А.А. Яровой: разработка концепции и дизайна исследования, научное редактирование.

Authors' contribution

V.A. Yarovaya: management of patients with mental illness, development of the research concept, data collection, analysis and interpretation;
I.A. Levashov: research design development, data collection, analysis and interpretation, article writing;
A.R. Zaretsky: development of the research concept and design, data analysis and interpretation, scientific editing;
L.V. Chudakova: conducting molecular genetic tests, data collection and analysis;
V.V. Nazarova: management of patients with mental illness, study design development, data analysis and interpretation;
A.D. Matyaeva: data collection, analysis and interpretation;
L.V. Demidov: development of the research concept, scientific editing;
A.A. Yarovoy: development of the concept and design of research, scientific editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.А. Яровая / V.A. Yarovaya: <https://orcid.org/0000-0001-8937-7450>,
И.А. Левашов / I.A. Levashov: <https://orcid.org/0000-0001-6949-1002>
А.Р. Зарецкий / A.R. Zaretsky: <https://orcid.org/0000-0002-7778-6617>
Л.В. Чудакова / L.V. Chudakova: <https://orcid.org/0000-0002-8592-1188>
В.В. Назарова / V.V. Nazarova: <https://orcid.org/0000-0003-0532-6061>
А.Д. Матяева / A.D. Matyaeva: <https://orcid.org/0000-0001-7543-619X>
Л.В. Демидов / L.V. Demidov: <https://orcid.org/0000-0002-8562-6082>
А.А. Яровой / A.A. Yarovoy: <https://orcid.org/0000-0003-2219-7054>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено при поддержке Минздрава России (государственное задание № 300060056 для ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России).

Funding. The study was conducted with the support of the Ministry of Health of the Russian Federation (state task No. 300060056 for the Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of Russia).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Пациенты подписали информированное согласие на публикацию своих данных.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The protocol of the study was approved by the committee on biomedical ethics of S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Ministry of Health of Russia.

The patients gave written informed consent to the publication of their data.

Статья поступила: 22.12.2022. **Принята к публикации:** 13.06.2023.

Article submitted: 22.12.2022. **Accepted for publication:** 13.06.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-98-102



Prevalence of HPV/p16+ infection among oropharyngeal squamous cell carcinoma patients in a tertiary care centre in Southern India

Vaishak Jawahar¹, Sourjya Banerjee¹, Jyoti Kini², Saraswathy Sreeram², M.S. Athiyamaan¹, J. Sunny¹, A. Krishna¹, C. Srinivas¹, D. Lobo¹, B. Sai Makkapatti¹

¹Department of Radiation Oncology, Kasturba Medical College Mangalore, Manipal Academy of Higher Education, Manipal, India;

²Department of Pathology, Kasturba Medical College Mangalore, Manipal Academy of Higher Education, Manipal, India

Contacts: M.S. Athiyamaan drathiyamaan.ms@gmail.com

Introduction. Oropharyngeal squamous cell carcinomas are often found to be associated with human papilloma virus (HPV) infection. The prevalence of HPV infection among oropharyngeal squamous cell carcinomas patients in India is comparatively lower to that of the same worldwide.

Aim. To find out the prevalence of HPV infection among oropharyngeal squamous cell carcinomas patients who presented in our hospital.

Settings and design. Retrospective cross-sectional study.

Materials and methods. Tissue block of 60 patients with biopsy-proven oropharyngeal squamous cell carcinomas were subjected to immunohistochemistry for evaluating p16 expression. The p16 expression pattern was correlated with the demographic details. Data was entered in Microsoft Excel and Statistical Analysis was done with the help of SPSS version 22 (IBM Corp. Released, 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

Results. Prevalence of HPV infection in our study was found to be 11.7 %. 85.8 % of all p16-positive patients had moderate-well differentiated disease. 6 out of 7 p16-positive patients had higher T stage (T3–4). All the patients who were p16+ were found to have a higher Nodal stage (N2–3). 100 % of all p16+ patients were found to have stage IV disease.

Conclusion. Prevalence of HPV infection was found to be similar to that of previous studies conducted in India. These patients also presented with advanced nodal disease at presentation and thereby, an advanced overall stage.

