

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Аутофагия и эпителиально-
мезенхимальный переход
при опухолевой прогрессии*

*Предикторы чувствительности
рака молочной железы
к химиотерапии*

*Экспрессия генов
ABC-транспортёров в опухолях
молочной железы*

*Экспрессия генов-маркеров
пролиферативной активности
в слизистой оболочке толстой
кишки при различной патологии*

*Дифференциальная экспрессия
микроРНК и генов-мишеней
при цервикальных неоплазиях*

ТОМ 7 № 2
2020



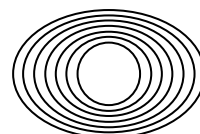
Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук.

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

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



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

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

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

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

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

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

2 ^{ТОМ 7}
'20

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

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

Прием статей:
онлайн на сайте

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

Выпускающий редактор **Н.В. Жукова**
Корректор **Л.К. Мусатова**
Дизайн **Е.В. Степанова**
Верстка **О.В. Гончарук**

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

*Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору*

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

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

ISSN: 2313-805X (Print)
ISSN: 2413-3787 (Online)
Успехи молекулярной онкологии.
2020. Том 7. № 2. 1–64

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2020

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Буки Веди»

Тираж 1000 экз.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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)

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

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

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

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

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

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

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

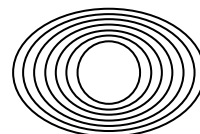
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

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

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

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

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



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

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

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

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

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

FOUNDED IN 2014

2 Vol. 7
'20

Founders:

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

Editorial Office:

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

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

Managing editor N.V. Zhukova
Proofreader L.K. Musatova
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

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

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

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

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

The editorial board is not responsible
for advertising content.

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

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

Uspekhi molekulyarnoy
onkologii. 2020. Vol. 7
No. 2. 1–64

© PH "ABV-Press", 2020

Pressa Rossii catalogue
index: 93562

Printed at the Buki Vedi LLC

1,000 copies

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

EXECUTIVE EDITOR

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

EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Информация для авторов

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

1. Общие правила

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

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

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

Последняя страница должна содержать:

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

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

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

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

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

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

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

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

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

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

- введение,
- цель,
- материалы и методы,
- результаты,
- обсуждение,
- заключение (выводы),
- вклад всех авторов в работу,
- конфликт интересов для всех авторов (в случае его отсутствия необходимо указать: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»),
- 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 графов должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице. Вся информация, содержащаяся в таблице, включая ее название и примечание (если есть), должна быть переведена на английский язык.

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

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

9. Список литературы

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

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

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

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

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

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

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

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

Общие положения:

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

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

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

О.О. Рябая, А.А. Прокофьева

Взаимодействие аутофагии и эпителиально-мезенхимального перехода в развитии опухолевой прогрессии 8

Е.Ю. Зубарева, М.А. Сеньчукова

Современные представления о клинических, морфологических и молекулярно-биологических предикторах чувствительности рака молочной железы к химиотерапии..... 20

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова, А.М. Певзнер, К.А. Гаптулбарова, Е.Ю. Гарбуков, Е.М. Слонимская, Е.А. Усынин, Н.В. Литвяков

Анализ экспрессии генов семейства ABC-транспортёров в опухоли молочной железы: связь с эффективностью химиотерапии и прогнозом заболевания..... 29

Т.М. Кулинич, М.В. Захаренко, Е.Л. Джикия, А.Л. Сенчукова, У.С. Станоевич, И.Б. Грунин, Н.В. Мельникова, С.В. Гончаров, Т.В. Крашихина, Е.А. Кудинова, О.П. Близнюков, В.К. Боженко

Исследование уровня экспрессии генов-маркеров пролиферативной активности в слизистой оболочке толстой кишки при различной патологии 39

Т.А. Димитриади, Д.В. Бурцев, Е.А. Дженкова, Д.С. Кутилин

Дифференциальная экспрессия микроРНК и их генов-мишеней при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях разной степени тяжести 47

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

А.А. Лушикова

К 100-летию юбилею Ирины Николаевны Крюковой, доктора биологических наук, заслуженного работника здравоохранения Российской Федерации (1920–2013)..... 62

REVIEWS

O.O. Ryabaya, A.A. Prokofieva

The interplay of autophagy and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. 8

E.Yu. Zubareva, M.A. Sen'chukova

The modern views of the clinical, morphological and molecular biological predictors of breast cancer sensitivity to chemotherapy. 20

EXPERIMENTAL REPORTS

M.M. Tsyganov, M.K. Ibragimova, A.M. Pevzner, K.A. Gaptulbarova, E.Yu. Garbukov, E.M. Slonimskaya, E.A. Usynin, N.V. Litviakov

Gene expression analysis of ABC transporter family in breast tumors: relationship with chemotherapy effect and disease prognosis 29

T.M. Kulinich, M.V. Zakharenko, E.L. Dzhikiya, A.L. Senchukova, U.S. Stanoevich, I.B. Grunin, N.V. Melnikova, S.V. Goncharov, T.V. Krashikhina, E.A. Kudinova, O.P. Bliznyukov, V.K. Bozhenko

Investigation of the expression level of genes-markers of proliferative activity in the mucosa at normal and various pathologies of the colon 39

T.A. Dimitriadi, D.V. Burtsev, E.A. Dzhenkova, D.S. Kutilin

Differential expression of microRNAs and their target genes in cervical intraepithelial neoplasias of varying severity 47

SHORT REPORT

A.A. Lushnikova

For the 100th anniversary of birth of Irina Nikolaevna Krukova Doctor of Biological Sciences, Honored Healthcare Worker of the Russian Federation (1920–2013) 62

Взаимодействие аутофагии и эпителиально-мезенхимального перехода в развитии опухолевой прогрессии

О.О. Рябая, А.А. Прокофьева

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

Контакты: Оксана Олеговна Рябая oxa2601@yandex.ru

Аутофагия и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) являются основными биологическими процессами, участвующими в опухолевой прогрессии, и тесно взаимосвязаны между собой. С одной стороны, активация аутофагии обеспечивает энергию и основные питательные вещества для ЭМП во время распространения метастазов, что помогает клеткам выживать в неблагоприятных условиях окружающей среды. С другой стороны, аутофагия, выступая в качестве функции, подавляющей опухолевый рост, склонна препятствовать метастазированию путем избирательного подавления основных транскрипционных факторов ЭМП на ранних стадиях. Следовательно, воздействие на ЭМП ингибиторами или активаторами аутофагии может быть стратегией, которая позволит предположить новые мишени для противоопухолевой терапии.

Цель данного обзора — освещение современных знаний о перекрестном взаимодействии процессов аутофагии и ЭМП в развитии опухолевой прогрессии и суммирование данных, поддерживающих параллельное регулирование этих двух процессов через общие пути сигнализации.

Ключевые слова: эпителиально-мезенхимальный переход, аутофагия, метастазирование, опухолевая прогрессия

Для цитирования: Рябая О.О., Прокофьева А.А. Взаимодействие аутофагии и эпителиально-мезенхимального перехода в развитии опухолевой прогрессии. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(2):8–19.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-2-8-19



The interplay of autophagy and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer progression

O.O. Ryabaya, A.A. Prokofieva

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

Autophagy and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) are the main biological processes involved in tumor progression, and are closely linked. On the one hand, activation of autophagy provides energy and essential nutrients for EMT during the metastases spreading, which is required for tumor cells survival in adverse environmental conditions. On the other hand, autophagy, acting as a tumor suppressor, tends to inhibit metastasis by selectively suppressing the transcription factors of EMT in the early stages. Therefore, inhibition of EMT by inhibitors or inducers of autophagy may be a new strategy for antitumor therapy.

Thus, the aim of this review is to highlight current knowledge about the crosstalk between autophagy and EMT processes in tumor progression and to summarize data supporting the necessity of parallel regulation of two processes through signaling pathways.

Key words: epithelial-to-mesenchymal transition, autophagy, metastasis, tumor progression

For citation: Ryabaya O.O., Prokofieva A.A. The interplay of autophagy and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. Uspekh molekul'noy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2020;7(2):8–19. (In Russ.).

Введение

Несмотря на успехи в лечении злокачественных новообразований в последние годы, проблема возникновения резистентности к существующей терапии и дальнейшей опухолевой прогрессии требует изучения биологии опухолевой клетки. Опухолевая прогрессия позволяет опухолевым клеткам преодолевать неблагоприятные условия и физиологические барьеры, сдерживающие рост, за счет приобретения новых функций. Аутофагия и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) являются основными биологическими

процессами в опухоли [1, 2]. ЭМП представляет собой механизм инвазии и метастазирования опухолей, в результате которого эпителиальные клетки теряют апикально-базальную полярность и межклеточные контакты с последующей реорганизацией цитоскелета с приобретением мезенхимального фенотипа [3, 4]. Ключевым событием в процессе ЭМП является так называемое переключение кадгеринов (cadherin switch) — снижение экспрессии центральной молекулы межклеточных адгезионных контактов E-кадгерина и повышение уровня N-кадгерина, характерного

для мезенхимальных клеток. Кроме этого, опухолевые клетки секретируют повышенное количество матрикс-деградирующих протеаз для разрушения внеклеточного матрикса и облегчения миграции клеток. Клетки с мезенхимальным фенотипом более устойчивы к ингибиторам EGFR и PI3K/AKT [5]. Лекарственная устойчивость к таким препаратам, как гемцитабин, 5-фторурацил, цисплатин и адриамицин, соответствует уровням ZEB1 и TWIST и отрицательно коррелирует с экспрессией E-кадгерина [6]. Гиперэкспрессия TWIST, SNAIL и FOXC2 в клетках рака молочной железы не только обеспечивает активацию программы ЭМП опухолевых клеток, но и повышает регуляцию транскрипции ABC-транспортеров [7].

Аутофагия – эволюционно сложившийся процесс лизосомальной утилизации белков и органелл для поддержания своего гомеостаза и жизнедеятельности при неблагоприятных условиях [8]. Аутофагия служит самозащитным средством, позволяя опухолевым клеткам выживать при нехватке питательных веществ, энергии или гипоксии, предотвращая накопление токсинов внутри клетки [9]. Аутофагия на базальном уровне регулируется определенными набором сигнальных молекул во всех клетках организма и индуцируется различными стимулами. В формировании и утилизации аутофагосом участвуют эволюционно консервативные гены, связанные с аутофагией (autophagy-related genes, ATG) [10]. Данный процесс разделяется на несколько стадий: образование фагофоры, ее элонгация, образование (созревание) аутофагосомы, синтез аутолизосомы и ее деградация [11]. Инициация начинается с активации комплекса ULK1 (также известного как ATG1), включающего ULK1, ULK2, ATG13, FIP200 и ATG101. Данный комплекс активирует комплекс PI3K III класса: VPS15, VPS34/PIK3C3, ATG14, Beclin 1, UVRAG, AMBRA1, все из которых связаны с Beclin 1 [12]. Комплекс ATG5–ATG12 образует конъюгат с ATG16 для элонгации мембраны аутофагосом. Цитозольная форма LC3-I и GABARAP при участии белков ATG7, ATG3 и ATG12–ATG5–ATG16 образуют комплекс с фосфатидилэтаноламином, который встраивается в мембрану фагофоры, вследствие чего получается форма LC3-II белка, непосредственно связанная с мембраной аутофагосомы [11]. LC3-II постоянно присутствует в аутофагосоме и считается самым надежным маркером аутофагии. Белок p62/SQSTM1 связывает убиквитин на поверхности поврежденных компонентов и доставляет их в аутофагосомы путем связывания с белком LC3-II [13].

Аутофагия может как способствовать опухолевому росту, так и подавлять его, что зависит от типа клеток и тканей, а также от стадий опухолевого процесса. Различные исследования подчеркивают ключевую роль аутофагии в модуляции подвижности опухолевых клеток и инвазии, лекарственной устойчивости и иммунологическом надзоре, определяющие метастатический успех злокачественных клеток [14, 15]. Наоборот,

аберрантная аутофагия может приводить к неконтролируемой деградации белков и органелл, которые необходимы для поддержания выживаемости опухолевых клеток, что в конечном итоге приводит к их гибели [16]. Аутофагия способствует разрушению фокальной адгезии, опосредованной взаимодействием белка LC3 с паксиллином – ключевым компонентом фокальной адгезии – за счет фосфорилирования паксиллина онкогенным SRC, что в конечном итоге приводит к опухолевой миграции и метастазированию [17]. Более того, рецептор NBR1 также участвует в нарушении фокальной адгезии в клетках, что свидетельствует о том, что селективная аутофагия позволяет специфически отключать белки адгезии во время миграции [18]. Аутофагия необходима для мобильности опухолевых клеток, поскольку ее ингибирование блокирует их миграцию и инвазию *in vitro* и уменьшает количество метастазов *in vivo* [17].

Сигнальные пути, связанные с ЭМП, оказывают влияние на аутофагию. В свою очередь, активация аутофагии может подавлять или способствовать ЭМП, регулируя различные сигнальные пути [15, 19]. Так, M. Gugnoni и соавт. показали, что, с одной стороны, клетки, подвергающиеся программе ЭМП, нуждаются в активации аутофагии для выживания во время метастатического распространения [15]. Было продемонстрировано, что ЭМП-подобный фенотип соответствует более высокому уровню аутофагии, а сочетание ингибитора аутофагии хлорокина с противоопухолевыми препаратами приводит к подавлению ЭМП при раке почки [20]. С другой стороны, аутофагия выступает в роли онкосупрессора и предотвращает раннее метастазирование, тем самым ограничивая приобретение ЭМП-фенотипа опухолевыми клетками [15]. Было показано, что индукция аутофагии путем голодания или добавления рапамицина (ингибитора mTOR) приводит к уменьшению миграции и инвазии клеток глиобластомы. Ингибирование аутофагии за счет подавления экспрессии генов *ATG5*, *ATG7* или *Beclin 1* приводит к увеличению подвижности и инвазивности клеток, ассоциированной с активацией SNAIL и SLUG, основными транскрипционными факторами процесса ЭМП [21]. I. Akalau и соавт. показали, что приобретение ЭМП-фенотипа в клетках рака молочной железы MCF7 связано с ослаблением иммунного ответа и повышенной аутофагией. Инактивация Beclin 1 и соответствующее ингибирование аутофагии восстанавливают чувствительность к цитотоксическим Т-лимфоцитам, предполагая, что аутофагия играет определенную роль в преодолении иммунного ответа опухолевыми клетками в процессе ЭМП [22]. Несмотря на то что инактивация аутофагии не приводила к снижению миграционной способности клеток гепатоцеллюлярного рака и рака легкого, она снижала их резистентность к терапии и способность к колониеобразованию [23]. Другими авторами показано, что селективная инактивация специфических белков ЭМП

является основным молекулярным механизмом, благодаря которому аутофагия контролирует процесс ЭМП. Транскрипционные факторы TWIST1, SNAIL и SLUG – активаторы процесса ЭМП [24]. Ингибирование аутофагии при плоскоклеточной карциноме и меланоме приводит к активации TWIST1 и, соответственно, ЭМП *in vitro* и *in vivo*. Стабилизация TWIST1 в опухолевых клетках в этом случае опосредуется накоплением убиквитинилирующего белка SQSTM1/p62, который является мишенью аутофагии. SQSTM1/p62 связывается к TWIST1 и предотвращает его деградацию в протеасомах или аутофагосомах [25]. Ингибирование аутофагии посредством антималярийного препарата хлорокина приводит к усилению цитотоксичности цисплатина при назофарингеальной карциноме и темсиролимуса при светлоклеточном раке почки, а также предотвращает ЭМП [20, 26]. Недавно была исследована прогностическая значимость маркеров аутофагии и ЭМП LC3B, E-кадгерина и виментина в предсказании общей выживаемости у пациентов с карциномой

желудка, гастроинтестинальными опухолями и раком почки [27].

Цель обзора – освещение последних данных о взаимодействии двух процессов ЭМП и аутофагии в опухоли и их совместной роли в опухолевой прогрессии.

Механизмы взаимодействия аутофагии и эпителиально-мезенхимального перехода

Среди множества механизмов выделяют ряд наиболее важных сигнальных каскадов, вовлеченных в активацию как аутофагии, так и процесса ЭМП: сигнальные пути PI3K/AKT/mTOR и JAK/STAT. В процессе ЭМП есть несколько сигнальных молекул, в том числе Beclin 1, WNT, NF-κB, TGF-β, и транскрипционные факторы MiT/TFE, ZEB, TWIST, SNAIL, которые играют решающую роль и в аутофагии (рис. 1). Кроме этого, последние наблюдения демонстрируют, что функциональное взаимодействие между цитоскелетом и митохондриями также является важнейшим регуляторным механизмом в процессах аутофагии и ЭМП.

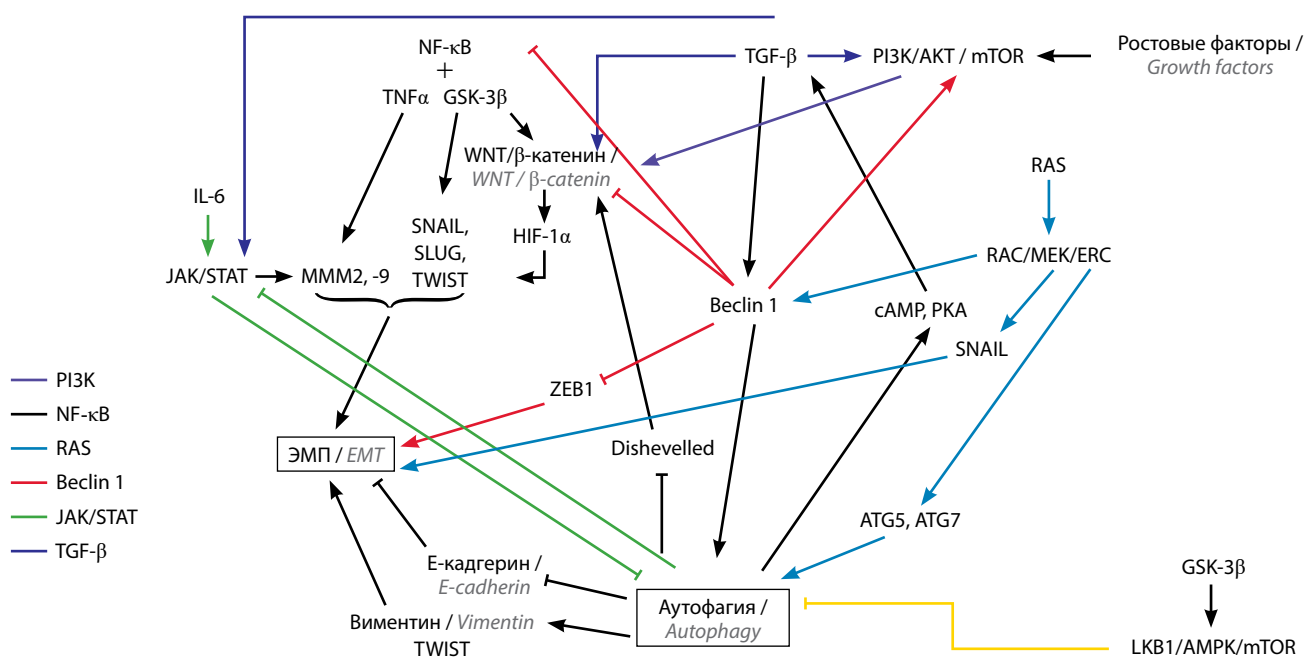


Рис. 1. Взаимодействие основных белков аутофагии и эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) в развитии опухолевой прогрессии. Активация PI3K индуцируется взаимодействием с рецепторами фактора роста, прямым связыванием с RAS, активацией NF-κB и TGF-β. Активация сигнального пути PI3K/AKT/mTOR блокирует аутофагию. Путь PI3K/AKT положительно регулирует WNT/β-катенин за счет фосфорилирования β-катенина и GSK-3β, увеличивая уровни внутриклеточного β-катенина и снижая уровни E-кадгерина. Активация PI3K/AKT усиливает ядерные факторы SNAIL и SLUG, способствуя активации ЭМП. GSK-3β напрямую индуцирует аутофагию, активируя LKB1/AMPK и подавляя путь PI3K/AKT/mTOR. LKB1/AMPK препятствует ЭМП, ингибируя активность SMAD2/3 и TGF-β. Мутация белка RAS приводит к активации аутофагии и усилению ЭМП. Активация белка JAK/STAT стимулируется IL-6, что приводит к усилению экспрессии MMP-2 и SNAIL, активации ЭМП и подавлению аутофагии. Индукция аутофагии препятствует ЭМП посредством подавления передачи сигналов JAK/STAT (адаптировано из [14, 28] с разрешения авторов)

Fig. 1. Crosslink between autophagy and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in tumor progression. PI3K activation is induced by interaction with a growth factor receptor, direct binding to RAS, activation of NF-κB and TGF-β. Activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway blocks autophagy. The PI3K/AKT pathway positively regulates WNT/β-catenin through phosphorylating β-catenin and GSK-3β, which increases intracellular β-catenin and decreases E-cadherin. The PI3K/AKT pathway activity up-regulates nuclear factors SNAIL and SLUG, contributing to EMT activation. GSK-3β directly induces autophagy by activating LKB1/AMPK and prohibiting the PI3K/AKT/mTOR pathway by inhibiting SMAD2/3 and TGF-β activity. RAS protein mutation results in autophagy activation and EMT enhancement. JAK/STAT signaling pathway regulated autophagy and EMT. Activation of JAK/STAT protein is stimulated by IL-6, leading to the up-regulation of the expression of MMP-2 and SNAIL, activation of EMT and autophagy inhibition. Autophagy induction hinders EMT through suppressing JAK/STAT signaling (adapted from [14, 28] with permission of the authors)

Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR

Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR представляет собой серин-треониновые киназы, контролируемые ряд важных клеточных функций. Изменения в активности белка mTOR оказывают существенное влияние на трансляцию, транскрипцию и разрушение белка, перестройку цитоскелета, клеточный метаболизм и аутофагию [29]. Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR играет важную роль в ЭМП. Подавление сигнального пути PI3K/AKT/mTOR может разрушать β -катенин и ингибировать ЭМП за счет увеличения E-кадгерина и снижения N-кадгерина и миграции опухолевых клеток [30]. Активация PI3K/AKT приводит к повышенной экспрессии мезенхимальных белков, репрессии E-кадгерина и усиленной миграции клеток меланомы [31]. Активация PI3K/AKT/mTOR связана с ЭМП-стимулирующим эффектом TGF- β [24]. Каталитическая субъединица mTOR входит в состав комплексов mTORC1 и mTORC2, каждый из которых может быть активирован передачей сигналов TGF- β . TGF- β способствует увеличению размера клеток, что необходимо для поддержания миграции клеток и инвазии [32]. Этот эффект опосредуется mTORC1, который фосфорилирует и активирует киназу S6K1 и 4E-связывающий белок 1 (4E-BP1), оба из которых являются прямыми регуляторами инициации трансляции [33]. TGF- β также индуцирует активность киназы mTORC2, которая требуется во время фазы завершения ЭМП. Потеря активности mTORC2 нарушает диссеминацию раковых клеток и образование метастазов у мышей [32]. Кроме этого, mTORC2 способствует клеточной инвазии посредством SNAIL-зависимой активации матриксной металлопротеиназы (MMP) 9 [34]. Было обнаружено, что активация сигнального пути PI3K/AKT/mTOR может приводить к изменениям ЭМП при плоскоклеточном раке языка [35]. PI3K/AKT положительно регулирует WNT/ β -катенин путем фосфорилирования β -катенина [36]. Кроме этого, сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR индуцируется факторами роста, способствующими развитию метастазирования клеток и ЭМП за счет активации NF- κ B, SNAIL и SLUG и стимулирования (MMP) для разрушения клеточного матрикса. ЭМП может возникать при длительной активации NF- κ B даже при отсутствии TGF- β [37].

Активация пути PI3K/AKT/mTOR регулирует аутофагию. Комплекс mTORC1 приводит к фосфорилированию и последующей инактивации серин-треониновой киназы ULK1, которая регулирует образование аутофагосом и, соответственно, всего процесса аутофагии [38]. Одновременно активируя ЭМП через SMAD-зависимые и SMAD-независимые пути, TGF- β может сдерживать аутофагию. Инактивация mTOR индуцирует аутофагию, которая, в свою очередь, приводит к снижению миграционной способности и инвазии клеток глиобластомы, тогда как отключение аутофагии за счет микроРНК к ATG5, ATG7 приводит к увеличению клеточной подвижности и инвазии [21].

Активация аутофагии путем ингибирования mTOR ослабляет миграцию и инвазию клеток рака желчного пузыря [39]. Так, метформин может подавлять пролиферацию, миграцию и ЭМП путем ингибирования передачи сигналов mTOR и стимуляции аутофагии в клеточных линиях рака щитовидной железы [40].

АМПК является ключевым регулятором метаболизма на клеточном и организменном уровнях, представляя энергетический сенсор клетки. АМПК играет ключевую роль в поддержании клеточных функций в условиях ограниченной энергии. Активированный АМПК передает сигнал на mTOR – центральный контролер роста и пролиферация клеток – и тем самым ингибирует синтез глюкозы, липидов, белков и рост клеток [41]. Активация LKB1/АМПК играет ключевую роль в стимулировании аутофагии за счет снижения фосфорилирования mTOR и нижестоящей p70s6k, что ограничивает активность PI3K/AKT/mTOR [42]. GSK-3 β является многофункциональной протеинкиназой, которая активирует LKB1/АМПК и, в свою очередь, инактивирует PI3K/AKT/mTOR [43]. Она также косвенно активирует аутофагию через гидролиз β -катенина с последующей активацией LKB1/АМПК и ингибированием mTOR. Нокдаун β -катенина способен усиливать апоптоз и аутофагию через активацию пути LKB1/АМПК и подавление сигналинга PI3K/AKT/mTOR при плоскоклеточном раке головы и шеи [44].

Таким образом, малотоксичные препараты, которые нацелены на ЭМП-связанный путь PI3K/AKT/mTOR, являются актуальной мишенью терапии [39]. В настоящее время исследуется ряд препаратов, направленных на PI3K/AKT/mTOR-путь: куркумин, BEZ235 [45, 46]. BEZ235 значительно повышал радиочувствительность, подавляя сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR [46].

Сигнальный путь JAK/STAT

Сигнальный путь JAK/STAT оказывает значительное влияние на основные клеточные механизмы, такие как пролиферация, инвазия, выживание, воспаление и иммунитет, через индукцию программы ЭМП и ингибирование аутофагии. Транскрипционный фактор TWIST1 является ключевым регулятором активации ЭМП. Ингибирование STAT3 уменьшает инвазию и предотвращает образование метастазов опухолей. Было показано, что JAK/STAT может передавать внеклеточные сигналы к ядру путем активации тирозинкиназных рецепторов и транскрипции активирующих таргетных генов, что приводит к запуску ЭМП за счет активации интерлейкина 6 (IL-6), регуляции MMP-2 и увеличения экспрессии SNAIL [47]. Кроме этого, ингибиторы JAK/STAT-пути WP1066 и овододиолит предотвращали IL-6-опосредованную активацию данного пути, что приводило к подавлению развития рака носоглотки путем стимулирования апоптоза и ингибирования транскрипционных факторов ЭМП

TWIST и SNAIL [48]. С другой стороны, IL-6-опосредованный сигнальный путь JAK/STAT ускоряет процесс канцерогенеза за счет подавления аутофагии [49]. Результаты недавних исследований показали, что ресвератрол может индуцировать аутофагию и предотвращать миграцию клеток рака яичников путем ингибирования IL-6-зависимого JAK/STAT-сигналинга. Кроме этого, кверцетин вызывает аутофагию путем ингибирования пути STAT3 при лимфоме [50, 51]. Таким образом, активаторы аутофагии могут быть использованы для предотвращения ЭМП путем подавления JAK/STAT-сигналинга.

Сигнальный путь Beclin 1

Beclin 1 является гомологом гена дрожжей *ATG6/VPS30*, который связывается с *VPS34* (каталитическая субъединица PI3K III класса), образуя комплекс для индукции аутофагии. С одной стороны, Beclin 1 подавляет ЭМП посредством инактивации ZEB1, WNT1 и NF-κB. С другой стороны, Beclin 1-индуцированная аутофагия запускает программу ЭМП, повышая экспрессию виментина и TWIST и снижая экспрессию E-катгерина [14]. Beclin 1 использовался в качестве независимого биомаркера для прогнозирования общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования у пациентов с раком желудка и печени [52]. Низкая экспрессия Beclin 1 в образцах аденокарциномы желудка коррелировала с более агрессивным фенотипом опухоли и снижением показателей общей и безрецидивной выживаемости [53]. Тем не менее гиперэкспрессия Beclin 1 может вызвать гибель клеток [54].

Результаты недавних исследований показали, что нокдаун Beclin 1 приводит к тому, что опухолевые клетки щитовидной железы теряют свои эпителиальные свойства и приобретают мезенхимальные за счет стабилизации мРНК ZEB1. Таким образом, существует отрицательная корреляция между Beclin 1 и ZEB1 при раке щитовидной железы [55].

Результаты дальнейших исследований показали, что нокаут или низкая экспрессия гена *Beclin 1* может способствовать ЭМП и канцерогенезу путем активации WNT-сигнального пути, что ассоциировано с плохим прогнозом течения заболевания [56]. Нокдаун Beclin 1 посредством микроРНК значительно ингибировал активацию рапамицининдуцированной аутофагии, подавляя ЭМП и инвазивность клеток рака толстой кишки за счет снижения экспрессии виментина и TWIST и увеличения экспрессии E-катгерина [57]. В другой работе показано, что индукция аутофагии, вызванная ингибированием пути mTOR, приводит к уменьшению миграции и инвазии клеток глиобластомы, в то время как подавление аутофагии за счет микроРНК *ATG5*, *ATG7* или Beclin 1 способствовало увеличению подвижности и инвазивности клеток. Активация аутофагии приводит к снижению регуляции SNAIL и SLUG, двух основных факторов процесса ЭМП [21].

Таким образом, регуляция Beclin 1-индуцированной аутофагии может рассматриваться как перспективная противоопухолевая стратегия.

Сигнальный путь WNT

Существуют классический (канонический) и неклассический (неканонический) пути WNT, которые участвуют в процессе ЭМП. Аутофагия может подавлять ЭМП путем деградации белка TWIST1 и ингибирования WNT. В классическом пути WNT/β-катенин активирует HIF-1α-индуцированный ЭМП за счет связывания с внутриклеточным доменом E-катгерин. При этом гипоксия или гиперэкспрессия HIF-1α стимулирует ЭМП и способствует приобретению метастатического фенотипа клеток. HIF-1α усиливает экспрессию TWIST, SLUG и SNAIL и, следовательно, активацию программы ЭМП [58]. Сниженная активность аутофагии в клетках приводит к стабилизации TWIST1 за счет накопления p62/SQSTM1: деградация TWIST1 блокируется за счет взаимодействия между p62/SQSTM1 и TWIST1 в аутофагосомах и протеасомах. TWIST является ключевым регулятором p62/SQSTM1, таким образом, предполагается, что p62-опосредованная стабилизация TWIST1 может быть стратегией профилактики и лечения рака [59]. В клеточных линиях рака толстой кишки гиперэкспрессия SNAIL увеличивает экспрессию генов-мишеней сигнального пути WNT за счет взаимодействия между SNAIL-N и β-катенином, что активирует экспрессию нижестоящих мишеней WNT-пути, приводя к положительной обратной связи WNT-сигналинга [14].

Dishevelled (Dvl) – основной компонент передачи сигналов от WNT как в β-катениноопосредованном каноническом, так и в β-катениннезависимом неканоническом пути [60]. Экспрессия Dvl отрицательно регулируется аутофагией на поздних стадиях развития опухоли, что, в свою очередь, тормозит WNT. Опухолевый супрессор GABARAP1 через p62/SQSTM1 способен разрушать Dvl2. GABARAP1-опосредованное подавление Dvl2 блокируется при введении 3-метиладенина, специфического ингибитора аутофагии [61]. Кроме этого, GABARAP представляет собой цитоплазматический кадгерин 6 (CDH6), который участвует в ЭМП. Результаты исследований показали, что подавление CDH6 предотвращает ЭМП и уменьшает метастазирование клеток рака щитовидной железы, что сопровождается индукцией аутофагии [62].

Таким образом, изучение взаимодействия между Dvl, ингибированием WNT-сигналинга и индукцией аутофагии может способствовать открытию новых мишеней для лечения рака [14].

Сигнальный путь NF-κB

NF-κB является еще одним важным регулятором ЭМП за счет активации транскрипционных факторов SNAIL1, SLUG, TWIST1. Его активация связана с агрессивностью и метастатическим потенциалом

опухоли [63]. Он ингибирует аутофагию за счет подавления Beclin 1 и активирует ряд маркеров ЭМП. Однако аутофагия может подавлять сигналинг NF-κB путем регуляции экспрессии MMP. Сам NF-κB может либо стимулировать, либо препятствовать аутофагии. С одной стороны, NF-κB подавляет Beclin 1-зависимую аутофагию [64]. При этом подавление NF-κB значительно снижает пролиферацию клеток гепатокарциномы, что связано с усилением аутофагии [65]. С другой стороны, активные формы кислорода (АФК) оказывают влияние на клеточную трансформацию, метастазирование и ответ на терапию при различных стадиях развития опухоли, что стимулируется NF-κB-зависимой аутофагией [66]. Тем не менее активация аутофагии может подавлять передачу сигналов АФК-NF-κB, необходимую для активации MMP-2 и MMP-9, способствуя ингибированию ЭМП [67]. Таким образом, активаторы аутофагии могут быть использованы для нарушения сигналинга NF-κB, следовательно, подавления ЭМП и опухолевой прогрессии.

Сигнальный путь TGF-β

TGF-β представляет собой многофункциональный цитокин, участвующий в регуляции множества клеточных функций [24]. TGF-β главным образом выступает онкосупрессором, подавляя рост клеток и индуцируя апоптоз. Однако TGF-β, секретируемый как опухолевыми клетками, так и стромальным микроокружением, является одним из наиболее важных индукторов ЭМП за счет взаимодействия со SMAD и активации экспрессии транскрипционных факторов SNAIL, SLUG и TWIST1, которые, в свою очередь, управляют «переключением кадгерин» [24, 68]. Помимо активации SMAD, сигналинг TGF-β передается внутри клеток посредством активации других неканонических сигнальных путей, включая p38/JNK, PI3K/AKT/mTOR и MAPK. TGF-β запускает аутофагию, стимулируя экспрессию мРНК ATG-генов. При этом аутофагия усиливает экспрессию TGF-β за счет активации циклического аденозинмонофосфата (сAMP) и протеинкиназы A (PKA), что ведет к запуску ЭМП. После активации TGF-β транскрипционный фактор STAT3 взаимодействует с Ras, индуцируя экспрессию SNAIL и способствуя программе ЭМП [69].

TGF-β оказывает двойное действие на развитие и прогрессию опухоли, что зависит от типа клеток и микроокружения [70]. С одной стороны, TGF-β стимулирует инвазию клеток карциномы путем индукции аутофагии, при этом ингибирование аутофагии 3-метиладенином может эффективно обращать этот процесс [71]. С другой стороны, TGF-β стимулирует экспрессию Beclin 1, ATG5, ATG7, приводя к накоплению аутофагосом и, соответственно, активируя процесс аутофагии, что потенцирует индукцию проапоптотического белка Bim из семейства Bcl-2 и способствует Bim-опосредованному апоптозу [72]. Стоит отметить, что аутофагия

активирует TGF-β-зависимый ЭМП в клетках гепатоцеллюлярного рака за счет запуска передачи сигналов сAMP/PKA/CREB, которая основана на деградации фосфодиестеразы 4A (PDE4A) [73].

TGF-β индуцирует ЭМП через активацию CDH6 в нормальных и опухолевых клетках. Подавление CDH6 восстанавливает ЭМП фенотип и сдерживает миграцию и инвазию клеток рака щитовидной железы [74], а также вызывает GABARAP-опосредованную активацию аутофагии [15]. Активация аутофагии наблюдается при подавлении CDH6 и связана в том числе с репрессией фосфорилирования AKT.

Таким образом, можно предположить, что TGF-β способен как активировать, так и подавлять аутофагию, и выбор может зависеть от типа клеток и стадии опухолевой прогрессии. На ранних этапах образования опухоли TGF-β способствует аутофагии как часть TGFβ-онкосупрессивной программы. Позднее, при прогрессии опухоли, TGF-β сдерживает аутофагию, вызывая ЭМП и метастатическое распространение опухолевых клеток.

Микрофталмия-ассоциированный транскрипционный фактор

Биогенез лизосом и аутофагосом регулируется семейством транскрипционных факторов MiT/TFE, к которому относятся TFE3, TFEB и микрофталмия-ассоциированный транскрипционный фактор (MITF). Активность белков семейства MiT/TFE регулируется посредством mTORC1-фосфорилирования. При неблагоприятных условиях происходит инактивация mTORC1 и, следовательно, дефосфорилирование TFE3, TFEB и MITF, после чего белки перемещаются из цитоплазмы в ядро, где они стимулируют экспрессию сотен генов, что приводит к лизосомальному биогенезу и индукции аутофагии (рис. 2) [75]. Наибольшая экспрессия факторов MiT/TFE отмечается при меланоме, раке почки и раке поджелудочной железы [28]. Повышенная экспрессия факторов MiT/TFE коррелировала с увеличением размера аутофагосом и лизосом при раке поджелудочной железы. Кроме этого, нокдаун TFE3, TFEB или MITF вызывает подавление аутофагии и лизосомассоциированных генов-мишеней при раке поджелудочной железы [28].