Keywords: human papillomavirus infection, oropharyngeal cancers, prevalence of infection, Indian subpopulation

For citation: Jawahar Vaishak, Banerjee Sourjya, Kini Jyoti et al. Prevalence of HPV/p16+ infection among oropharyngeal squamous cell carcinoma patients in a tertiary care centre in Southern India. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(3):98–102. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-98-102

Распространенность инфекции HPV/p16+ среди пациентов с орофарингеальной плоскоклеточной карциномой в центре высокоспециализированной медицинской помощи в Южной Индии

Vaishak Jawahar¹, Sourjya Banerjee¹, Jyoti Kini², Saraswathy Sreeram², M.S. Athiyamaan¹, J. Sunny¹, A. Krishna¹, C. Srinivas¹, D. Lobo¹, B. Sai Makkapatti¹

¹Кафедра радиационной онкологии, Медицинский колледж Кастурба, Мангалор, Академия высшего образования Манипала, Манипал, Индия;

²кафедра патологии, Медицинский колледж Кастурба, Мангалор, Академия высшего образования Манипала, Манипал, Индия

Контакты: M.S. Athiyamaan drathiyamaan.ms@gmail.com

Введение. Орофарингеальная плоскоклеточная карцинома часто связана с заражением вирусом папилломы человека (ВПЧ). Распространенность инфекции ВПЧ среди пациентов с данной патологией в Индии сравнительно ниже, чем в других странах.

Цель исследования – определить распространенность инфекции ВПЧ среди пациентов с орофарингеальной плоскоклеточной карциномой, получавших лечение в нашей больнице.

Дизайн исследования. Ретроспективное одномоментное исследование.

Материалы и методы. Образцы тканей 60 пациентов с подтвержденным биопсией диагнозом «орофарингеальная плоскоклеточная карцинома» были исследованы иммуногистохимически на экспрессию p16. Было проведено сравнение профиля экспрессии p16 с демографическими данными. Полученные результаты оценены с помощью программы Microsoft Excel. Статистический анализ выполнен с использованием программного обеспечения SPSS version 22 (IBM Corp. Released, 2013. IBM SPSS Statistics для Windows, версия 22.0, Армонк, Нью-Йорк: IBM Corp.).

Результаты. Частота встречаемости ВПЧ в нашем исследовании составила 11,7 %. Средне- и высокодифференцированное заболевание наблюдалось у 85,8 % пациентов с положительной экспрессией p16. Шесть из 7 больных с такой экспрессией p16 имели более высокую T-стадию (T3–4), а все больные с таким показателем – высокую N-стадию (N2–3). У всех пациентов с положительной экспрессией p16 наблюдалось заболевание стадии IV.

Заключение. Распространенность инфекции ВПЧ была близкой к значениям, полученным в других исследованиях в Индии. Для пациентов с этой инфекцией также были характерны вовлеченность лимфатических узлов (N-стадия) в патологический процесс и более высокая общая стадия заболевания.

Ключевые слова: инфицирование вирусом папилломы человека, орофарингеальный рак, распространенность инфекции, индийская субпопуляция

Для цитирования: Jawahar Vaishak, Banerjee Sourjya, Kini Jyoti и др. Распространенность инфекции HPV/p16+ среди пациентов с орофарингеальной плоскоклеточной карциномой в центре высокоспециализированной медицинской помощи в Южной Индии. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(3):98–102. (На англ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-98-102

INTRODUCTION

Head and neck cancers approximately accounts for 900,000 cases worldwide with over 400,000 deaths annually. They comprise 30 % of all malignancies in India [1]. Consumption of tobacco products and alcohol are the typically associated risk factors [2].

Oropharyngeal squamous cell carcinomas (OPSCC) are often found in association with human papilloma virus (HPV) infection. They generally present with advanced nodal disease at presentation. However, they respond better to definitive treatment [3].

Increased HPV viral load noted in OPSCC leads to increased expression of oncoproteins E6 and E7, causing suppression of p53 and pRb, which indirectly causes overexpression of p16. This increased expression of p16 is known to be an excellent surrogate marker of active transforming infection of high-risk HPV types [4]. Hence, immunohistochemical staining of p16 is considered a highly sensitive detection method for active HPV infection [5].

This study was conducted to find out the prevalence of HPV infection in OPSCC patients by evaluating the p16 expression by immunohistochemistry (IHC) in our centre.

MATERIALS AND METHODS

Study design. A total of 60 oropharyngeal histopathological specimens of OPSCC patients who presented in our centre from 2017 to 2022 were available for final evaluation and were selected based on the following inclusion/exclusion criterion.