MITF является ключевым регулятором дифференциации меланоцитов из нервного гребня. Экспрессия MITF коррелирует с экспрессией меланосомных генов как в образцах опухоли, так и в клеточных линиях меланомы человека. Экспрессия MITF, TFEB и TFE3 также коррелирует с экспрессией лизосомальных и аутофагосомальных генов в образцах меланомы. Тем не менее экспрессия TFE3 и TFEB отрицательно коррелирует с экспрессией MITF в меланоме. Так, TFEB и TFE3 регулируют экспрессию лизосомальных и аутофагосомальных генов в ответ на неблагоприятные факторы, включая голодание, а MITF участвует в регулировании этого ответа в меланоцитах и клетках

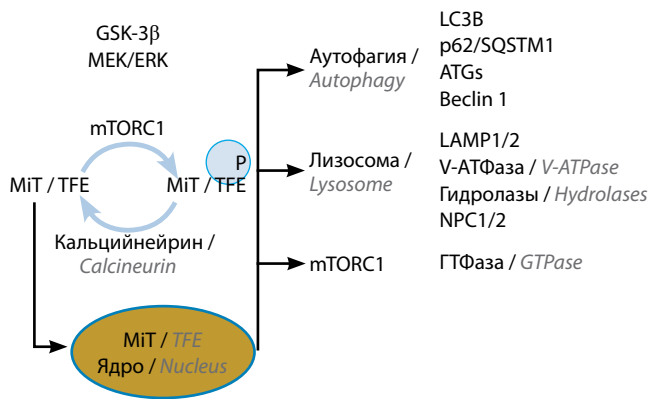


Рис. 2. Регуляция транскрипционных факторов MiT/TFE. Белки MiT/TFE негативно регулируются посредством фосфорилирования консервативных сериновых остатков за счет mTORC1, а также GSK-3β и ERK. Дефосфорилирование с помощью кальцийнейрина обеспечивает ядерную транслокацию белков MiT/TFE и последующее связывание с генами-мишенями. Сигнальные пути и клеточные процессы, регулируемые факторами MiT/TFE, включают аутофагию, лизосомальный биогенез и передачу сигналов mTORC1 через активацию ГТФазы RagD (адаптировано из [14, 28] с разрешения авторов)

Fig. 2. Regulation of MiT/TFE transcription factors. MiT/TFE proteins are negatively regulated through phosphorylation of conserved serine residues by mTORC1 as well as GSK-3β and ERK. Dephosphorylation by calcineurin enables the nuclear translocation of MiT/TFE proteins and consequent binding to their target genes. Signal pathways and cellular processes regulated by MiT/TFE factors include autophagy, lysosomal biogenesis, and mTORC1 signaling through upregulation of RagD GTPase (adapted from [14, 28] with permission of the authors)

меланомы. Нокдаун MITF приводит к снижению клеточной старвации, по-видимому, за счет меньшего образования аутофагосом. При этом экспрессия лизосомальных и аутофагосомальных генов снижалась при нокдауне MITF [76]. Факторы MiT/TFE способствуют расщеплению молекул, доставляемых в лизосомы в результате аутофагии или макропиноцитоза, которые далее могут служить источником питательных веществ для опухолевых клеток. Профилирование метаболитов при отсутствии TFE3 выявило заметное снижение уровня аминокислот и продуктов их распада. Клетки аденокарциномы поджелудочной железы, гиперэкспрессирующие TFE3 или MITF, были способны поддерживать активность mTORC1 и имели повышенный клоногенный рост по сравнению с контролем при культивировании в среде с низким содержанием аминокислот. Таким образом, повышенная активность аутофагии и лизосом позволяет клеткам рака поджелудочной железы преодолевать нехватку аминокислот [28].

Роль MITF в программе ЭМП является сложной. При раке почки отмечается нарушение WNT-сигналинга, однако роль этого изменения в прогрессировании заболевания остается неясной [77]. Транскриптомный анализ образцов опухолей почки, полученных от *Tfeb*-трансгенных мышей, выявил значительную индукцию компонентов сигнального пути WNT и таргетных генов-мишеней (*Ccnd1* и *cMyc*). Кроме этого, наблюдалось повышение уровня белка β-катенина и инактивация GSK-3β в ряде опухолей. Применение

ингибиторов сигнального пути WNT значительно снизило рост опухоли. Таким образом, инактивация передачи сигналов WNT может быть терапевтическим подходом при TFE3-зависимом раке почки [78]. MITF является онкосупрессором, вызывая арест клеточного цикла в нормальных меланоцитах и способствуя апоптозу [79]. С другой стороны, высокий уровень MITF снижает инвазию, но при этом вызывает пролиферацию опухолевых клеток [28]. TWIST и ZEB в меланоцитах активируют MITF для индукции путей дифференцировки клеток [80]. Транскрипционная активность антиапоптотического семейства Bcl-2 связана с высокими уровнями MITF [80, 81]. Другие данные свидетельствуют о том, что клетки с низкой экспрессией MITF обладают большим потенциалом для инвазии и уменьшение экспрессии MITF *in vitro* способствует большей инвазии меланомы [82]. Недавно было показано, что MITF подавляет инвазию путем уменьшения внутриклеточных пулов гуанозинтрифосфата (ГТФ) путем индукции гуанозинмонофосфата (ГМФ) редуктазы [83]. Эти данные привели к общему мнению, что MITF обладает дозозависимым эффектом на рост меланомы: высокие уровни экспрессии связаны с выживанием и пролиферацией, а низкая экспрессия – с инвазией [80]. Таким образом, роль транскрипционных факторов семейства MiT/TFE в программе ЭМП требует дальнейшего изучения.

Сигнальный путь RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK)

Белок RAS представляет собой ГТФазу, которая регулирует последующую активацию сигнальных путей, включая MAPK и PI3K, и вовлечена в прогрессирование меланомы [84]. Нижестоящий белок BRAF представлен мутантной формой в 50–70 % случаев меланомы и в 5–15 % случаев колоректального рака и рака щитовидной железы. BRAF-активация может индуцировать подвижность клеток меланомы; его активация связана с увеличением экспрессии TWIST и ZEB, что приводит к большей инвазии меланомных клеток [85]. Кроме этого, мутация BRAF потенцирует путь NF-κB, который, в свою очередь, стимулирует экспрессию MMP, увеличивая миграционную способность и индуцируя экспрессию SNAIL, известного драйвера метастазирования [86]. Митогенактивированная протеинкиназа киназа (MEK) является нисходящим эффектором BRAF и потенциальной мишенью для терапии меланомы [87]. Однако недавние данные свидетельствуют о том, что ингибирование MEK может фактически увеличить инвазивный потенциал в меланоме [88].

В BRAF-мутированных опухолях аутофагия активируется как защитный механизм в ответ на клеточные стрессы [89]. Результаты исследований показали, что ингибирование MAPK-сигнального каскада стимулировало аутофагию через активацию ключевого регулятора метаболизма AMPK [90, 91]. При низком содержании глюкозы в среде AMPK фосфорилирует ULK1,

приводя к образованию аутофагосом и инициации аутофагии. Наоборот, в условиях высокой доступности питательных веществ mTOR фосфорилирует ULK1, предотвращая его взаимодействие с AMPK [91]. В доклинических исследованиях ингибитор MEK1/2 киназы траметиниб в сочетании с ингибитором аутофагии хлорокином продемонстрировал синергизм действия на моделях рака поджелудочной железы, колоректального рака и меланомы с мутациями RAS и BRAF [90]. Аутофагия служит адаптивным механизмом выживания и миграции BRAF-мутированных опухолевых клеток [89].

Взаимодействие цитоскелета и митохондрий

Перестройка цитоскелета имеет решающее значение в движении клеток и поддержании процесса ЭМП. Цитоскелет состоит из актиновых филаментов, микротрубочек и промежуточных филаментов, которые связаны со свойствами митохондриальной сети и различными функциями митохондрий [14].

Изменения в профиле молекул адгезии во время ЭМП определяют активацию полимеризации актина и образование неполяризованных волокон [92]. Эти структуры цитоскелета необходимы для поддержания движения клеток и выдерживания механического напряжения при потере межклеточных взаимодействий и взаимодействий клеток с внеклеточным матриксом (рис. 3) [93]. Перестройка цитоскелета является не просто следствием активации процесса ЭМП, а играет регулирующую роль в данном процессе. Демполимеризация актинового цитоскелета уменьшает размер клетки, меняет ее форму и меняет фенотип ЭМП в опухолевых клетках [94, 95]. Кроме этого, демполимеризация актиновых филаментов индуцирует транслокацию SNAIL из ядра в цитоплазму, что приводит к повышению экспрессии E-кадгерина и торможению ЭМП [94].

Митохондрии – многофункциональные органеллы, которые опосредуют преобразование энергии и являются важными регуляторами сигнальных путей, связанных с прогрессией опухоли [96]. Взаимодействие цитоскелета и митохондрий играет важную роль в клеточной подвижности. Помимо их морфологической пластичности митохондрии обладают способностью перемещаться по клетке к сайтам, где их энергетическая поддержка требуется в данный момент. Движение и локализация митохондрий внутри клеток опосредуются их взаимодействием с цитоскелетом [96]. Взаимодействие митохондрий с микротрубочками и актиновыми филаментами позволяет митохондриям перемещаться по клетке, в то время как взаимодействие с промежуточными филаментами необходимо для остановки митохондрий в определенных клеточных участках. Присутствие митохондрий у клеточной мембраны обуславливает образование филоподий и ламеллоподий, необходимых для движения клеток во время ЭМП [96, 97]. Актин и мембранно-цитоскелет-

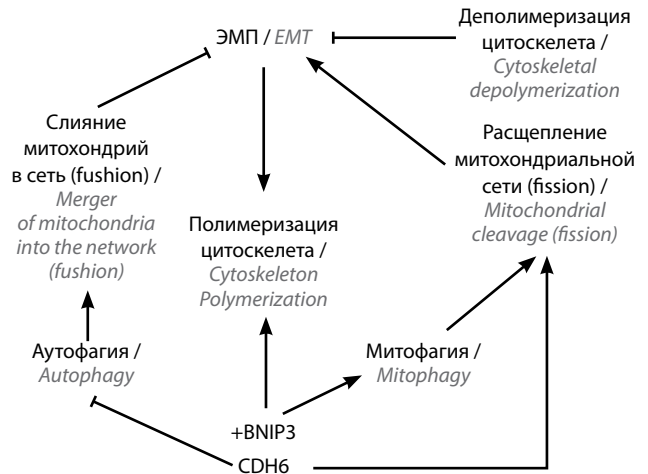


Рис. 3. Взаимодействие цитоскелета и митохондрий. Полимеризация цитоскелета индуцируется процессом эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), который, в свою очередь, обеспечивает расщепление митохондриальной сети (fission), необходимое для дальнейшего поддержания процесса ЭМП. Демполимеризация цитоскелета предотвращает ЭМП. Активация аутофагии вызывает слияние митохондрий (fusion) и восстановление митохондриальной сети и противодействует ЭМП. Митохондриальный белок BNIP3 участвует напрямую в разделении митохондриальной сети за счет полимеризации цитоскелета или опосредованно за счет активации митофагии путем связывания как с митохондриями, так и с аутофагосомным белком LC3. Взаимодействие между BNIP3 и CDH6 вызывает ЭМП, сдерживает аутофагию и способствует разделению митохондриальной сети (адаптировано из [14, 28] с разрешения авторов)

Fig. 3. Interaction between cytoskeleton and mitochondria. Cytoskeleton polymerization induced by epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), which in turn supports mitochondrial fission that are essential for further sustain EMT process. Depolymerization of actin cytoskeleton is sufficient for reversing EMT phenotype. Activation of autophagy induces mitochondrial fusion and the reconstitution of mitochondrial network, which counteracts EMT. Mitochondrial protein BNIP3 supports mitochondrial fission directly through cytoskeleton polymerization or indirectly through stimulation of mitophagy and the autophagosomal protein LC3. The interaction between BNIP3 and CDH6 drives EMT, restrains autophagy and promotes mitochondrial fission (adapted from [14, 28] with permission of the authors)

ные каркасы необходимы для образования аутофагосом при неблагоприятных условиях, что было подтверждено колокализацией актиновых филаментов с ключевыми маркерами аутофагии [98]. Митохондрии являются важным энергетическим ресурсом для множества биологических процессов, таких как аутофагия, миграция и инвазия. Разрушение митохондриальной сети является характеристикой онкогенной трансформации, приводящей к ускорению активации программы ЭМП и миграции опухолевых клеток [99]. Кроме этого, активность ГТФазы DRP1, участвующей в расщеплении сетевой организации митохондрий, увеличена в метастатических клетках по сравнению с нематастатическими, что подтверждает, что фракционирование сети в единичные митохондрии необходимо при опухолевой прогрессии [100].

Для того чтобы двигаться по клетке, митохондрии должны быть свободными от тесной сетевой организации. Полимеризация актина способствует разделению митохондриальной сети [101]. Показано, что

активация программы ЭМП с помощью TGF- β в клетках рака легкого A549 приводит к значительному увеличению общего количества митохондрий [102]. При этом актиндеполимеризующие препараты способны ингибировать DRP1 в митохондриях и, как следствие, ингибировать сокращение длины митохондриальной сети [97, 102]. Участие митохондрий в ЭМП обуславливается поставкой аденозинтрифосфат (АТФ) для перестройки цитоскелета во время прогрессии опухоли. Аутофагия регулирует жизнедеятельность митохондрий, устраняя поврежденные органеллы неселективно или селективно (процесс также известный как селективная митофагия). Митофагия приводит к разобщению митохондриальной цепи, после чего митохондрии посылают сигнал на аутофагосомы для разрушения [103]. Неселективная аутофагия, наоборот, вызывает слияние митохондрий [104]. Митохондриальная сеть в таком случае не подвергается деградации посредством аутофагии и способствует производству АТФ при нехватке питательных веществ. Как митофагия, так и неселективная аутофагия приводит к снижению количества свободных митохондрий в клетках, регулируя формирование филоподий и ламеллоподий и, следовательно, сокращение миграционной способности клеток [15].

Таким образом, регуляция функционального взаимодействия митохондрий и цитоскелета пред-

ставляет собой способ взаимодействия между ЭМП и аутофагией.

Заключение

Опухолевая прогрессия характеризуется сложным взаимодействием между ЭМП и аутофагией. Взаимосвязь этих биологических процессов обусловлена несколькими аспектами, включая фазу опухолевого роста, стадию развития и прогрессирования. Сложность этого взаимодействия отражается в запутанной сети регуляторных сигнальных путей, отвечающих за регуляцию как ЭМП, так и аутофагии, равновесие между которыми может быть смещено в любой момент. Тесная связь цитоскелета с митохондриями и их важность в регулировании обоих этих процессов становятся новым уровнем взаимного регулирования между ЭМП и аутофагией и заслуживают дальнейших исследований.

Экспериментальные модели на генномодифицированных мышах — пример того, как инактивация аутофагии в опухолях *in vivo* подавляет инициацию, рост, прогрессию и малигнизацию опухолей. Поскольку аутофагия играет важную роль в здоровых тканях, необходимо выяснить, являются ли опухоли более аутофагиязависимыми, чем нормальные ткани, и с учетом этого подбирать новые терапевтические и диагностические мишени.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Levine B., Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* 2008;132:27–42. DOI: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
- Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119(6):1420–8. DOI: 10.1172/JCI39104.
- Singh A., Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 2010;29:4741–51. DOI: 10.1038/onc.2010.215.
- Глушанкова Н.А., Житняк И.Ю., Рубцова С.Н. Роль эпителиально-мезенхимального перехода в опухолевой прогрессии. *Биохимия* 2018;83:1802–11. DOI: 10.1134/S0320972518120059. [Glushankova N.A., Zhitnyak I.Yu., Rubtsova S.N. The role of the epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. *Biokhimiya = Biochemistry* 2018;83:1802–11. (In Russ.)].
- Byers L.A., Diao L., Wang J. et al. An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res* 2013;19:279–90. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1558.
- Ramachandran V., Wang H., Arumugam T. et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2009;69:5820–8. DOI: 10.1158/0008-5472.can-08-2819.
- Saxena M., Stephens M.A., Pathak H. et al. Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis* 2011;2:e179. DOI: 10.1038/cddis.2011.61.
- Yang X., Yu D.D., Yan F. et al. The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of cancer. *Cell Biosci* 2015;5:14. DOI: 10.1186/s13578-015-0005-2.
- Maes H., Rubio N., Garg A.D. et al. Autophagy: Shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends Mol Med* 2013;19(7):428–46. DOI: 10.1016/j.molmed.2013.04.005.
- Mizushima N., Yoshimori T., Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;27:107–32. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154005.
- Ryabaya O.O., Egorova A.V., Stepanova E.V. The role of autophagy in mechanisms of tumor cell death. *Biol Bull Rev* 2015;5:579–88. DOI: 10.1134/s2079086415060067.
- Liang X.H., Jackson S., Seaman M. et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by Beclin 1. *Nature* 1999;402(6762):672–6. DOI: 10.1038/45257.
- Klionsky D.J., Abdelmohsen K., Abe A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edn.). *Autophagy* 2016;12:1–222. DOI: 10.1080/15548627.2015.1100356.
- Chen H.T., Liu H., Mao M.J. et al. Crosstalk between autophagy and epithelial-mesenchymal transition and its application in cancer therapy. *Mol Cancer* 2019;18:101. DOI: 10.1186/s12943-019-1030-2.
- Gugnoni M., Sancisi V., Manzotti G. et al. Autophagy and epithelial-mesenchymal transition: an intricate interplay in cancer. *Cell Death Dis* 2016;7:e2520. DOI: 10.1038/cddis.2016.415.
- Menzies F.M., Fleming A., Rubinsztein D.C. Compromised autophagy and neuro-

- degenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2015;16(6):345–57. DOI: 10.1038/nrn3961.
17. Sharifi M.N., Mowers E.E., Drake L.E. et al. Autophagy promotes focal adhesion disassembly and cell motility of metastatic tumor cells through the direct interaction of paxillin with LC3. *Cell Rep* 2016;15:1660–72. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.04.065.
 18. Kenific C.M., Stehbens S.J., Goldsmith J. et al. NBR1 enables autophagy-dependent focal adhesion turnover. *J Cell Biol* 2016;212:577–90. DOI: 10.1083/jcb.201503075.
 19. Yang L., Shang Z., Long S. et al. Roles of genetic and microenvironmental factors in cancer epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic implication. *Exp Cell Res* 2018;370:190–7. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.07.046.
 20. Singla M., Bhattacharyya S. Autophagy as a potential therapeutic target during epithelial to mesenchymal transition in renal cell carcinoma: an *in vitro* study. *Biomed Pharmacother* 2017;94:332–40. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.07.070.
 21. Catalano M., D'Alessandro G., Lepore F. et al. Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. *Mol Oncol* 2015;9:1612–25. DOI: 10.1016/j.molonc.2015.04.016.
 22. Akalay I., Janji B., Hasmim M. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis. *Cancer Res* 2013;73:2418–27. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2432.
 23. Peng Y.F., Shi Y.H., Ding Z.B. et al. Autophagy inhibition suppresses pulmonary metastasis of HCC in mice via impairing anoikis resistance and colonization of HCC cells. *Autophagy* 2013;9:2056–68. DOI: 10.4161/autophagy.26398.
 24. Massagué J. TGF- β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:616–30. DOI: 10.1038/nrm3434.
 25. Bertrand M., Petit V., Jain A. et al. SQSTM1/p62 regulates the expression of junctional proteins through epithelial-mesenchymal transition factors. *Cell Cycle* 2015;14:364–74. DOI: 10.4161/15384101.2014.987619.
 26. Su Z., Li G., Liu C. et al. Autophagy inhibition impairs the epithelial-mesenchymal transition and enhances cisplatin sensitivity in nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Lett* 2017;13:4147–54. DOI: 10.3892/ol.2017.5963.
 27. Wang J.Y., Wu T., Ma W. et al. Expression and clinical significance of autophagic protein LC3B and EMT markers in gastric cancer. *Cancer Manag Res* 2018;10:1479–86. DOI: 10.2147/CMAR.S164842.
 28. Perera R.M., Di Malta C., Ballabio A. MiT/TFE family of transcription factors, lysosomes, and cancer. *Annu Rev Cancer Biol* 2019;3:203–22. DOI: 10.1146/annurev-cancerbio-030518-055835.
 29. Switon K., Kotulska K., Janusz-Kaminska A. et al. Molecular neurobiology of mTOR. *Neuroscience* 2017;341:112–53. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.11.017.
 30. Guo S., Liang X., Guo M. et al. Migration inhibition of water stress proteins from *Nostoc commune* Vauch. via activation of autophagy in DLD-1 cells. *Int J Biol Macromol* 2018;119:669–76. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.188.
 31. Fenouille N., Tichet M., Dufies M. et al. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion. *PLoS One* 2012;7:e40378. DOI: 10.1371/journal.pone.0040378.
 32. Lamouille S., Connolly E., Smyth J.W. et al. TGF- β -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *Development* 2012;125(Pt 5):1259–73. DOI: 10.1242/jcs.095299.
 33. Rogers G.W., Komar A.A., Merrick W.C. eIF4A: The godfather of the DEAD box helicases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2002;72:307–31. DOI: 10.1016/s0079-6603(02)72073-4.
 34. Jordá A., Olmeda D., Vinyals A. et al. Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 5):3371–85. DOI: 10.1242/jcs.02465.
 35. Li L., Pan X.Y., Shu J. et al. Ribonuclease inhibitor up-regulation inhibits the growth and induces apoptosis in murine melanoma cells through repression of angiogenin and ILK/PI3K/AKT signaling pathway. *Biochimie* 2014;103:89–100. DOI: 10.1016/j.biochi.2014.04.007.
 36. Xu W., Yang Z., Lu N. A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Adhes Migr* 2015;9:317–24. DOI: 10.1080/19336918.2015.1016686.
 37. Maier H.J., Schmidt-Straßburger U., Huber M.A. et al. NF- κ B promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Lett* 2010;295:214–28. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.03.003.
 38. O'Farrell F., Rusten T.E., Stenmark H. Phosphoinositide 3-kinases as accelerators and brakes of autophagy. *FEBS J* 2013;280(24):6322–37. DOI: 10.1111/febs.12486.
 39. Zong H., Yin B., Zhou H. et al. Inhibition of mTOR pathway attenuates migration and invasion of gallbladder cancer via EMT inhibition. *Mol Biol Rep* 2014;41:4507–12. DOI: 10.1007/s11033-014-3321-4.
 40. Han B., Cui H., Kang L. et al. Metformin inhibits thyroid cancer cell growth, migration, and EMT through the mTOR pathway. *Tumor Biol* 2015;36(8):6295–304. DOI: 10.1007/s13277-015-3315-4.
 41. Inoki K., Kim J., Guan K.L. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012;52:381–400. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134537.
 42. Wang P., Jiang L., Zhou N. et al. Resveratrol ameliorates autophagic flux to promote functional recovery in rats after spinal cord injury. *Oncotarget* 2018;9(9):8427–40. DOI: 10.18632/oncotarget.23877.
 43. Sun A., Li C., Chen R. et al. GSK-3 β controls autophagy by modulating LKB1-AMPK pathway in prostate cancer cells. *Prostate* 2016;76:172–83. DOI: 10.1002/pros.23106.
 44. Chang H.W., Lee Y.S., Nam H.Y. et al. Knockdown of β -catenin controls both apoptotic and autophagic cell death through LKB1/AMPK signaling in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cell Signal* 2013;25:839–47. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.12.020.
 45. Jiao D., Wang J., Lu W. et al. Curcumin inhibited HGF-induced EMT and angiogenesis through regulating c-Met dependent PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in lung cancer. *Mol Ther Oncolytics* 2016;3:16018. DOI: 10.1038/mto.2016.18.
 46. Chang L., Graham P.H., Hao J. et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance. *Cell Death Dis* 2013;4(10):e875. DOI: 10.1038/cddis.2013.407.
 47. Huang W., Yu L.F., Zhong J. et al. Stat3 is involved in angiotensin II-induced expression of MMP2 in gastric cancer cells. *Dig Dis Sci* 2009;54:2056–62. DOI: 10.1007/s10620-008-0617-z.
 48. Liu S.C., Huang C.M., Bamodu O.A. et al. Ovatodiolide suppresses nasopharyngeal cancer by targeting stem cell-like population, inducing apoptosis, inhibiting EMT and dysregulating JAK/STAT signaling pathway. *Phytomedicine* 2019;56:269–78. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.05.007.
 49. Maycotte P., Jones K.L., Goodall M.L. et al. Autophagy supports breast cancer stem cell maintenance by regulating IL6 secretion. *Mol Cancer Res* 2015;13:651–8. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0487.
 50. Granato M., Rizzello C., Montani M.S.G. et al. Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways. *J Nutr Biochem* 2017;41:124–36. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.12.011.

51. Ferraresi A., Phadngam S., Morani F. et al. Resveratrol inhibits IL-6-induced ovarian cancer cell migration through epigenetic up-regulation of autophagy. *Mol Carcinog* 2017;56:1164–81. DOI: 10.1002/mc.22582.
52. Su Z., Yang Z., Xu Y. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer* 2015;14:48. DOI: 10.1186/s12943-015-0321-5.
53. Zhou W.H., Tang F., Xu J. et al. Low expression of Beclin 1, associated with high Bcl-xL, predicts a malignant phenotype and poor prognosis of gastric cancer. *Autophagy* 2012;8:389–400. DOI: 10.4161/auto.18641.
54. Pattingre S., Tassa A., Qu X. et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005;122:927–39. DOI: 10.1016/j.cell.2005.07.002.
55. Li S., Zhang H.Y., Du Z.X. et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) by Beclin 1 knockdown via posttranscriptional upregulation of ZEB1 in thyroid cancer cells. *Oncotarget* 2016;7(43):70364–77. DOI: 10.18632/oncotarget.12217.
56. Cicchini M., Chakrabarti R., Kongara S. et al. Autophagy regulator BECN1 suppresses mammary tumorigenesis driven by WNT1 activation and following parity. *Autophagy* 2014;10:2036–52. DOI: 10.4161/auto.34398.
57. Shen H., Yin L., Deng G. et al. Knockdown of Beclin-1 impairs epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells. *J Cell Biochem* 2018;119:7022–31. DOI: 10.1002/jcb.26912.
58. Ha J.H., Ward J.D., Radhakrishnan R. et al. Lysophosphatidic acid stimulates epithelial to mesenchymal transition marker Slug/Snail2 in ovarian cancer cells via Gai2, Src, and HIF1a signaling nexus. *Oncotarget* 2016;7:37664–79. DOI: 10.18632/oncotarget.9224.
59. Qiang L., He Y.Y. Autophagy deficiency stabilizes TWIST1 to promote epithelial-mesenchymal transition. *Autophagy* 2014;10:1864–5. DOI: 10.4161/auto.32171.
60. Clevers H., Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 2012;149:1192–205. DOI: 10.1016/j.cell.2012.05.012.
61. Cheng M., Xue H., Cao W. et al. RACK1 promotes Dishevelled degradation via autophagy and antagonizes Wnt signaling. *J Biol Chem* 2016;291(24):12871–9. DOI: 10.1074/jbc.M115.708818.
62. Gugnoni M., Sancisi V., Gandolfi G. et al. Cadherin-6 promotes EMT and cancer metastasis by restraining autophagy. *Oncogene* 2017;36(5):667–77. DOI: 10.1038/onc.2016.237.
63. Huber M.A., Kraut N., Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:548–58. DOI: 10.1016/j.ccb.2005.08.001.
64. Nopparat C., Sinjanakhom P., Govitrapong P. Melatonin reverses H₂O₂–induced senescence in SH-SY5Y cells by enhancing autophagy via sirtuin 1 deacetylation of the RelA/p65 subunit of NF- κ B. *J Pineal Res* 2017;63:e12407. DOI: 10.1111/jpi.12407.
65. Sun X., Li L., Ma H. et al. Bisindolylmaleimide alkaloid BMA-155Cl induces autophagy and apoptosis in human hepatocarcinoma HepG-2 cells through the NF- κ B p65 pathway. *Acta Pharmacol Sin* 2017;38:524–38. DOI: 10.1038/aps.2016.171.
66. Wu Y., Deng J., Rychahou P.G. et al. Stabilization of Snail by NF- κ B is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell* 2009;15(5):416–28. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.03.016.
67. Huang M., Xin W. Matrine inhibiting pancreatic cells epithelial-mesenchymal transition and invasion through ROS/NF- κ B/MMPs pathway. *Life Sci* 2018;192:55–61. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.11.024.
68. Katsuno Y., Lamouille S., Derynck R. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr Opin Oncol* 2013;25:76–84. DOI: 10.1097/CCO.0b013e32835b6371.
69. Saitoh M., Endo K., Furuya S. et al. STAT3 integrates cooperative Ras and TGF- β signals that induce Snail expression. *Oncogene* 2016;35:1049–57. DOI: 10.1038/onc.2015.161.
70. He Z.J., Zhu F.Y., Li S.S. et al. Inhibiting ROS-NF- κ B-dependent autophagy enhanced brazilin-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Food Chem Toxicol* 2017;101:55–66. DOI: 10.1016/j.fct.2017.01.002.
71. Shen J., Zhao D.S., Li M.Z. TGF- β 1 promotes human gastric carcinoma SGC7901 cells invasion by inducing autophagy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21(5):1013–9.
72. Zhang C., Zhang X., Xu R. et al. TGF- β 2 initiates autophagy via Smad and non-Smad pathway to promote glioma cells' invasion. *J Exp Clin Cancer Res* 2017;36:162. DOI: 10.1186/s13046-017-0628-8.
73. Hu S., Wang L., Zhang X. et al. Autophagy induces transforming growth factor- β -dependent epithelial-mesenchymal transition in hepatocarcinoma cells through cAMP response element binding signaling. *J Cell Mol Med* 2018;22:5518–32. DOI: 10.1111/jcmm.13825.
74. Sancisi V., Gandolfi G., Ragazzi M. et al. Cadherin 6 is a new RUNX2 target in TGF- β signalling pathway. *PLoS One* 2013;8:e75489. DOI: 10.1371/journal.pone.0075489.
75. Yang M., Liu E., Tang L. et al. Emerging roles and regulation of MiT/TFE transcriptional factors. *Cell Commun Signal* 2018;16:31. DOI: 10.1186/s12964-018-0242-1.
76. Möller K., Sigurbjornsdottir S., Arnthorsson A.O. et al. MITF has a central role in regulating starvation-induced autophagy in melanoma. *Sci Rep* 2019;9:1055. DOI: 10.1038/s41598-018-37522-6.
77. Xu Q., Krause M., Samoylenko A. et al. Wnt signaling in renal cell carcinoma. *Cancers (Basel)* 2016;8:57. DOI: 10.3390/cancers8060057.
78. Calcagni A., Kors L., Verschuren E. et al. Modelling TFE renal cell carcinoma in mice reveals a critical role of WNT signaling. *Elife* 2016;5:e17047. DOI: 10.7554/eLife.17047.
79. Levy C., Khaled M., Fisher D.E. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 2006;12:406–14. DOI: 10.1016/j.molmed.2006.07.008.
80. Vachtenheim J., Ondrušová L. Microphthalmia-associated transcription factor expression levels in melanoma cells contribute to cell invasion and proliferation. *Exp Dermatol* 2015;24:481–4. DOI: 10.1111/exd.12724.
81. Hartman M.L., Czyz M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cell Mol Life Sci* 2015;72:1249–60. DOI: 10.1007/s00018-014-1791-0.
82. Eccles M.R., He S., Ahn A. et al. MITF and PAX3 play distinct roles in melanoma cell migration; outline of a “Genetic Switch” theory involving MITF and PAX3 in proliferative and invasive phenotypes of melanoma. *Front Oncol* 2013;3:229. DOI: 10.3389/fonc.2013.00229.
83. Bianchi-Smiraglia A., Bagati A., Fink E.E. et al. Microphthalmia-associated transcription factor suppresses invasion by reducing intracellular GTP pools. *Oncogene* 2017;36:84–96. DOI: 10.1038/onc.2016.178.
84. Sullivan R.J., Fisher D.E. Understanding the biology of melanoma and therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin North Am* 2014;28:437–53. DOI: 10.1016/j.hoc.2014.02.007.
85. Caramel J., Papadogeorgakis E., Hill L. et al. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell* 2013;24:466–80. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.08.018.
86. Whipple C.A., Brinckerhoff C.E. BRAF (V600E) melanoma cells secrete factors that activate stromal fibroblasts and enhance tumorigenicity. *Br J Cancer* 2014;111:1625–33. DOI: 10.1038/bjc.2014.452.
87. Salama A.K., Kim K.B. Trametinib (GSK1120212) in the treatment

- of melanoma. *Expert Opin Pharmacother* 2013;14:619–27.
DOI: 10.1517/14656566.2013.770475.
88. Ferguson J., Arozarena I., Ehrhardt M. et al. Combination of MEK and SRC inhibition suppresses melanoma cell growth and invasion. *Oncogene* 2013; 32:86–96. DOI: 10.1038/onc.2012.25.
89. Ma X.H., Piao S.F., Dey S. et al. Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *J Clin Invest* 2014;124:1406–17.
DOI: 10.1172/JCI170454.
90. Kinsey C.G., Camolotto S.A., Boespflug A.M. et al. Protective autophagy elicited by RAF→MEK→ERK inhibition suggests a treatment strategy for RAS-driven cancers. *Nat Med* 2019;25(4):620–7.
DOI: 10.1038/s41591-019-0367-9.
91. Kim J., Kundu M., Viollet B., Guan K.L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of ULK1. *Nat Cell Biol* 2011;13(2):132–41.
DOI: 10.1038/ncb2152.
92. Wei S.C., Yang J. Forcing through tumor metastasis: the interplay between tissue rigidity and epithelial-mesenchymal transition. *Trends Cell Biol* 2016;26(2): 111–20. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.09.009.
93. Tojkander S., Gateva G., Lappalainen P. Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci* 2012;125(Pt 8):1855–64.
DOI: 10.1242/jcs.098087.
94. Shankar J., Nabi I.R. Actin cytoskeleton regulation of epithelial mesenchymal transition in metastatic cancer cells. *PLoS One* 2015;10(3):e0119954.
DOI: 10.1371/journal.pone.0119954.
95. Liu C.Y., Lin H.H., Tang M.J. et al. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget* 2015;6(18):15966–83.
DOI: 10.18632/oncotarget.3862.
96. Anesti V., Scorrano L. The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757(5–6):692–9.
DOI: 10.1016/j.bbabi.2006.04.013.
97. Zhao J., Zhang J., Yu M. et al. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 2013;32(40):4814–24.
DOI: 10.1038/onc.2012.494.
98. Kast D.J., Dominguez R. The Cytoskeleton-autophagy connection. *Curr Biol* 2017;27:R318–26.
DOI: 10.1016/j.cub.2017.02.061.
99. Kashatus J.A., Nascimento A., Myers L.J. et al. Erk2 phosphorylation of Drp1 Promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Mol Cell* 2015;57:537–51.
DOI: 10.1016/j.molcel.2015.01.002.
100. Xie Q., Wu Q., Horbinski C.M. et al. Mitochondrial control by DRP1 in brain tumor initiating cells. *Nat Neurosci* 2015;18:501–10.
DOI: 10.1038/nn.3960.
101. Ji W.K., Hatch A.L., Merrill R.A. et al. Actin filaments target the oligomeric maturation of the dynamin GTPase Drp1 to mitochondrial fission sites. *Elife* 2015;4:e11553.
DOI: 10.7554/eLife.11553.
102. Xu Y., Lu S. Transforming growth factor-β1-induced epithelial to mesenchymal transition increases mitochondrial content in the A549 non-small cell lung cancer cell line. *Mol Med Rep* 2015;11(1):417–21.
DOI: 10.3892/mmr.2014.2678.
103. Rambold A.S., Kostecky B., Elia N., Lippincott-Schwartz J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(25):10190–5.
DOI: 10.1073/pnas.1107402108.
104. Gomes L.C., Benedetto G. Di, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 2011;13(5):589–98.
DOI: 10.1038/ncb2220.

Вклад авторов

О.О. Рябая: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

А.А. Прокофьева: обзор публикаций по теме статьи.

Authors' contributions

О.О. Ryabaya: reviewing of publications of the article's theme, article writing;

А.А. Prokofieva: reviewing of publications of the article's theme.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.О. Рябая / О.О. Ryabaya: <https://orcid.org/0000-0001-6295-3497>

А.А. Прокофьева / А.А. Prokofieva: <https://orcid.org/0000-0002-5281-2559>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-015-00447).

Funding. This work was supported by Russian Foundation for Basic Research (grant No 19-015-00447).

Статья поступила: 29.04.2020. Принята к публикации: 02.07.2020.

Article submitted: 29.04.2020. Accepted for publication: 02.07.2020.

Современные представления о клинических, морфологических и молекулярно-биологических предикторах чувствительности рака молочной железы к химиотерапии

Е.Ю. Зубарева, М.А. Сеньчукова

ГБУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер»; Россия, 460021 Оренбург, проспект Гагарина, 11;
ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России;
Россия, 460000 Оренбург, ул. Советская, 6

Контакты: Евгения Юрьевна Зубарева tishkova_evgeniy@mail.ru

В лечении рака молочной железы особое место занимает неoadъювантная химиотерапия, оценка эффективности которой имеет ключевое значение для коррекции проводимой терапии, а также для определения прогноза заболевания. В настоящем обзоре приведены современные данные о физических, инструментальных и морфологических методах исследования, используемых для оценки эффективности неoadъювантного лечения. Мы рассмотрели данные об ассоциации различных характеристик развития опухолевого процесса с ответом на неoadъювантную химиотерапию, среди них характеристики пациенток (возраст, статус регионарных лимфатических узлов, лимфоваскулярная инвазия, молекулярно-генетические особенности) и опухоли (размер, гистологический тип, степень дифференцировки, выраженность лимфоидной инфильтрации, молекулярно-биологические и молекулярно-генетические особенности). Один из разделов статьи посвящен такому перспективному предиктивному маркеру ответа опухоли на проводимое лечение, как уровень тканевой гипоксии. В данном разделе рассмотрены известные в настоящее время механизмы, которые обеспечивают влияние тканевой гипоксии на чувствительность опухоли к лекарственному лечению. Обсуждены перспективы применения комплексного анализа предиктивных маркеров эффективности химиотерапевтического лечения.

Ключевые слова: рак молочной железы, неoadъювантная химиотерапия, предиктивный маркер, тканевая гипоксия, индуцированный гипоксией фактор, ангиогенез, эпителиально-мезенхимальный переход

Для цитирования: Зубарева Е.Ю., Сеньчукова М.А. Современные представления о клинических, морфологических и молекулярно-биологических предикторах чувствительности рака молочной железы к химиотерапии. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(2):20–8.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-2-20-28



The modern views of the clinical, morphological and molecular biological predictors of breast cancer sensitivity to chemotherapy

E. Yu. Zubareva, M. A. Sen'chukova

Orenburg Regional Clinical Oncology Dispensary; 11 Prospekt Gagarina, Orenburg 460021, Russia;
Orenburg State Medical University, Ministry of Health of Russia; 6 Sovetskaya St., Orenburg 460000, Russia

In the treatment of breast cancer, the neoadjuvant chemotherapy is vitally important and the evaluation of its effectiveness is crucial for determining the further therapy treatment, as well as the prognosis of the disease. This review provides current data of the physical, instrumental, morphological, molecular biology and genetics analysis used for the estimation of the neoadjuvant treatment effectiveness. Thus, review discusses the data concerning association of the disease peculiarities with the efficient therapeutic response to neoadjuvant chemotherapy including characteristics of patients (age, status of regional lymph nodes, presence of the lymphovascular invasion) and tumors (size, histological type, degree of differentiation, severity of the lymphoid tumor infiltration, molecular biological and genetic peculiarities). Particular attention is paid to such a promising predictive marker of the breast cancer response to chemotherapy as the level of tissue hypoxia. This section discusses the currently known mechanisms that might enable the effect of tissue hypoxia on the sensitivity of the tumor to drug treatment. The prospects for the use of a comprehensive analysis of predictive markers of the effectiveness of chemotherapeutic treatment are discussed.

Key words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, predictive marker, tissue hypoxia, hypoxia-inducible factor, angiogenesis, epithelial-mesenchymal transformation

For citation: Zubareva E. Yu., Sen'chukova M. A. The modern views of the clinical, morphological and molecular biological predictors of breast cancer sensitivity to chemotherapy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2020;7(2):20–8. (In Russ.).

Рак молочной железы (РМЖ) занимает 1-е место в структуре заболеваемости среди женского населения. Максимальная заболеваемость РМЖ приходится на

возрастную группу от 30 до 69 лет [1]. В России на фоне снижения уровня смертности от этой патологии (на 19,25 % за 10 лет) отмечается неуклонный рост

заболеваемости РМЖ (на 22,15 % за 10 лет) [2]. Важно отметить, что лечение этой патологии у пациенток с агрессивными биологическими характеристиками карцином предполагает многократные курсы дорогостоящей лекарственной терапии даже на ранних стадиях заболевания [3, 4]. Согласно результатам проведенных исследований социально-экономическое бремя РМЖ в 2014 г. составило 34,76 млрд руб., что превышает данный показатель при раке почки, яичников, предстательной железы, легкого и меланомы вместе взятых [5, 6]. С учетом того, что большая часть экономических затрат на лечение РМЖ приходится на химиотерапию, определение чувствительности опухоли к используемым лекарственным препаратам имеет принципиальное значение. Более того, важность поиска предиктивных маркеров ответа опухоли на проводимую терапию обусловлена еще и тем, что неэффективное лечение – не только необоснованные экономические затраты, но и отрицательное влияние на здоровье пациенток.

Среди методов лекарственного лечения РМЖ неоадьювантная химиотерапия (НАХТ) занимает особое место. В настоящее время установлены следующие показания к проведению НАХТ: местно-распространенный РМЖ (стадии T0–4N2–3M0, T4N0M0), в том числе инфильтративно-отечная форма; инвазивный первично-операбельный РМЖ (T2N0M0, T2N1M0, T3N0M0, T3N1M0) с тройным негативным фенотипом или HER2-положительным статусом, а также люминальный В тип рака высокого риска (G₃, высокий уровень Ki-67) [7]. Основные цели НАХТ – подавление активного опухолевого процесса, уменьшение размера опухоли, что дает возможность выполнить радикальную операцию и увеличить долю органосохраняющего лечения, а также достижение полного лекарственного патоморфоза, который является маркером благоприятного прогноза заболевания [4].

При этом оценка эффективности лечения имеет ключевое значение для выбора тактики последующей терапии и определения прогноза заболевания. Эффективность химиотерапевтического лечения определяют с использованием физикальных, инструментальных и морфологических методов исследования.

К клиническим методам относят оценку динамики размера опухоли, числа и размеров метастатически измененных регионарных лимфатических узлов. Морфологические методы оценки эффективности проводимой НАХТ позволяют выявить некробиотические изменения в опухоли на клеточном и тканевом уровнях, которые проявляются образованием полей некроза, формированием очагов фиброза и склероза, дистрофией, апоптозом клеток [8].

Следует отметить, что инструментальные методы являются наиболее объективными в плане оценки размера опухоли после лечения [9]. Однако клиническая оценка размера опухоли совпадает с морфологической оценкой только в 19 % случаев, в 56 % наблюдений

размер остаточной опухоли преувеличен, а в 25 % – преуменьшен [8]. В связи с этим, для оценки эффективности лекарственной терапии РМЖ в настоящее время в стандарты морфологического исследования операционного материала включено определение степени терапевтического патоморфоза опухоли [4]. Для этого наиболее часто используется классификация Г.А. Лавниковой, которая соответствует современной международной практике [10]. Согласно данной классификации выделяют 4 степени терапевтического патоморфоза опухоли: при I степени сохранено более 50 % опухолевой ткани, при II – 20–50 %, при III – до 20 % в виде отдельных очагов, при IV степени полностью отсутствует ткань опухоли. Оптимальным результатом НАХТ является достижение IV степени лечебного патоморфоза или полный регресс (pathologic Complete Response, pCR) первичной опухоли и регионарных метастазов.

Эффективность проводимого лечения и, следовательно, степень выраженности терапевтического патоморфоза опухоли зависят от различных факторов, которые можно разделить на клинические (возраст пациентки, размер опухолевого узла, статус регионарных лимфатических узлов), морфологические (степень злокачественности опухоли, гистологический подтип, наличие лимфоваскулярной инвазии, выраженность лимфоидной инфильтрации опухоли), молекулярно-биологические (уровень экспрессии прогестероновых и эстрогеновых рецепторов, рецепторов к эпидермальному фактору роста (HER2), уровень экспрессии Ki-67, степень выраженности тканевой гипоксии в опухоли, интенсивности ангиогенеза, уровня эпителиально-мезенхимального перехода и др.) и генетические (наличие мутаций в генах *BRCA1/2*, *TP53*, *MYC*, *PIK3CA* и др.).

Анализ опубликованных данных исследований относительно ассоциации эффективности лекарственной терапии с вышеперечисленными факторами показал следующие результаты.

Возраст. В ряде работ отмечено, что эффективность проводимой терапии зависит от возраста пациенток на момент постановки диагноза. У молодых пациенток опухоли отличаются более агрессивными характеристиками, в то же время их реакция на химиотерапию преимущественно более выраженная [11–13]. Так, показатель pCR был значительно выше у молодых пациенток по сравнению с таковым в других возрастных группах: 20,9 % при возрасте <40 лет, 17,7 % при возрасте 40–49 лет, 13,7 % при возрасте >50 лет ($p < 0,001$). Однако это различие касалось только тройного негативного, люминального А и В HER2-негативного РМЖ [11]. Интересно, что в другом исследовании в группе пациенток старше 65 лет при HER2-негативном РМЖ было отмечено значительное снижение pCR, тогда как при HER2-позитивном РМЖ показатели pCR были высокими, а при люминальном В HER2-позитивном РМЖ даже выше, чем у более молодых пациенток [12]. В то же время О.А. Павликова и соавт.

не выявили достоверных корреляций возраста пациентки со степенью pCR [14].

Размер опухоли. Данные о связи лечебного патоморфоза с размером первичной опухоли также довольно противоречивы. В ряде исследований отмечено, что вероятность pCR значительно ниже при больших опухолях [15–17]. Так, при размере опухоли <2 см pCR был достигнут в 50 % случаев, при размере 2–5 см – в 38 %, при размере >5 см – только в 18 % [15]. В то же время в исследовании О.А. Павликовой и соавт. связи степени лечебного патоморфоза РМЖ с размером опухоли не установлено [14].

Статус регионарных лимфатических узлов. В ряде исследований отмечена положительная корреляция статуса регионарных лимфатических узлов со степенью лечебного патоморфоза опухоли [15, 18]. Наличие метастазов было значимым предиктивным фактором, свидетельствующем о чувствительности опухоли к проводимой НАХТ. Однако, как и в случае с возрастом и размером первичной опухоли, в работе О.А. Павликовой и соавт. связи степени лечебного патоморфоза РМЖ со статусом регионарных лимфатических узлов не выявлено [14].

Гистологический тип опухоли. В большинстве исследований показано, что при инфильтративном протоковом раке отмечена наибольшая вероятность достижения pCR (до 15 %). Дольковый рак часто ассоциирован с люминальным А типом опухолей, для которого характерна низкая частота достижения pCR (0–3 %). При папиллярном и слизистом раке полных морфологических регрессий не отмечено [12, 15, 17]. Однако в исследовании О.А. Павликовой и соавт. не выявлено корреляции степени терапевтического патоморфоза с гистологической структурой опухоли [14].

Степень дифференцировки опухоли. В большинстве исследований было установлено, что чем ниже степень дифференцировки опухоли, тем выше вероятность достижения pCR [14, 19]. О.А. Павликова и соавт. приводят данные о том, что максимальная частота достижения pCR была характерна для пациенток с низкодифференцированными карциномами (G_3) – 45,8 %, в то время как при опухолях G_2 частота pCR составила 25,4 %, а у пациенток с высокодифференцированными карциномами (G_1) не выявлено ни одного случая достижения pCR ($p = 0,012$). [14]. Работ с противоположными результатами не найдено.

Лимфоваскулярная инвазия. В ряде исследований показано, что наличие лимфоваскулярной инвазии ассоциируется с химиорезистентностью РМЖ [13, 17]. Так, Р. Sasanouh и соавт. провели ретроспективный анализ данных пациенток с РМЖ, получивших НАХТ в период с апреля 2012 г. по сентябрь 2016 г. Всего в исследование включены 207 случаев. Авторы отметили, что сочетание лимфоваскулярной инвазии и положительного гормонального статуса ассоциировалось с более слабым ответом на НАХТ [13]. Связь выраженной лимфоваскулярной инвазии с химиорезистентностью

РМЖ также была отмечена Т. Uematsu и соавт. ($p = 0,003$) [17]. Возможно, химиорезистентность РМЖ при наличии лимфоваскулярной инвазии объясняется активацией механизмов эпителиально-мезенхимального перехода с приобретением опухолевыми клетками фенотипа стволовых, которые, как известно, отличаются низкой чувствительностью к химио- и лучевой терапии [20–22].

Выраженность лимфоидной инфильтрации опухоли. При тройном негативном и HER2-позитивном РМЖ высокий уровень инфильтрации опухоли лимфоцитами ассоциирован с pCR [23]. Авторы полагают, что данные подтипы РМЖ связаны с более высоким уровнем мутагенеза, что обеспечивает увеличение числа опухолевых антигенов, способных таким образом создавать более высокий эндогенный иммунный ответ и, следовательно, резорбцию опухоли в процессе лечения. Они считают, что именно эта особенность тройного негативного и HER2-позитивного РМЖ может быть использована для разработки препаратов для иммунотерапии. Более высокий процент pCR при высоком уровне опухолеинфильтрирующих лимфоцитов и HER2-позитивном РМЖ был отмечен и другими исследователями [16, 24, 25]. Более того, в ряде исследований показано, что высокий уровень инфильтрации опухоли лимфоцитами коррелирует не только с pCR, но и с увеличением общей и безрецидивной выживаемости пациенток с РМЖ [16, 23].

Молекулярно-биологические подтипы РМЖ. Предиктивная значимость молекулярно-биологического подтипа РМЖ для выбора оптимальной тактики лечения РМЖ в настоящее время не вызывает сомнений. Считается, что наиболее чувствительным к химиотерапии является HER2-позитивный тип РМЖ, тогда как люминальный А тип наиболее резистентен к химиотерапии. Так, в исследовании R.V. Dave и соавт. частота pCR при люминальном А типе РМЖ составила около 6 %, при люминальном В/HER2-негативном – 21 %, при люминальном В/HER2-позитивном – 35 %, при HER2-позитивном – 72 %, при тройном негативном – 32 % ($p < 0,001$) [19]. Аналогичные данные были получены и другими авторами [14, 18, 26, 27]. О.А. Павликова и соавт. в своем исследовании отмечают, что в группе пациенток с люминальным А типом РМЖ не зарегистрировано ни одного случая достижения pCR после проводимой НАХТ. Низкая частота pCR (10,7 %) отмечена и при люминальном В HER2-негативном подтипе опухоли. Наибольшая частота достижения pCR зарегистрирована в группе пациенток с HER2-позитивным РМЖ (50 %). При люминальном В HER2-позитивном подтипе и тройном негативном РМЖ частота pCR составила 38,1 и 34,5 % соответственно [14]. В более ранних публикациях также приводятся данные о том, что отсутствие стероидных рецепторов в опухоли и гиперэкспрессия HER2 являются предикторами хорошего ответа на проводимую химиотерапию и коррелируют с высокой частотой полных морфологических

ответов как в первичной опухоли, так и в лимфатических узлах [15, 28].

Для тройного негативного РМЖ характерны отсутствие экспрессии рецепторов эстрогенов, прогестерона и HER2, агрессивное течение, раннее метастазирование и плохие отдаленные результаты лечения. Несмотря на высокий процент pCR в ответ на НАХТ, при тройном негативном РМЖ наблюдаются самые низкие показатели общей и безрецидивной выживаемости [29]. Однако следует отметить, что в последнее десятилетие стали появляться данные о гетерогенности тройного негативного РМЖ и возможности применения таргетных препаратов для лечения пациенток этой группы. На основании результатов молекулярно-генетических исследований выделено несколько подтипов тройного негативного РМЖ, отличающихся как по прогнозу, так и по чувствительности к лекарственной терапии. Так, M.D. Burstein и соавт. классифицировали тройной негативный РМЖ на 4 подтипа: люминальный андроген-рецепторный (LAR), мезенхимальный (MES), базальноподобный иммуносупрессированный (BLIS) и базальноподобный иммуноактивированный (BLIA). Было установлено, что наихудшим прогнозом по показателям беспрогрессивной и безрецидивной выживаемости характеризуется подтип BLIS, наилучшим – BLIA [30].

Другая классификация тройного негативного РМЖ предложена B.D. Lehmann и соавт. Исследователи определили 7 подтипов тройного негативного РМЖ: базальноподобные 1 и 2 (BL1/2), иммуномодулирующий (IM), мезенхимальный (M), мезенхимальноподобный (MSL), люминальный андроген-рецепторный (LAR) и неклассифицируемый (UNS) [31]. Установлено, что наиболее чувствителен к химиотерапии подтип BL1 (52 % pCR), в то время как подтипы BL2 и LAR являются химиорезистентными (0 и 10 % pCR соответственно) [32]. В исследовании *in vitro* на модели клеточных линий показано, что клетки подтипов BL1 и BL2 хорошо отвечают на лечение цисплатином и ингибиторами фактора роста (EGFR), подтипов M и MSL – ингибиторами PI3K/mTOR и Src, а подтипов LAR – антагонистами андрогеновых рецепторов [33].

Индекс пролиферативной активности опухолевых клеток. Достаточно большое число исследований касается предикторной роли маркера клеточной пролиферации Ki-67. T. Yoshioka и соавт. привели результаты ретроспективного исследования, в которое были включены 64 пациентки с различными молекулярно-биологическими подтипами РМЖ, получавшие НАХТ. Авторы отметили, что частота pCR была значительно выше при люминальном В типе, по сравнению с люминальным А типом. Опухоли с высокой экспрессией Ki-67 более эффективно реагировали на НАХТ [26]. Подобные результаты были получены Q.X. Tan и соавт., которые привели результаты ретроспективного исследования 138 пациенток с нелюминальными подтипами РМЖ [34]. Они отметили, что при опухолях

с высоким уровнем Ki-67 чаще наблюдается pCR. Уровень экспрессии Ki-67 положительно коррелировал со статусом HER2, размером опухоли, наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах, лимфоваскулярной инвазии и степенью злокачественности опухоли.

Мутации в генах BRCA1/2. Гены *BRCA1/2* относятся к группе генов-супрессоров, вовлеченных в процесс гомологичной репарации двунитевых разрывов ДНК. Наличие клинически значимых мутаций в гене *BRCA1* или *BRCA2* вызывает потерю функции белков, кодируемых этими генами, в результате чего нарушается основной механизм репарации двунитевых разрывов ДНК [35, 36]. В настоящее время имеются данные об особом спектре химиочувствительности наследственного РМЖ. *BRCA1*-ассоциированный РМЖ характеризуется резистентностью к препаратам из группы таксанов («золотому стандарту» терапии РМЖ), но в то же время показывает выраженный регресс при лечении цисплатином [37, 38]. Этот эффект связан с полной инактивацией гена *BRCA1*, которая приводит к дефекту гомологичной рекомбинации. *BRCA1*-дефицитные клетки становятся очень чувствительными к препаратам, вызывающим одно- и двунитевые разрывы ДНК, в частности к цисплатину [35]. Во многих исследованиях показано увеличение частоты pCR при добавлении платины к схемам НАХТ у пациенток с тройным негативным РМЖ, ассоциированным с *BRCA*-мутацией [39–42]. В ряде рандомизированных исследований также отмечено, что у пациенток с I–III стадиями тройного негативного РМЖ добавление карбоплатина к НАХТ на основе антрациклинов или таксана приводило к увеличению частоты pCR с 41 до 54 % [39, 43]. Эти данные позволили включить производные платины в стандарты терапии тройного негативного *BRCA*-ассоциированного РМЖ [7]. Еще одним перспективным терапевтическим средством являются ингибиторы PARP (поли(АДФ-рибоза)-полимеразы). В модели *in vitro* показано, что ингибиторы PARP увеличивают частоту нерепарируемых разрывов двухцепочечной ДНК, что приводит к гибели клеток РМЖ у пациенток с *BRCA*-мутацией [44].