Inclusion criteria: patients who presented with the diagnosis of OPSCC in our centre.

Exclusion criteria:

- all head and neck carcinomas except OPSCC;
- incomplete medical records;
- inadequacy/unavailability of histopathological specimens.

Ethical clearance: patient consent was taken, and the institutional ethical committee approval was obtained “IEC KMC MLR 12–2020/419”.

Patients were staged according to the 7th edition of American Joint Committee on Cancer (AJCC) Tumor, Nodus and Metastasis (TNM) classification of malignant tumours, using their respective clinical notes and radiological imaging records, as the p16 expression assessment was done afterwards. Tumour and lymph node status were divided into two categories (T1–2 and T3–4; N0–1 and N2–3, respectively). Other demographic data were also noted.

Staining procedure. All the biopsy slides were initially reviewed, and appropriate blocks with the maximum tumour content were chosen for immunohistochemistry. 3-micron thin sections were cut from the tumour blocks. These sections were incubated for 1 hour at 80 degrees Celsius. The antigen retrieval solution was prepared and pre-heated in the microwave oven for 5 minutes. The slides were dipped in this pre-heated solution, incubated for 20 minutes, and then allowed to cool. Then the slides were washed under running tap water, after which they were transferred to distilled water. After this step, a blocking agent (a buffered casein solution with sodium azide) was added to the solution and incubated for 10 minutes. The slides were again washed with distilled water and dipped in a wash buffer solution, which was made separately, for 10 minutes. After this, the primary antibody for p16 (clone MX007, “Dako”) was added to the slides and incubated for 40 minutes at room temperature. After incubation, slides were washed in the wash buffer for 10 minutes. Then the linker solution was added to the slides and incubated for 20 minutes at room temperature. Following this, the slides were again washed with wash buffer for 10 minutes. After this step, the secondary antibody, horse radish peroxidase (HRP), was added to the slides and incubated for 30 minutes at room temperature. After 30 minutes, the slides were washed in the wash buffer for 10 minutes and then treated with a freshly prepared diaminobenzidine (DAB) solution, following which the slides were incubated for 5 minutes at room temperature. Next, the slides were washed with a wash buffer for 5 minutes. Finally, counterstaining was performed with Meyer’s haematoxylin for 3 minutes.

Positive control was used for the verification of the marker, the staining procedure, and the expression pattern on the respective slides. The strong, diffuse, and homogenous pattern of expression of p16 in both cytoplasm and nuclei was considered positive p16 expression.

Statistical analysis. Data was entered in Microsoft Excel and Statistical Analysis was done with the help of SPSS version 22 (IBM Corp. Released, 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.). A descriptive analysis was used to indicate the distribution of the quantitative variables in terms of mean, standard deviation (SD)/median, inter-quartile range (IQR). The qualitative variables were defined in terms of percentages by category. Association between p16 expression and demographic data was calculated using the Chi square test. p -value of <0.05 was considered as significant value.

RESULTS

Demographic data. A total of 60 patients were included for final evaluation in this longitudinal study. The median age in this study was found to be 60 years (mean \pm SD = 58.27 ± 10.09) (table 1). Majority of the patients were found to be males with a male: female ratio of 9: 1 (table 2). The commonest subsite among the parts of the oropharynx involved in this study was found to be the tonsil (48.3 %) followed by the base of tongue (36.7 %) (table 2). Histopathological examination revealed that majority of the patients (60 %) had moderately differentiated squamous cell carcinoma (MDSCC) followed by well-differentiated squamous cell carcinoma (WDSCC) (30 %) and poorly differentiated squamous cell carcinoma (PDSCC) (10 %) (table 2).

In this study, 50 patients (83.4 %) had advanced T stage (T3–4) and 47 (78.4 %) had advanced N stage (N2–3) (table 2). 46 out of 60 patients (76.7 %) had stage IV disease. 18.3 % had stage III disease, 55 had stage II disease.