Мутации в гене TP53. Ген *TP53* является транскрипционным фактором, регулирующим клеточный цикл и участвующим в запуске репарации ДНК и апоптоза. Изменения *TP53*, связанные с aberrантной экспрессией, были описаны при всех подтипах РМЖ. Мутации *TP53* чаще встречаются при РМЖ без экспрессии рецепторов к стероидным гормонам, чем с их экспрессией [18, 45, 46]. Данные литературы о связи мутации *TP53* с вероятностью достижения pCR неоднозначны. L. Yang и соавт. привели данные ретроспективного исследования, в которое были включены 247 пациенток с местно-распространенным РМЖ, получавшие НАХТ (комбинация таксанов и антрациклинов). Было отмечено, что в общей группе пациентки с мутацией *TP53* имели более высокую вероятность

pCR ($p = 0,003$) [18]. Аналогично в группе пациенток, получавших комбинацию антрациклинов с циклофосфамидом ($n = 252$), частота pCR была достоверно выше при наличии мутации *TP53*, чем при ее отсутствии (28,6 % против 7,1 %; $p < 0,001$). В этом исследовании мутация *TP53* явилась независимым предиктором pCR.

Не все исследователи выявили корреляцию частоты pCR с наличием мутации *TP53*. Так, по результатам исследования Y. Wang и соавт. среди пациенток, получавших паклитаксел в неoadъювантном режиме ($n = 99$), значительных различий в частоте pCR между пациентками с мутациями *TP53* или без мутаций не наблюдалось (15,2 % против 11,3 %; $p = 0,57$) [46]. В исследовании S. Darb-Esfahani и соавт. изучены 450 биопсийных образцов тройного негативного РМЖ и HER2-позитивного РМЖ. Пациентки получали НАХТ на основе антрациклинов или таксанов с добавлением карбоплатина или без него, а также с добавлением трастузумаба/лапатиниба при HER2-позитивном РМЖ и бевацизумаба при тройном негативном РМЖ. Авторы не выявили связи частоты pCR с наличием мутации *TP53*, а также с видом мутации как во всей исследуемой группе, так и в молекулярно-биологических подтипах ($p > 0,05$). Согласно полученным данным мутации *TP53* не являются предикторным фактором ответа на НАХТ в этих 2 молекулярно-биологических подтипах РМЖ [45].

Мутации гена *PIK3CA*. Фосфатидилинозит-3 киназы (PI3K) – семейство ферментов, контролирующих такие важнейшие функции клетки, как пролиферация, апоптоз, миграция, реорганизация цитоскелета [47]. Выделяют 3 класса PI3K в зависимости от структуры и субстратной специфичности. Для PI3K класса IA доказано участие в канцерогенезе. PI3K класса IA состоит из 2 субъединиц: каталитической p110 и регуляторной p85. Ген *PIK3CA* кодирует каталитическую p110α-субъединицу. Соматические мутации в гене *PIK3CA* играют значительную роль в патогенезе и прогрессии опухолей [47]. В настоящее время считается, что мутации *PIK3CA* обнаруживаются у 20–30 % больных РМЖ и чаще встречаются при гормоноположительных и HER2-положительных опухолях [18, 47, 48]. Главными триггерными точками онкогенных мутаций являются экзоны 9 и 20. M. Barbareschi и соавт. сообщили, что мутации, локализованные в экзоне 9, связаны с плохим прогнозом, в то время как мутации, встречающиеся в экзоне 20, – с благоприятным [49].

Что касается связи мутации *PIK3CA* с ответом на проводимую химиотерапию, то согласно результатам многих исследований ее наличие свидетельствует о резистентности опухоли к проводимой терапии. Более того, наличие мутации в гене *PIK3CA*, обычно ассоциируется с устойчивостью к нескольким противоопухолевым агентам, таким как паклитаксел, тамоксифен и трастузумаб [18, 48, 50–52].

Несмотря на то что опухоли с мутированным геном *PIK3CA* являются менее чувствительными к НАХТ

по сравнению с опухолями «дикого» типа, данные о связи наличия мутации с частотой pCR в различных молекулярно-биологических подгруппах довольно противоречивы [18, 48, 50–52]. Так, в исследовании L. Yang и соавт. связь наличия мутации *PIK3CA* с pCR была статистически значимой только для HER2-позитивного подтипа РМЖ [18]. Аналогичные результаты были получены H. Fan и соавт. Авторы отметили более низкую частоту pCR при наличии мутации *PIK3CA* только в подгруппе HER2-позитивного РМЖ, хотя различия были статистически недостоверными [51]. В то же время в исследовании S. Goel и соавт. связь мутаций *PIK3CA* с более низкими показателями pCR была гораздо сильнее в гормонопозитивном HER2-позитивном раке (pCR «дикого» типа 24,2 % по сравнению с мутантным pCR 7,6 %; $p < 0,001$), чем в гормонотриггерных опухолях (pCR «дикого» типа 36,4 % по сравнению с мутантным pCR 27,2 %; $p = 0,125$) [50]. Некоторые авторы вообще не выявили взаимосвязи между мутациями *PIK3CA* и чувствительностью опухоли к химиотерапии [53].

Следует также отметить, что мутация гена *PIK3CA* является одной из причин патологической активации сигнального пути PI3K-Akt-mTOR, связанного с устойчивостью РМЖ к эндокринной терапии [54, 55]. Однако H. Fan и соавт. не обнаружили различий между статусом мутации *PIK3CA* и реакцией на неoadъювантную эндокринную терапию, а V. Guarneri и соавт. вообще показали, что мутация гена *PIK3CA* может привести к благоприятному объективному ответу на эндокринную терапию [51, 56].

Мутации гена *MYC*. *MYC* – многофункциональный онкоген, расположенный на хромосоме человека 8q24.21. Его амплификация и сверхэкспрессия описаны при многих типах рака человека, включая рак яичников, пищевода, нейроblastому, саркому, рак легких и РМЖ [57]. При РМЖ амплификация *MYC* была выявлена в 30–50 % случаев опухолей высокой степени злокачественности [58, 59]. Так, C. V. L. Pereira и соавт. отметили, что экспрессия *MYC* достоверно чаще встречалась при люминальном В типе и HER2-позитивном РМЖ по сравнению с люминальным А типом ($p < 0,05$) [58]. В исследовании T.J. Naab и соавт. амплификация *MYC* также была связана со статусом HER2 ($p = 0,01$) и размером опухоли ($p = 0,01$) [59].

Данные о связи мутаций в гене *MYC* с резистентностью РМЖ к химиотерапии и эндокринной терапии довольно противоречивы. Большинство исследователей относят опухоли с мутациями в гене *MYC* к химио- и гормонорезистентным, независимо от молекулярно-биологического подтипа [58, 60, 61]. Однако в других исследованиях частота pCR зависела от молекулярно-биологического подтипа опухоли [18, 62]. Так, в HER2-позитивных опухолях амплификация *MYC* была связана с более низкими показателями pCR ($p = 0,020$), тогда как в люминальных В HER2-негативных опухолях – с более высокими показателями

pCR ($p = 0,028$). Для тройного негативного РМЖ и люминального В HER2-позитивного подтипа генетические изменения не имели статистически значимой связи с pCR [18].

Таким образом, при РМЖ были широко исследованы многочисленны биомаркеры ответа на НАХТ. Лекарственная устойчивость распространена при всех типах РМЖ и ее прогноз до сих пор остается нерешенной клинической проблемой. Следовательно, по-прежнему необходим поиск маркеров, которые помогут индивидуализировать подходы к лечению РМЖ.

В настоящее время одним из перспективных маркеров ответа опухоли на проводимое лечение рассматривается уровень тканевой гипоксии. Тканевая гипоксия является типовым патологическим процессом, который играет индуцирующую роль в патогенезе опухолевого роста. В результате снижения внутриклеточного напряжения кислорода развиваются сначала функциональные, а затем структурные изменения в ткани опухоли. Уменьшение диффузии кислорода из окружающих тканей сначала сдерживает рост опухоли, но с течением времени условия гипоксии стимулируют неоангиогенез и, следовательно, способствуют росту и метастазированию опухоли [63]. Установлено, что в опухоли >2 мм в диаметре уже отмечается рост собственных сосудов. Эти эффекты реализуются через специфический регуляторный белок – гипоксией индуцированный фактор 1α (HIF- 1α), который активирует транскрипцию множества факторов роста и цитокинов, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), стромальный фактор роста (SDF1), ангиопоэтин 2, Snail, E-кадгерин, виментин, матричные металлопротеиназы, фактор стволовых клеток (SCF), также известный как kit ligand [64–66]. Указанные цитокины участвуют в регуляции ангиогенеза, эпителиально-мезенхимального перехода и иммунологической толерантности.

Что касается влияния гипоксии на чувствительность РМЖ к химиотерапии, то следует отметить, что этот вопрос наиболее детально изучался *in vitro*. Так, на клеточных культурах было показано, что гипоксия приводит к развитию химиорезистентности клеток РМЖ [67–69]. Эти данные подтверждены в ряде клинических исследований. В частности, было отмечено, что у пациенток с экспрессией HIF- 1α достоверно реже наблюдается полный патологический ответ опухоли на НАХТ, чем у пациенток без экспрессии [70–72].

Кроме этого, М. Padró и соавт. было установлено, что под действием гипоксии происходят потеря эстрогеновых рецепторов на поверхности опухолевых клеток и, как следствие, развитие гормонорезистентности РМЖ [73].

Полагают, что развитие химио- и радиорезистентности в условиях гипоксии связано с тем, что в этих условиях клетки РМЖ могут приобретать фенотип стволовых клеток, отличительной чертой которых является низкая чувствительность к лучевой и лекарственной терапии [20–22]. Однако в ряде исследований высокий уровень HIF- 1α был обнаружен в биопсиях первичных G₂₋₃ опухолей молочной железы, а также при инвазивном HER2-позитивном РМЖ, характеризующимся высокой степенью агрессивности и худшим прогнозом [74]. Таким образом, с одной стороны, низкодифференцированные и HER2-позитивные опухоли более чувствительны к химиотерапии [14, 19, 26, 27], с другой, согласно данным А. Badowska-Kozakiewicz и соавт. [74] в этих опухолях чаще наблюдается высокий уровень экспрессии HIF- 1α , т.е. маркера, связанного с химио- и радиорезистентностью [70–72]. Возможно, данное противоречие свидетельствует о том, что роль гипоксии в развитии резистентности опухоли к лекарственной и лучевой терапии недостаточно исследована.

Таким образом, несмотря на определенные успехи в изучении факторов, связанных с чувствительностью РМЖ к химио- и лучевой терапии, остается много неразрешенных вопросов, связанных, в первую очередь, с противоречивостью полученных результатов и отсутствием надежных предиктивных маркеров индивидуального ответа опухоли на проводимую терапию. Актуальность научных изысканий в данном направлении несомненна, так как они будут способствовать не только решению проблемы индивидуализации лечения пациенток с РМЖ, но и повышению его эффективности за счет выявления ключевых механизмов, связанных с развитием химио- и радиорезистентности злокачественных новообразований и, следовательно, с возможностью влиять на эти механизмы. Полагаем, что дальнейшее комплексное изучение предиктивной значимости мутаций различных регуляторных генов, а также маркеров гипоксии, ангиогенеза, эпителиально-мезенхимального перехода и иммунологической толерантности может способствовать решению данной проблемы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. 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. 250 с. [Malignant tumors in Russia in 2018(morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow:

MNIOI im. P.A. Gertsen – filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2019. 250 p. (In Russ.).]

2. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году. Под ред.

- А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. 236 с. [State of oncological care in Russia in 2018. Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena – filial FGBU "NMITS radiologii" Minzdrava Rossii, 2019. 236 p. (In Russ.)].
3. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., Палтуев Р.М. и др. Неoadъювантное лечение рака молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2014;(2):30–6. [Semiglazov V.F., Semiglazov V.V., Paltuev R.M. et al. Neoadjuvant treatment for breast cancer. Oпухоли zhenskoy reproduktivnoi sistemy = Tumors of Female Reproductive System 2014;(2):30–6. (In Russ.)].
 4. Колядина И.В., Поддубная И.В., Павликова О.А. и др. Эволюция неoadъювантного подхода при первично-операбельном раке молочной железы в последнюю декаду: модный тренд или реальная клиническая практика? Современная онкология 2017;19(1):9–16. [Kolyadina I.V., Poddubnaya I.V., Pavlikova O.A. et al. The evolution of neoadjuvant approach in primary operable breast cancer last decade: modern trend or a real clinical practice? Sovremennaya onkologiya = Modern Oncology 2017;19(1):9–16. (In Russ.)].
 5. Игнатъева В.И., Грецова О.П., Стенина М.Б. и др. Социально-экономическое бремя рака молочной железы в РФ. Медицинские технологии. Оценка и выбор 2016;4(26):32–49. [Ignatyeva V.I., Gretsova O.P., Stenina M.B. et al. Social and economic burden of breast cancer in the Russian Federation. Medical technologies. Otsenka i vybor = Assessment and Choice 2016;4(26):32–49. (In Russ.)].
 6. Авксентьева М.В., Горкавенко Ф.В., Никитина А.В. и др. Оценка социально-экономического бремени рака легкого в Российской Федерации. Медицинские технологии. Оценка и выбор 2018;4(34):63–75. DOI: 10.31556/2219-0678.2018.34.4.063-075. Avksent'eva M.V., Gorkavenko F.V., Nikitina A.V. et al. Assessing the socioeconomic burden of lung cancer in the Russian Federation. Medical technology. Otsenka i vybor = Assessment and Choice 2018;4(34):63–75. (In Russ.)].
 7. Стенина М.Б., Жукова Л.Г., Королева И.А. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению инвазивного рака молочной железы. Злокачественные опухоли. Российское общество клинической онкологии 2019;9(3):145–9. DOI: 10.18027/2224-5057-2019-9-3s2-128-163. [Stenina M.B., Zhukova L.G., Koroleva I.A. et al. Practical guidelines for the drug treatment of invasive breast cancer. Malignant tumors. Rossiyskoye obshchestvo klinicheskoy onkologii = Russian Society of Clinical Oncology 2019;9(3):145–9. (In Russ.)].
 8. Лисаева А.А., Вишневская Я.В., Рошин Е.М. и др. Лечебный патоморфоз злокачественных опухолей: клинические и морфологические критерии. Классификации. Прогностическое значение лечебного патоморфоза при раке молочной железы и других опухолях. Опухоли женской репродуктивной системы 2011;(4):19–23. [Lisaeva A.A., Vishnevskaya Ya.V., Roshchin E.M. et al. Therapeutic pathomorphism of malignancies: Clinical and morphological criteria. Classifications. Prognostic value of therapeutic pathomorphism in breast cancer and other tumors. Oпухоли zhenskoy reproduktivnoi sistemy = Tumors of Female Reproductive System 2011;(4):19–23. (In Russ.)].
 9. Павликова О.А., Поддубная И.В., Колядина И.В. и др. Клинико-рентгенологическая оценка эффективности предоперационной лекарственной терапии при различных биологических подтипах рака молочной железы стадий T1–3N0–1M0. Современная онкология 2017;19(4):16–21. [Pavlikova O.A., Poddubnaya I.V., Kolyadina I.V. et al. Clinical and radiological evaluation the effectiveness of preoperative systemic therapy in different biological subtypes of breast cancer stages T1–3N0–1M0. Sovremennaya onkologiya = Modern Oncology 2017;19(4):16–21. (In Russ.)].
 10. Лавникова Г.А. Гистологический метод количественной оценки терапевтического повреждения опухоли. М.: Методические рекомендации, 1979. 13 с. [Lavnikova G.A. Histological method for quantifying therapeutic tumor damage Moscow: Metodicheskie rekomendacii, 1979. 13 p. (In Russ.)].
 11. Loibl S., Jackisch C., Lederer B. et al. Outcome after neoadjuvant chemotherapy in young breast cancer patients: a pooled analysis of individual patient data from eight prospectively randomized controlled trials. Breast Cancer Res Treat 2015;152(2):377–87. DOI: 10.1007/s10549-015-3479-z.
 12. Von Waldenfels G., Loibl S., Furlanetto J. et al. Outcome after neoadjuvant chemotherapy in elderly breast cancer patients – a pooled analysis of individual patient data from eight prospectively randomized controlled trials. Oncotarget 2018;9(20):15168–79. DOI: 10.18632/oncotarget.24586.
 13. Sasanpour P., Sandoughdaran S., Mosavi-Jarrahi A., Malekzadeh M. Predictors of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in Iranian breast cancer patients. Asian Pac J Cancer Prev 2018;19(9):2423–7. DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.9.2423.
 14. Павликова О.А., Колядина И.В., Комов Д.В. и др. Факторы-предикторы достижения полного лекарственного патоморфоза при неoadъювантной химиотерапии первично-операбельного рака молочной железы. Современная онкология 2017;19(1):24–9. [Pavlikova O.A., Kolyadina I.V., Komov D.V. et al. Predictive factors of achievement pathological complete response at neoadjuvant chemotherapy of primary operable breast cancer. Sovremennaya onkologiya = Modern Oncology 2017;19(1):24–9. (In Russ.)].
 15. Рошин Е.М., Зубанова А.А., Колядина И.В. Лечебный патоморфоз как критерий эффективности лечения и прогноза рака молочной железы. Медицинский альманах 2010;12(3):48–53. [Roshchin E.M., Zubanova A.A., Kolyadina I.V. Therapeutic pathomorphosis as a criterion for the effectiveness of treatment and prognosis of breast cancer. Meditsinskiy al'manakh = Medical Almanac 2010;12(3):48–53. (In Russ.)].
 16. Hwang H.W., Jung H., Hyeon J. et al. A nomogram to predict pathologic complete response (pCR) and the value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 2019;173(2):255–66. DOI: 10.1007/s10549-018-4981-x.
 17. Uematsu T., Kasami M., Watanabe J. et al. Is lymphovascular invasion degree one of the important factors to predict neoadjuvant chemotherapy efficacy in breast cancer? Breast Cancer 2011;18(4):309–13. DOI: 10.1007/s12282-010-0211-z.
 18. Yang L., Ye F., Bao L. et al. Somatic alterations of TP53, ERBB2, PIK3CA and CCND1 are associated with chemosensitivity for breast cancers. Cancer Sci 2019;110(4):1389–400. DOI: 10.1111/cas.13976.
 19. Dave R.V., Millican-Slater R., Dodwell D. et al. Neoadjuvant chemotherapy with MRI monitoring for breast cancer. Br J Surg 2017;104(9):1177–87. DOI: 10.1002/bjs.10544.
 20. Shiraishi Y., Kataoka K., Chiba K. et al. A comprehensive characterization of cis-acting splicing-associated variants in human cancer. Genome Res 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.1101/162560.
 21. Brooks D.L., Luciana P.S., Krutilina R. et al. ITGA6 is directly regulated by hypoxia-inducible factors and enriches for cancer stem cell activity and invasion in metastatic breast cancer models. Mol Cancer 2016;15:26. DOI: 10.1186/s12943-016-0510-x.
 22. Zhang C., Samanta D., Lu H. et al. Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation

- of NANOG mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(14):E2047–56. DOI: 10.1073/pnas.1602883113.
23. Schlötter C.M., Tietze L., Vogt U. et al. Ki-67 and lymphocytes in the pretherapeutic core biopsy of primary invasive breast cancer: positive markers of therapy response prediction and superior survival. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2017;32(2). DOI: 10.1515/hmbci-2017-0022.
 24. Salgado R., Denkert C., Campbell C. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and associations with pathological complete response and event-free survival in HER2-positive early-stage breast cancer treated with lapatinib and trastuzumab: a secondary analysis of the NeoALTTO Trial. *JAMA Oncol* 2015;1(4):448–54. DOI: 10.1001/jamaoncol.2015.0830
 25. Solinas C., Ceppi M., Lambertini M. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in patients with HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab, lapatinib or their combination: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Treat Rev* 2017; 57:8–15. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.04.005.
 26. Yoshioka T., Hosoda M., Yamamoto M. et al. Prognostic significance of pathologic complete response and Ki-67 expression after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer* 2015;22(2):185–91. DOI: 10.1007/s12282-013-0474-2.
 27. Kurozumi S., Inoue K., Takei H. et al. ER, PgR, Ki-67, p27(Kip1), and histological grade as predictors of pathological complete response in patients with HER2-positive breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy using taxanes followed by fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide concomitant with trastuzumab. *BMC Cancer* 2015;15:622. DOI: 10.1186/s12885-015-1641-y.
 28. Bottini A., Berruti A., Brizzi M.P. et al. Single agent epirubicin versus the combination epirubicin plus tamoxifen as primary chemotherapy in breast cancer patients. A single institution phase III trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003;22:abstract 80.
 29. Smirnova O.V., Borisov V.I., Guens G.P. The evolution of knowledge of triple-negative breast cancer: from biology to novel drug treatment. *Malig Tumors* 2017;1:5–17. DOI: 10.18027/2224-5057-2017-1-5-17.
 30. Burstein M.D., Tsimelzon A., Poage G.M. et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21(7):1688–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0432.
 31. Lehmann B.D., Bauer J.A., Chen X. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121:2750–67. DOI: 10.1172/JCI45014.
 32. Masuda H., Baggerly K.A., Wang Y. et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res* 2013;19(19):5533–40. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0799.
 33. Gucalp A., Tolane S., Isakoff S.J. et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor positive, estrogen receptor negative metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(19):5505–12. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3327.
 34. Tan Q.X., Qin Q.H., Yang W.P. et al. Prognostic value of Ki-67 expression in HR-negative breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(10):6862–70.
 35. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы. Практическая онкология 2010;11(4):258–66. [Imyanitov E.N. Hereditary breast cancer. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology* 2010;11(4):258–66. (In Russ.)].
 36. Chacón R.D., Costanzo M.V. Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12(Suppl 2):S3. DOI: 10.1186/bcr2574.
 37. Byrski T., Gronwald J., Huzarski T. et al. Pathologic complete response rates in young women with BRCA-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2010;28:375–9. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.7019.
 38. Foedermayr M., Sebesta M., Rudas M. et al. BRCA-1 methylation and TP53 mutation in triple-negative breast cancer patients without pathological complete response to taxane-based neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014;73(4):771–8. DOI: 10.1007/s00280-014-2404-1.
 39. Von Minckwitz G., Blohmer J.U., Costa S.D. et al. Response-guided neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 2013;31(29):3623–30. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.0940.
 40. Hahnen E., Lederer B., Hauke J. et al. Germline mutation status, pathological complete response, and disease-free survival in triple-negative breast cancer. *JAMA Oncol* 2017;3:1378. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.1007.
 41. Tutt A., Tovey H., Chon M. et al. A randomised phase III trial of carboplatin compared with docetaxel in BRCA1/2 mutated and pre-specified triple negative breast cancer “BRCAness” subgroups: the TNT Trial. *Nat Med* 2018; 24(5):628–37. DOI: 10.1038/s41591-018-0009-7.
 42. Caramelo O., Silva C., Caramelo F. et al. The effect of neoadjuvant platinum-based chemotherapy in BRCA mutated triple negative breast cancers – systematic review and meta-analysis. *Hered Cancer Clin Pract* 2019;17:11. DOI: 10.1186/s13053-019-0111-y.
 43. Sikov W.M., Berry D.A., Perou C.M. et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol* 2015;33(1):13–21. DOI: 10.1200/JCO.2014.57.0572.
 44. Sporikova Z., Koudelakova V., Trojanec R., Hajdich M. Genetic markers in triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2018;18(5):e841–50. DOI: 10.1016/j.clbc.2018.07.023.
 45. Darb-Esfahani S., Denkert C., Stenzinger A. et al. Role of TP53 mutations in triple negative and HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Oncotarget* 2016;7(42):67686–98. DOI: 10.18632/oncotarget.11891.
 46. Wang Y., Xu Y., Chen J. et al. TP53 mutations are associated with higher rates of pathologic complete response to anthracycline/cyclophosphamide-based neoadjuvant chemotherapy in operable primary breast cancer. *Int J Cancer* 2016;138(2):489–96. DOI: 10.1002/ijc.29715.
 47. Филипенко М.Л., Оськина Н.А., Оскорбин И.А. и др. Соматические мутации гена *PIK3CA* в опухолях больных раком молочной железы. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2016;19(12):28–33. [Filipenko M.L., Os'kina N.A., Oskorbin I.A. et al. Somatic mutations of the *PIK3CA* gene in tumors of patients with breast cancer. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoy i farmaceuticheskoy khimii = Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry Issues* 2016;19(12):28–33. (In Russ.)].
 48. Alqahtani A., Ayesh H.S.K., Halawani H. *PIK3CA* Gene mutations in solid malignancies: association with clinicopathological parameters and prognosis. *Cancers* 2020;12(1):93. DOI: 10.3390/cancers12010093.
 49. Barbareschi M., Buttitta F., Felicioni L., Cotrupi S. Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the *PIK3CA* gene in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2007;13(20):6064–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0266.
 50. Goel S., Krop I.E. *PIK3CA* mutations in HER2-positive breast cancer: an ongoing conundrum. *Ann Oncol* 2016;27:1368–72. DOI: 10.1093/annonc/mdw246.
 51. Fan H., Li C., Xiang Q. et al. *PIK3CA* mutations and their response to neoadjuvant treatment in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Thorac Cancer* 2018;9(5):571–9. DOI: 10.1111/1759-7714.12618.
 52. Seo Y., Park Y.H., Ahn J.S. et al. *PIK3CA* mutations and neoadjuvant therapy outcome in patients with human epidermal

- growth factor receptor 2-positive breast cancer: a sequential analysis. *J Breast Cancer* 2018;21(4):382–90. DOI: 10.4048/jbc.2018.21.e48.
53. Liedtke C., Cardone L., Tordai A. et al. PIK3CA-activating mutations and chemotherapy sensitivity in stage II–III breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008;10(2):R27. DOI: 10.1186/bcr1984.
54. Brown K.K., Toker A. The phosphoinositide 3-kinase pathway and therapy resistance in cancer. *F1000Prime Rep* 2015;7:13. DOI: 10.12703/P7-13.
55. Ellis M.J., Lin L., Crowder R. et al. Phosphatidylinositol-3-kinase alpha catalytic subunit mutation and response to neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119(2):379–90. DOI: 10.1007/s10549-009-0575-y.
56. Guarneri V., Generali D.G., Frassoldati A. et al. Double-blind, placebo-controlled, multicenter, randomized, phase IIb neoadjuvant study of letrozole-lapatinib in postmenopausal hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative, operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2014;32(10):1050–7. DOI: 10.1200/JCO.2013.51.4737.
57. Dang C.V. MYC on the path to cancer. *Cell* 2012;149(1):22–35. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.003.
58. Pereira C.B.L., Lea M.F., Souza C.R.T. et al. Prognostic and predictive significance of MYC and KRAS Alterations in breast cancer from women treated with neoadjuvant chemotherapy. *PLoS One* 2013;8(3):e60576. DOI: 10.1371/journal.pone.0060576
59. Naab T.J., Gautam A., Ricks-Santi L. et al. MYC amplification in subtypes of breast cancers in African American women. *BMC Cancer* 2018;18(1):274. DOI: 10.1186/s12885-018-4171-6.
60. Fallah Y., Brundage J., Allegakoen P., Shajahan-Haq A.N. MYC-driven pathways in breast cancer subtypes. *Biomolecules* 2017;7(3):53. DOI: 10.3390/biom7030053.
61. Li C.Y., Su W., Zhang S. et al. Effects of cell cycle regulatory genes on breast cancer neo-adjuvant chemotherapy by M-FISH. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2017;97(34):2682–6. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2017.34.009.
62. Yasojima H., Shimomura A., Naoi Y. et al. Association between C-MYC amplification and pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Cancer* 2011;47(12):1779–88. DOI: 10.1016/j.ejca.2011.06.017.
63. Пожилова Е.В., Новиков В.Е. Роль фактора адаптации к гипоксии в развитии опухолей. Вестник Смоленской государственной медицинской академии 2015;14(3):16–20. [Pozhilova E.V., Novikov V.E. The role of the factor of adaptation to hypoxia in the development of tumors. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii = Bulletin of the Smolensk State Medical Academy* 2015;14(3):16–20. (In Russ.)].
64. Bao B., Azmi A.S., Ali S. et al. The biological kinship of hypoxia with CSC and EMT and their relationship with deregulated expression of miRNAs and tumor aggressiveness. *Biochim Biophys Acta* 2012;1826(2):272–96. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.04.008.
65. Liu Z.J., Semenza G.L., Zhang H.F. Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis. *J Zhejiang Univ Sci B* 2015;16(1):32–43. DOI: 10.1631/jzus.B1400221.
66. Zonneville J., Safina A., Truskinovsky A.M. et al. TGF- β signaling promotes tumor vasculature by enhancing the pericyte-endothelium association. *BMC Cancer* 2018;18(1):670. DOI: 10.1186/s12885-018-4587-z.
67. Li S., Zhang Q., Zhou L. et al. Inhibitory effects of compound DMBT on hypoxia-induced vasculogenic mimicry in human breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2017;96:982–92. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.11.137.
68. Zhang J., Zhang J., Xu S. et al. Hypoxia-induced TPM2 methylation is associated with chemoresistance and poor prognosis in breast cancer. *Cell Physiol Biochem* 2018;45(2):692–705. DOI: 10.1159/000487162.
69. Bharti R., Dey G., Das A.K., Mandal M. Differential expression of IL-6/IL-6R and MAO-A regulates invasion/angiogenesis in breast cancer. *Br J Cancer* 2018;118(11):1442–52. DOI: 10.1038/s41416-018-0078-x.
70. Milani M., Venturini S., Bonardi S. et al. Hypoxia-related biological markers as predictors of epirubicin-based treatment responsiveness and resistance in locally advanced breast cancer. *Oncotarget* 2017;8(45):78870–81. DOI: 10.18632/oncotarget.20239.
71. Rundqvist H., Johnson R.S. Tumour oxygenation: implications for breast cancer prognosis. *J Intern Med* 2013;274(2):105–12. DOI: 10.1111/joim.12091.
72. Nie C., Lv H., Bie L. et al. Hypoxia-inducible factor 1- α expression correlates with response to neoadjuvant chemotherapy in women with breast cancer. *Medicine (Baltimore)* 2018;97(51):e13551. DOI: 10.1097/MD.00000000000013551.
73. Padró M., Louie R.J., Lananna B.V. et al. Genome-independent hypoxic repression of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *BMC Cancer* 2017;17(1):203. DOI: 10.1186/s12885-017-3140-9.
74. Badowska-Kozakiewicz A., Sobol M., Patera J. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in invasive breast cancer with metastasis to lymph nodes: correlation with steroid receptors, HER2 and EPO-R. *Adv Clin Exp Med* 2016;25(4):741–50. DOI: 10.17219/acem/63143.

Вклад авторов

Е.Ю. Зубарева: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;

М.А. Сеньчукова: написание текста рукописи.

Authors' contributions

E.Yu. Zubareva: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data;

M.A. Sen'chukova: article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.Ю. Зубарева / E.Yu. Zubareva: <https://orcid.org/0000-0001-7025-0206>

М.А. Сеньчукова / M.A. Sen'chukova: <https://orcid.org/0000-0001-8371-740X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 29.06.2020. **Принята к публикации:** 23.07.2020.

Article submitted: 29.06.2020. **Accepted for publication:** 23.07.2020.

Анализ экспрессии генов семейства ABC-транспортеров в опухоли молочной железы: связь с эффективностью химиотерапии и прогнозом заболевания

М.М. Цыганов¹, М.К. Ибрагимова¹, А.М. Певзнер^{1,2}, К.А. Гаптулбарова^{1,2},
Е.Ю. Гарбуков¹, Е.М. Слонимская¹, Е.А. Усынин¹, Н.В. Литвяков¹

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

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»;
Россия, 634050 Томск, проспект Ленина, 36

Контакты: Матвей Михайлович Цыганов TsyganovMM@yandex.ru

Введение. Одной из основных причин неэффективности химиотерапии по-прежнему считают формирование фенотипа множественной лекарственной устойчивости опухоли за счет экспрессии энергозависимых белков ABC-транспортеров. Результаты предыдущих наших исследований для некоторых генов ABC позволили установить, что экспрессия данных генов коррелирует с эффективностью неoadъювантной химиотерапии (НХТ). Стоит отметить, что некоторые из клинических исследований указывают на то, что ABC-транспортеры могут влиять не только на формирование химиорезистентности в опухоли, но также на прогрессию, инвазию и метастазирование опухолевого узла.

Цель исследования – оценка уровня транскриптов всех известных 49 генов ABC в опухоли молочной железы до и после проведения лечения и их прогностической значимости.

Материалы и методы. В исследование была включена 31 пациентка с диагнозом рака молочной железы IIA–IIIB стадий. РНК выделяли из парных образцов опухолевой ткани до и после НХТ. Проведено микроматричное исследование всех образцов опухоли на микрочипах Clariom™ S Assay, human. С помощью микроматричного исследования изучена экспрессия 49 генов семейства ABC-транспортеров. Анализ данных микрочипа осуществляли с использованием программы Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0.

Результаты. Установлено, что изменение экспрессии (повышение/снижение в процессе НХТ) генов ABCA5, ABCA7, ABCB1, ABCB4, ABCB11, ABCC1, ABCC10, ABCC11, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, ABCG8 статистически значимо связано с ответом на НХТ. Кроме этого, установлена прогностическая значимость экспрессии генов ABCB1 и ABCB4. Анализ выживаемости продемонстрировал, что показатели 5-летней выживаемости у больных с высокой экспрессией генов ABCB1 и ABCB4 ниже по сравнению таковыми у пациенток с низкой экспрессией данных генов (log-rank-тест $p = 0,001$ и $0,04$ соответственно).

Заключение. Получены данные о связи экспрессии генов семейства ABC-транспортеров с эффективностью НХТ у больных раком молочной железы и исходом заболевания. Установлен прогностический потенциал генов ABCB1 и ABCB4 у больных раком молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, микроматричные исследования, транскриптом, ABC-транспортеры, неoadъювантная химиотерапия, прогноз

Для цитирования: Цыганов М.М., Ибрагимова М.К., Певзнер А.М. и др. Анализ экспрессии генов семейства ABC-транспортеров в опухоли молочной железы: связь с эффективностью химиотерапии и прогнозом заболевания. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(2):29–38.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-2-29-38



Gene expression analysis of ABC transporter family in breast tumors: relationship with chemotherapy effect and disease prognosis

M.M. Tsyganov¹, M.K. Ibragimova¹, A.M. Pevzner^{1,2}, K.A. Gaptulbarova^{1,2}, E.Yu. Garbukov¹,
E.M. Slonimskaya¹, E.A. Usynin¹, N.V. Litviakov¹

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

²Tomsk State University; 36 Prospekt Lenina, Tomsk 634050, Russia

Background. One of the main reasons of the ineffectiveness of chemotherapy is still considered to be the formation of the multidrug resistance phenotype of the tumor due to the expression of energy-dependent proteins of ABC transporters. Our previous studies for some ABC genes have established that the expression of these genes correlates with the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy (NAC). Some of the clinical studies indicate that ABC transporters can influence not only the formation of chemoresistance in the tumor, but also the progression, invasion and metastasis of the tumor node.

Objective: to evaluate the level of transcription of all 49 known ABC genes in a breast tumor before and after treatment and their prognostic significance.

Materials and methods. The study included 31 patients with a diagnosis of stage IIA – IIIB breast cancer. RNA was isolated from paired samples of tumor tissue before and after NAC. A microarray study of all tumor samples was performed on Clariom™ S Assay, human microarrays. Using microarray studies, the expression of 49 genes of the ABC transporter family was studied. Analysis of the microchip data was carried out using the program Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0.

Results. It was found that changes in the expression (increase/decrease during NAC) of the ABCA5, ABCA7, ABCB1, ABCB4, ABCB11, ABCC1, ABCC10, ABCC11, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, ABCG8 genes are statistically significantly associated with the response to NAC. In addition, the prognostic significance of ABCB1 and ABCB4 gene expression was established. Survival analysis showed that 5-year survival rates in patients with high gene expression of ABCB1 and ABCB4 are lower compared to patients with low expression of these genes (log-rank-test $p = 0.001$ and 0.04 respectively).

Conclusion. Data were obtained on the relationship of gene expression of the ABC transporter family with the effect of NAC in patients with breast cancer and the outcome of the disease. The prognostic potential of the ABCB1 and ABCB4 genes in patients with breast cancer has been established.

Key words: breast cancer, microarray, transcript, ABC transporters, neoadjuvant chemotherapy, prognosis

For citation: Tsyganov M.M., Ibragimova M.K., Pevzner A.M. et al. Gene expression analysis of ABC transporter family in breast tumors: relationship with chemotherapy effect and disease prognosis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2020;7(2):29–38. (In Russ.).