Table 1. Demographic data (median 60, mean \pm SD 58.27 ± 10.09 ; range 47)

Parameter	Number of patients	
	<i>n</i>	%
Age, years:		
<60	29	48.3
>60	31	51.7
total	60	100.0

Prevalence and correlations. Out of the 60 total patients in the study, 7 patients (11.7 %) were found to be p16-positive (HPV-associated) (table 3, figure). 85.8 % of all p16-positive patients had moderate-well differentiated disease whereas 90.6 % of all p16-negative patients had moderate-well differentiated disease. 6 out of 7 p16-positive patients had higher T stage (T3–4). 83.1 % of p16-negative patients had T3–4 stage. All the patients who were p16+ were found to have a higher nodal stage of N2–3. Whereas only 75.5 % of the p16– patients were found to have N2–3 nodal stage. 100 % of all p16+ patients were found to have

stage IV disease. 73.6 % of p16– patients were found to have stage IV disease (table 4).

Table 2. Clinical data

Parameter	Number of patients	
	<i>n</i>	%
Gender:		
male	54	90
female	6	10
Subsite:		
base of tongue	22	36.7
soft palate	8	13.3
tonsil	29	48.3
uvula	1	1.7
Histological grade:		
WDSCC	18	30
MDSCC	36	60
PDSCC	6	10
T stage:		
T1–2	10	16.6
T3–4	50	83.4
N stage:		
N0–1	13	21.6
N2–3	47	78.4
Overall stage:		
I	0	0
II	3	5
III	11	18.3
IV	46	76.7

Note. Here and in table 4: WDSCC – well-differentiated squamous cell carcinoma; MDSCC – moderately differentiated squamous cell carcinoma; PDSCC – poorly differentiated squamous cell carcinoma.

Table 3. Prevalence of human papilloma virus

p16 status	Number of patients	
	<i>n</i>	%
Negative	53	88.3
Positive	7	11.7
Total	60	100.0

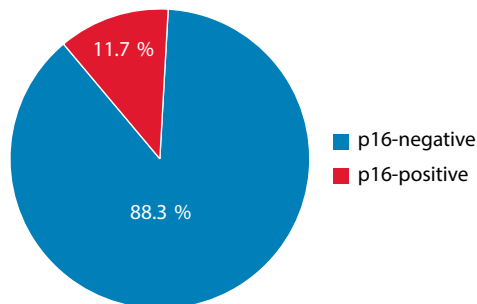
DISCUSSION

It is clear from previous studies that there is a significant association between HPV infection and head and neck cancer, especially in OPSCC. The prevalence of this HPV infection is generally seen higher in the western population when compared to that of Indian population.

B.J. Cline et al. conducted a study including 31702 OPSCC patients in which the mean age at diagnosis was found to be 60.3 years. In this study, 22.9 % were females and 77.1 % were males [6]. Similarly in our study, the mean

Table 4. Correlations with human papilloma virus status

Parameter	p16-positive (%)	p16-negative (%)	p-value
Histological grade:			
WDSCC	42.9	28.4	0.616
MDSCC	42.9	62.2	
PDSCC	14.2	9.4	
T stage:			
T1–2	14.2	16.9	0.857
T3–4	83.1	85.8	
N stage:			
N0–1	0	24.5	0.139
N2–3	100	75.5	
Stage:			
I	0	0	0.299
II	0	5.6	
III	0	20.8	
IV	100	73.6	

*Prevalence of human papilloma virus*

age at diagnosis was found to be 58.2. Out of the total 60 patients, 54 of them (90 %) were males, and the remaining 6 patients (10 %) were females. A study done by Tristantham et al which included 23297 OPSCC patients had tonsil as the most common subsite (96.4 %) and poorly differentiated squamous cell carcinomas as the most common histology (38.9 %) [7]. Our study also had tonsil as the most common subsite (48.3 %) followed by the base of tongue (36.7 %). Majority of the patients had moderately differentiated squamous cell carcinomas as the most common histological grade in our study (60 %) followed by well-differentiated squamous cell carcinomas (30 %).

According to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), among the US population, 70 % of the OPSCC patients are associated with HPV infection. C. de Martel

et al. conducted a study in 2008 including 12.7 million cases to quantify the burden of cancers associated with infections worldwide. The pattern of HPV prevalence among oropharyngeal carcinoma (OPC) patients from various regions in this research was as follows: 56 % in North America, 39 % in Northern & Western Europe, 38 % in Eastern Europe, 17 % in Southern Europe, 45 % in Australia, 52 % in Japan, and 13 % in the remaining countries combined [8]. A study by A. Bahl et al. in India revealed 22.8 % of patients had HPV-associated disease among the total 105 patients with OPC [2]. Studies conducted by V. Murthy et al. and M.K. Sannigrahi et al. including OPC patients from Indian subpopulation also had similar rates of prevalence – 20 % and 15 % respectively [9, 10]. The prevalence of HPV in our study was found to be 11.7 %. The slight variations in prevalence rates amidst the various studies conducted may be attributable to the technique of detection chosen, which may be HPV DNA *in-situ* hybridization (ISH), HPV DNA polymerase chain reaction (PCR), or IHC for the interpretation of p16 expression.

In a study by N. Wakisaka et al., 35.8 % patients had advanced T stage (T3–4), 60.3 % had higher N stage (N1–3) and 75.4 % had advanced stage disease (stage III–IV). Among the HPV-positive patients in this study, 31.8 % had T3–4 stage, 77.2 % had N1–3 disease and 81.8 % had stage III–IV disease [11]. Out of the total 60 patients in our study, 83.3 % had T3–4 stage, 78.3 % had N2–3 stage and 76.6 % had stage IV disease. In the HPV-positive patients in our study, 85.8 % had T3–4 stage, 100 % of the patients had N2–3 disease and 95 % had stage IV disease.

In summary, our study demonstrated an HPV-positivity rate of 11.7 % among the 60 total patients taken up for evaluation. Similar to previous literature, the HPV-positive patients in our study presented with advanced nodal disease at presentation and thereby, an advanced overall stage. Further follow-up of these patients including their treatment details, determination of possible prognostic markers, and evaluation of their survival parameters can be done which can help in modifying the existing treatment modalities as HPV-associated OPSCC are known to have better prognosis according to literature.

CONCLUSION

Prevalence of HPV infection was found to be similar to that of previous studies conducted in India. These patients also presented with advanced nodal disease at presentation and thereby, an advanced overall stage.

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

- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660
- Bahl A., Kumar P., Dar L. et al. Prevalence and trends of human papillomavirus in oropharyngeal cancer in a predominantly north Indian population. *Head Neck* 2014;36(4):505–10. DOI: 10.1002/hed.23317
- Johnson D.E., Burtness B., Leemans C.R. et al. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2020;6(1):1–22. DOI: 10.1038/s41572-020-00224-3
- Vani N.V., Madhanagopal R., Swaminathan R., Ganesan T.S. Dynamics of oral human papillomavirus infection in healthy population and head and neck cancer. *Cancer Med* 2023;12(10):11731–45. DOI: 10.1002/cam4.5686
- Yang D., Shi Y., Tang Y. et al. Effect of HPV infection on the occurrence and development of laryngeal cancer: a review. *J Cancer* 2019;10(19):4455. DOI: 10.7150/jca.34016
- Cline B.J., Simpson M.C., Gropler M. et al. Change in age at diagnosis of oropharyngeal cancer in the united states, 1975–2016. *Cancers (Basel)* 2020;12(11):3191. DOI: 10.3390/cancers12113191
- Tham T., Ahn S., Frank D. et al. Anatomical subsite modifies survival in oropharyngeal squamous cell carcinoma: National Cancer Database study. *Head Neck* 2020;42(3):434–45. DOI: 10.1002/hed.26019
- De Martel C., Ferlay J., Franceschi S. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 2012;13(6):607–15. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70137-7
- Murthy V., Swain M., Teni T. et al. Human papillomavirus/p16 positive head and neck cancer in India: prevalence, clinical impact, and influence of tobacco use. *Indian J Cancer* 2016;53(3):387. DOI: 10.4103/0019-509X.200668
- Sannigrahi M.K., Singh V., Sharma R. et al. Detection of active human papilloma virus-6 in head and neck cancers of Asian North Indian patients. *Oral Dis* 2016;22(1):62–8. DOI: 10.1111/odi.12382
- Wakisaka N., Yoshida S., Kondo S. et al. Induction of epithelial–mesenchymal transition and loss of podoplanin expression are associated with progression of lymph node metastases in human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma. *Histopathology* 2015;66(6):771–80. DOI: 10.1111/his.12496

Authors' contribution

Manuscript has been read and approved by all the authors, that the requirements for authorship as stated earlier in this document have been met, and that each author believes that the manuscript represents honest work, if that information is not provided in another form.

Вклад авторов

Текст статьи был прочитан и одобрен всеми авторами, указанные выше в данном документе требования авторства были удовлетворены, и все авторы считают, что статья отражает реальную работу, если эта информация не представлена в другой форме.

ORCID of authors / ORCID авторов

Vaishak Jawahar: <https://orcid.org/0009-0009-1948-810X>

Sourjya Banerjee: <https://orcid.org/0000-0003-4710-2701>

Jyoti Kini: <https://orcid.org/0000-0002-3351-9517>

Saraswathy Sreeram: <https://orcid.org/0000-0003-4149-0766>

M.S. Athiyamaan: <https://orcid.org/0000-0003-4691-9728>

Johan Sunny: <https://orcid.org/0000-0001-8332-9618>

Abhishek Krishna: <https://orcid.org/0000-0002-9318-7024>

Challapalli Srinivas: <https://orcid.org/0000-0003-0355-487X>

Dilson Lobo: <https://orcid.org/0000-0002-9222-863X>

Bharat Sai Mokkapatti: <https://orcid.org/0000-0002-1635-0289>

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflicts of interest.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Funding. The work was performed without external funding.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Kasturba Medical College Mangalore, Manipal Academy of Higher Education (protocol No. IEC КМС МЛР 12-2020/419).

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

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Kasturba Medical College Mangalore, Manipal Academy of Higher Education (протокол № IEC КМС МЛР 12-2020/419).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Article submitted: 31.03.2023. **Accepted for publication:** 29.05.2023.

Статья поступила: 31.03.2023. **Принята к публикации:** 29.05.2023.



Надежде Викторовне ЧЕРДЫНЦЕВОЙ – 70 лет!

Nadezhda Viktorovna Cherdyntseva is 70 years old!

17 июля 2023 г. исполнилось 70 лет Надежде Викторовне Чердынцевой – доктору биологических наук, профессору, члену-корреспонденту РАН, известному специалисту в области молекулярной онкологии и иммунологии, активному организатору науки и талантливому руководителю.

Надежда Викторовна родилась в Новокузнецке Кемеровской области. В 1975 г. окончила биолого-почвенный факультет Томского государственного университета. В 1975–1976 гг. работала старшим лаборантом кафедры физиологии этого университета. В 1979 г. поступила в Сибирский филиал Всесоюзного онкологического научного центра АМН СССР (в настоящее время НИИ онкологии Томского НИМЦ) на должность младшего научного сотрудника. С 1987 г. работала старшим научным сотрудником этого учреждения, с 1991 г. – заведующим лабораторией иммунологии (в настоящее время – лаборатория молекулярной онкологии и иммунологии). С 2003 г. Н.В. Чердынцева – заместитель директора по научной работе, руководитель лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии, с 2011 г. по совместительству – профессор кафедры онкологии Сибирского государственного медицинского университета.

Область научных интересов Н.В. Чердынцевой – проблема патогенеза злокачественных новообразований. В 1987 г. в Совете при НИИ онкологии ТНЦ АМН СССР Надежда Викторовна защитила диссертацию на тему «Микробицидные системы нейтрофильных гранулоцитов в условиях экспериментального злокачественного роста» на соискание ученой степени кандидата биологических наук (научный руководитель академик АМН СССР Н.В. Васильев), а в 1999 г. в Совете при Восточно-Сибирском научном центре СО РАМН (Иркутск) – диссертацию на тему «Иммунологические механизмы противоопухолевого действия модификаторов биологических реакций различной природы» на соискание ученой степени доктора биологических наук (научные консультанты академик РАМН Е.Д. Гольдберг, профессор Е.С. Смольянинов). В 2001 г. Н.В. Чердынцевой присвоено ученое звание профессора. В 2016 г. Надежда Викторовна избрана членом-корреспондентом РАН.

Н.В. Чердынцева внесла существенный вклад в развитие онкоиммунологии и молекулярной онкологии в регионах Сибири и Дальнего Востока. Она

консолидировала генетические исследования по онкологии в Сибирском регионе, что позволило установить роль генетической компоненты в предрасположенности к злокачественным новообразованиям и выявить маркеры повышенного риска. Надежда Викторовна координирует научные разработки института, объединяя исследователей разного профиля через образование консорциумов, совместных проектов, временных творческих междисциплинарных коллективов, что способствует повышению эффективности исследований и ускорению их внедрения в практику. Также она курирует подготовку междисциплинарных профессиональных кадров различного уровня.

Н.В. Чердынцева создала научную школу по изучению молекулярных механизмов злокачественного роста и роли иммунной системы в опухолевой прогрессии, подготовила десятки специалистов и кадров высшей квалификации.

На рубеже столетий в НИИ онкологии Томского НИМЦ были проведены крупномасштабные исследования роли иммунной системы в формировании и прогрессии злокачественных опухолей на экспериментальных моделях и в условиях клиники, результаты которых показали особый проопухолевый режим работы иммунной системы. Н.В. Чердынцева и ее коллеги получили новые данные о системе иммунитета в условиях опухолевой прогрессии, выявили маркеры, предсказывающие эффект терапии, показали роль опухолевого микроокружения в клиническом течении заболевания, что позволило развить разработанную ими оригинальную концепцию на новом технологическом уровне.

По инициативе Н.В. Чердынцевой НИИ онкологии Томского НИМЦ стал лидером во внедрении методов молекулярно-генетических исследований для диагностики и назначения терапии онкологическим больным с целью повышения эффективности лечения в регионе. Надежда Викторовна активно развивает новое направление в области молекулярной онкологии, связанное с изучением наследственных

раковых синдромов в разных этнических популяциях. Под ее руководством проведены межцентровые исследования и получены важные данные о генетической компоненте предрасположенности к раку молочной железы в регионах Сибири и Дальнего Востока, подтверждена гипотеза об этнической специфичности мутаций в генах, контролирующих целостность генома, в различных сибирских этнических группах при наследственном раке молочной железы. Это дало возможность использования медико-генетического консультирования и повысило эффективность курации больных с мутациями и их родственников разных этнических групп. Также под руководством Надежды Викторовны разработаны новые медицинские технологии для улучшения результатов лечения онкологических пациентов.

Возглавляемый Н.В. Чердынцевой отдел экспериментальной онкологии стал плацдармом междисциплинарных фундаментальных молекулярно-генетических исследований, предполагающих объединение компетенций академических и образовательных учреждений Минобрнауки России в интересах пациентов для получения новых знаний, их трансляции в практику и повышения эффективности борьбы со злокачественными новообразованиями.

Актуальность и важность исследований Н.В. Чердынцевой подтверждаются 50 патентами и авторскими свидетельствами о государственной регистрации баз данных, публикациями в высокорейтинговых журна-

лах, грантовой поддержкой. Надежда Викторовна является руководителем большого числа научных проектов, реализованных в рамках государственного задания, финансовой поддержки российских и зарубежных фондов (РФФИ, РФФ и др.), ответственным исполнителем и участником крупных проектов Минобрнауки России, мегагрантов в рамках Постановления Правительства РФ от 15.02.2023 № 220, в том числе междисциплинарного характера.

На протяжении всей своей научной деятельности, начиная с 80-х годов XX в. Н.В. Чердынцева активно занимается подготовкой молодых научных кадров. Под ее руководством защищены 6 докторских и 20 кандидатских диссертаций. Ученики Надежды Викторовны в настоящее время заведуют лабораториями, руководят подготовкой кадров в аспирантуре, получают конкурсное финансирование РФФ, РФФИ, гранты и стипендии Президента РФ, участвуют в крупных проектах Минобрнауки и Минпромторга России, мегагрантах, подтверждая принадлежность к ведущей научной школе в области молекулярной онкологии и иммунологии.

Н.В. Чердынцева – автор более 800 научных публикаций, из них 23 монографий, 272 статей. Надежда Викторовна вносит заметный вклад в развитие практического здравоохранения, осуществляя актуальную молекулярно-генетическую диагностику для назначения лекарственного лечения онкологическим пациентам.

Талантливый ученый, Н.В. Чердынцева продолжает активную научную работу.

Редакция журнала «Успехи молекулярной онкологии» искренне поздравляет Надежду Викторовну с замечательным юбилеем и желает дальнейших успехов в ее благородной деятельности!

14-16 ноября 2023 · Москва



РОССИЙСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ КОНГРЕСС 2023



Российский онкологический конгресс – крупнейшее национальное онкологическое мероприятие в Европе с международным участием. Конгресс проводится Национальным медицинским исследовательским центром онкологии имени Н.Н. Блохина и Российским обществом клинической онкологии (RUSSCO) под эгидой Ассоциации онкологов России.

В программе будут представлены выступления ведущих отечественных и зарубежных онкологов, освещающие основные достижения в диагностике и лечении злокачественных опухолей за последний год.

Планируется проведение выставки крупнейших фармацевтических компаний, представленных на российском рынке.



rosoncweb.ru