Введение

На сегодняшний день системная химиотерапия является важным компонентом комплексного лечения больных раком молочной железы (РМЖ), при этом в качестве стандарта используются различные схемы химиотерапии на основе препаратов антрациклинового ряда, 5-фторурацила, препаратов платины, растительного происхождения и т. д. [1]. Как правило, использование химиотерапии для лечения РМЖ ограничено индивидуальной вариабельностью пациентов и опухоли в ответе на лекарственное лечение и развитием резистентности опухолевых клеток. Хорошо известно, что ксенобиотики, в том числе противоопухолевые препараты, интенсивно метаболизируются в организме посредством различных механизмов, в частности процесса биотрансформации [2], который обусловлен экспрессией группы энергозависимых ABC-транспортёров (АТФ-Binding Cassette transporter), играющих решающую роль в развитии лекарственной устойчивости опухолевых клеток [3]. Текущий уровень современных исследований показывает, что экспрессия генов ABC связана с эффективностью лекарственного лечения [4, 5]. Причем данный факт установлен не только в клинической практике, но и на клеточных линиях и животных моделях [6]. Важно отметить, что результаты некоторых клинических исследований указывают на то, что ABC-транспортёры могут оказывать влияние не только на формирование множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, но и на прогрессию, инвазию и метастазирование опухоли [5, 7]. В подавляющем большинстве случаев исследования ABC-транспортёров на клиническом материале ограничиваются 5–10 из 49 генов этого семейства, для которых показано значение для формирования множественной лекарственной устойчивости. Однако значение других генов семейства ABC-транспортёров также нельзя полностью исключать.

Цель исследования – оценка уровня транскриптов всех известных 49 генов ABC в опухоли молочной железы до и после проведения лечения и их прогностического потенциала.

Материалы и методы

В исследование был включен 31 больной люминальным В типом РМЖ стадий IIA–IIIC с морфологически верифицированным диагнозом в возрасте 25–68 ($49,1 \pm 2$) лет. Больные находились на лечении в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2006 по 2017 г.

В соответствии с рекомендациями Консенсусной конференции по неoadъювантной химиотерапии (НХТ) при раке молочной железы (26–28 апреля 2003 г. Филадельфия, Пенсильвания) [8] все больные получали 4–8 курсов НХТ по схемам AC (фторурацил, доксорубин, циклофосфан), САХ (циклофосфан, доксорубин, капецитабин) или монотерапию таксотером. Затем выполняли операцию, далее больным проводили 2 курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC, а лучевую терапию и/или гормональное лечение назначали по показаниям. Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (исправленной в 2013 г.), получено разрешение локального этического комитета НИИ онкологии Томского НИМЦ. Использовали биопсийные опухолевые образцы (~ 10 мм³), взятые до лечения под ультразвуковым контролем, а также операционный материал (~ 60 – 70 мм³) после НХТ (через 4–5 нед после последнего курса НХТ). Образцы опухоли помещали в раствор RNAlater (Ambion, США) и сохраняли при температуре -80 °C (после 24-часовой инкубации при $+4$ °C) для дальнейшего выделения РНК.

Выделение РНК. РНК выделяли из 31 парного образца до лечения и после НХТ с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию

Таблица 1. Клинико-патологические параметры больных раком молочной железы
Table 1. Clinical and pathological parameters of patients with breast cancer

Клинико-патологический параметр Clinical and pathological parameter	Число больных, n (%) The number of patients, n (%)
Возраст, лет: Age, years:	
≤45	9 (29,0)
>45	22 (71,0)
Менструальный статус: Menstrual status:	
пременопауза premenopause	16 (51,6)
постменопауза postmenopause	15 (48,4)
Гистологический тип: Histological type:	
инвазивный протоковый рак invasive ductal carcinoma	17 (54,8)
инвазивный дольковый рак invasive lobular carcinoma	14 (45,2)
Размер опухоли: Tumor size:	
T1	2 (6,5)
T2	26 (83,9)
T3	1 (3,2)
T4	2 (6,5)
Лимфогенное метастазирование: Lymphogenic metastasis:	
N0	12 (38,7)
N1	13 (41,9)
N2	3 (9,7)
N3	3 (9,7)
Стадия: Stage:	
IIA	13 (41,9)
IIB	11 (35,5)
IIIA	3 (9,7)
IIIB	1 (3,2)
IIIC	3 (9,7)
Гистологическая форма: Histological form:	
уницентрическая unicentric	18 (58,1)
мультицентрическая multicentric	13 (41,9)
Схема неoadъювантной химиотерапии: Neoadjuvant chemotherapy scheme:	
CAX	11 (35,5)
AC	14 (45,2)
таксотер taxotere	6 (19,4)
Эффективность неoadъювантной химиотерапии: Reply to the neoadjuvant chemotherapy:	
полная регрессия complete regression	2 (6,5)
частичная регрессия partial regression	18 (58,1)
стабилизация stabilization	10 (32,3)
прогрессирование progression	1 (3,2)

Примечание. CAX – циклофосфан, доксорубин, капецитабин; AC – фторурацил, доксорубин, циклофосфан.

Note. CAX – cyclophosphamide, doxorubicin, capecitabine; AC – fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide.

и чистоту выделения РНК оценивали на флуориметре Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Для РНК концентрация составила 80–250 нг/мкл. Целостность РНК оценивали с помощью капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, США). Номер целостности РНК (RIN) составил 6,4–8,1.

Исследование экспрессии генов семейства ABC-транспортеров. Анализ экспрессии 49 генов семейства ABC-транспортеров проводили на микроматричной платформе Clariom™ S Assay, human (ThermoFisher Scientific, США). Данная микроматрица позволяет проанализировать экспрессию более 20 тыс. основных генов человека. Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, США). Анализ данных микрочипа осуществляли с помощью программы Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0. Уровень экспрессии для каждой пациентки выражали в виде логарифма по основанию 2. Нормализацию данных экспрессии выполняли, как описано в статье [9].

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Для проверки нормальности выборки применяли критерий Шапиро–Уилка. Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое и среднюю квадратичную ошибку. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни. Для коррекции уровней значимости на множественные сравнения применяли поправку Бонферрони, рассчитанную как отношение 0,05/49, где 49 – количество анализируемых генов. Уровень *p* считали статистически значимым с учетом поправки на множественные сравнения при значении 0,001. Для анализа показателей общей и безметастатической выживаемости (БМВ) использовали кривые выживаемости, построенные по методу Каплана–Майера, и *log-rank*-тест. Для оценки различий в частотах снижения и повышения экспрессии генов в группах с объективным ответом на НХТ и без ответа на нее использовали χ^2 -критерий (<http://vassarstats.net/index.html>).

Результаты

В результате проведенного исследования с помощью микроматрицы оценена экспрессия 49 генов семейства ABC-транспортеров. На 1-м этапе был проведен анализ связи эффективности НХТ с основными клинико-патологическими характеристиками пациенток (возраст, менструальный статус, гистологический тип, размер опухоли, лимфогенное метастазирование, гистологическая форма) (табл. 1). Установлено, что ни один из параметров не оказывает статистически значимое влияние на эффективность НХТ (данные не представлены). Далее мы оценили связь экспрессии генов ABC-транспортеров

с основными клинико-патологическими характеристиками пациенток. Статистически значимые различия экспрессии были установлены только для пациенток с разным размером опухоли и эффективностью химиотерапии. Показано, что уровень экспрессии генов *ABCB1*, *ABCB8*, *ABCC2*, *ABCC4*, *ABCD1*, *ABCG4*, *ABCG8* выше в группе пациенток с Т3–4 по сравнению с таковым у пациенток с Т1–2 ($p < 0,05$) (данные не представлены).

Интересный результат показан для эффективности химиотерапии. В табл. 2 представлены данные о связи экспрессии с эффективностью НХТ.

У всех пациенток в группе с объективным ответом на НХТ уровень экспрессии генов *ABCB1*, *ABCB2*, *ABCB3*, *ABCB7*, *ABCC3*, *ABCC5*, *ABCF1*, *ABCF3*, *ABCG4* в опухоли до лечения статистически значимо выше, чем в группе больных с отсутствием ответа на НХТ (см. табл. 2). Однако при использовании поправки Бонферрони на множественные сравнения ни по одному гену статистическая значимость не достигалась. Важно отметить, что полученный результат согласуется с данными наших предыдущих исследований, а также с данными литературы. Установлено, что исходный уровень экспрессии исследуемых генов слабо связан

Таблица 2. Связь начального уровня экспрессии генов ABC с эффективностью неoadъювантной химиотерапии

Table 2. Relationship of the initial level of ABC gene expression with the effect of neoadjuvant chemotherapy

Ген Gene	Полная и частичная регрессия (n = 20) Full and partial regression (n = 20)	Прогрессирование и стабилизация (n = 11) Progression and stabilization (n = 11)	p
<i>ABCA1</i>	10,14 ± 0,37	9,22 ± 0,51	0,23
<i>ABCA2</i>	7,31 ± 0,20	7,34 ± 0,23	0,93
<i>ABCA3</i>	7,98 ± 0,30	7,69 ± 0,34	0,57
<i>ABCA4</i>	6,76 ± 0,19	6,19 ± 0,38	0,40
<i>ABCA5</i>	9,95 ± 0,33	9,57 ± 0,51	0,86
<i>ABCA6</i>	7,25 ± 0,20	7,08 ± 0,27	0,50
<i>ABCA7</i>	9,64 ± 0,39	8,76 ± 0,49	0,17
<i>ABCA8</i>	7,95 ± 0,32	7,56 ± 0,38	0,56
<i>ABCA9</i>	7,60 ± 0,26	7,05 ± 0,32	0,15
<i>ABCA10</i>	6,48 ± 0,28	5,70 ± 0,31	0,14
<i>ABCA11P</i>	8,77 ± 0,34	7,88 ± 0,43	0,11
<i>ABCA12</i>	9,67 ± 0,54	9,07 ± 0,96	0,40
<i>ABCA13</i>	6,87 ± 0,30	6,59 ± 0,40	0,71
<i>ABCB1</i>	6,44 ± 0,23	5,76 ± 0,33	0,01
<i>ABCB2</i>	10,30 ± 0,35	9,38 ± 0,38	0,02
<i>ABCB3</i>	8,66 ± 0,26	7,33 ± 0,36	0,007
<i>ABCB4</i>	6,78 ± 0,29	6,57 ± 0,38	0,50
<i>ABCB5</i>	7,32 ± 0,46	6,27 ± 0,57	0,13
<i>ABCB6</i>	5,83 ± 0,18	5,33 ± 0,27	0,06
<i>ABCB7</i>	9,80 ± 0,37	8,55 ± 0,48	0,04
<i>ABCB8</i>	6,36 ± 0,17	5,75 ± 0,26	0,07
<i>ABCB9</i>	6,55 ± 0,26	6,03 ± 0,26	0,24
<i>ABCB10</i>	8,42 ± 0,23	7,71 ± 0,44	0,11
<i>ABCB11</i>	5,86 ± 0,31	5,51 ± 0,42	0,39
<i>ABCC1</i>	8,65 ± 0,33	8,44 ± 0,37	0,82
<i>ABCC2</i>	5,26 ± 0,26	5,29 ± 0,59	0,95
<i>ABCC3</i>	9,30 ± 0,50	7,58 ± 0,43	0,03
<i>ABCC4</i>	7,49 ± 0,20	7,20 ± 0,42	0,32
<i>ABCC5</i>	8,51 ± 0,28	7,51 ± 0,33	0,01
<i>ABCC6</i>	8,53 ± 0,21	8,10 ± 0,35	0,20
<i>ABCC7</i>	5,64 ± 0,25	5,14 ± 0,35	0,26
<i>ABCC8</i>	6,18 ± 0,19	5,74 ± 0,24	0,12
<i>ABCC9</i>	7,48 ± 0,21	6,82 ± 0,43	0,06
<i>ABCC10</i>	8,48 ± 0,25	8,11 ± 0,34	0,44
<i>ABCC11</i>	8,57 ± 0,37	7,98 ± 0,76	0,14
<i>ABCC12</i>	7,42 ± 0,20	7,65 ± 0,52	0,93
<i>ABCD1</i>	6,93 ± 0,19	6,90 ± 0,26	0,83
<i>ABCD2</i>	7,55 ± 0,23	6,72 ± 0,41	0,07
<i>ABCD3</i>	7,02 ± 0,24	6,51 ± 0,26	0,50
<i>ABCD4</i>	6,62 ± 0,19	6,20 ± 0,25	0,16
<i>ABCE1</i>	11,68 ± 0,40	11,48 ± 0,51	0,62
<i>ABCF1</i>	9,01 ± 0,25	8,35 ± 0,26	0,01
<i>ABCF2</i>	6,94 ± 0,20	6,85 ± 0,34	0,91
<i>ABCF3</i>	6,43 ± 0,16	5,82 ± 0,22	0,01
<i>ABCG1</i>	8,02 ± 0,35	7,35 ± 0,46	0,23
<i>ABCG2</i>	6,92 ± 0,24	6,97 ± 0,79	0,38
<i>ABCG4</i>	5,92 ± 0,25	5,08 ± 0,28	0,02
<i>ABCG5</i>	5,19 ± 0,25	4,78 ± 0,30	0,40
<i>ABCG8</i>	4,91 ± 0,22	4,77 ± 0,31	0,95

Примечание. Жирным шрифтом обозначены статистически значимые различия.

Note. Statistically significant differences are indicated in bold.

с эффективностью НХТ при РМЖ [4, 10–12]. Однако отмечено, что именно изменение экспрессии в процессе лечения определяет ответ на проводимую химиотерапию [4].

На основании этого мы сравнили уровень экспрессии до и после НХТ у больных с разным ответом на НХТ. Оказалось, что в группе больных с объективным ответом на химиотерапию (полная и частичная регрессия) статистически значимо снижается экспрессия 28 (57 %) из 49 исследованных генов (при $2 \times 10^{-5} < p < 0,04$). В данную группу вошли следующие гены: *ABCA2, ABCA3, ABCA5, ABCA6, ABCA7, ABCA11P, ABCA12, ABCB1, ABCB3, ABCB4, ABCB7, ABCB10, ABCB11, ABCC1, ABCC2, ABCC6, ABCC9, ABCC10, ABCC11, ABCC12, ABCD2, ABCE1, ABCF1, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, ABCG8* (табл. 3). Статистически значимое повышение экс-

прессии наблюдается у 10 (21 %) из 49 генов и у 11 (22 %) генов экспрессия не изменяется. В группе больных со стабилизацией и прогрессией опухоли наблюдается повышение экспрессии большинства исследуемых генов ABC. Всего экспрессия повышается у 35 (71 %) из 49 генов, а статистически значимо повышается у 19 (38 %) генов (при $0,001 < p < 0,01$): *ABCA4, ABCA5, ABCA7, ABCA8, ABCB1, ABCB4, ABCB11, ABCC1, ABCC2, ABCC7, ABCC8, ABCC10, ABCC11, ABCF2, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, ABCG8*. Сравнение частот повышения и снижения экспрессии исследуемых генов у пациенток с разным ответом на НХТ показало статистически значимые различия по χ^2 -критерию ($\chi^2 = 13,93$; $p = 0,0009$). Важно отметить, что экспрессия генов *ABCA5, ABCA7, ABCB1, ABCB4, ABCB11, ABCC1, ABCC2, ABCC10, ABCC11, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5,*

Таблица 3. Экспрессии генов ABC-транспортёров у больных раком молочной железы до и после проведения НХТ в зависимости от эффективности НХТ

Table 3. Expression of ABC transporter genes in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy, depending on the effect of NAC

Ген Gene	Полная и частичная регрессия (n = 20) Full and partial regression (n = 20)			p	Прогрессирование и стабилизация (n = 11) Progression and stabilization (n = 11)			p
	до лечения before treatment	после НХТ after NAC	изменение expression change		до лечения before treatment	после НХТ after NAC	изменение expression change	
<i>ABCA1</i>	10,14 ± 0,37	9,28 ± 0,37	Снижение Decline	0,11	9,22 ± 0,51	8,88 ± 0,25	Снижение Decline	0,54
<i>ABCA2</i>	7,31 ± 0,20	5,02 ± 0,20	Снижение Decline	1×10^{-4}	7,34 ± 0,23	4,68 ± 0,25	Снижение Decline	0,002
<i>ABCA3</i>	7,98 ± 0,30	5,69 ± 0,30	Снижение Decline	0,003	7,69 ± 0,34	5,97 ± 0,34	Снижение Decline	0,22
<i>ABCA4</i>	6,76 ± 0,19	10,10 ± 0,19	Повышение Increase	7×10^{-4}	6,19 ± 0,38	10,10 ± 0,54	Повышение Increase	0,001
<i>ABCA5</i>	9,95 ± 0,33	5,52 ± 0,33	Снижение Decline	2×10^{-5}	9,57 ± 0,51	10,77 ± 0,18	Повышение Increase	0,001
<i>ABCA6</i>	7,25 ± 0,20	6,39 ± 0,20	Снижение Decline	0,01	7,08 ± 0,27	8,44 ± 0,15	Повышение Increase	0,07
<i>ABCA7</i>	9,64 ± 0,39	8,40 ± 0,39	Снижение Decline	0,003	8,76 ± 0,49	10,75 ± 0,29	Повышение	0,01
<i>ABCA8</i>	7,95 ± 0,32	11,88 ± 0,32	Повышение Increase	2×10^{-5}	7,56 ± 0,38	11,08 ± 0,33	Повышение Increase	0,001
<i>ABCA9</i>	7,60 ± 0,26	9,13 ± 0,26	Повышение Increase	0,01	7,05 ± 0,32	7,70 ± 0,25	Повышение Increase	0,54
<i>ABCA10</i>	6,48 ± 0,28	5,89 ± 0,28	Снижение Decline	0,82	5,70 ± 0,31	5,98 ± 0,43	Повышение Increase	0,54
<i>ABCA11P</i>	8,77 ± 0,34	5,05 ± 0,34	Снижение Decline	2×10^{-5}	7,88 ± 0,43	5,99 ± 0,27	Снижение Decline	0,07
<i>ABCA12</i>	9,67 ± 0,54	6,55 ± 0,54	Снижение Decline	7×10^{-4}	9,07 ± 0,96	6,77 ± 0,23	Снижение Decline	0,22
<i>ABCA13</i>	6,87 ± 0,30	8,32 ± 0,30	Повышение Increase	0,01	6,59 ± 0,40	7,65 ± 0,22	Повышение Increase	0,07
<i>ABCB1</i>	6,44 ± 0,23	5,23 ± 0,27	Снижение Decline	0,001	5,76 ± 0,33	7,43 ± 0,23	Повышение Increase	0,007

Продолжение табл. 3

Continuation of table 3

Ген Gene	Полная и частичная регрессия (n = 20) Full and partial regression (n = 20)			p	Прогрессирование и стабилизация (n = 11) Progression and stabilization (n = 11)			p
	до лечения before treatment	после НХТ after NAC	изменение expression change		до лечения before treatment	после НХТ after NAC	изменение expression change	
ABCB2	10,30 ± 0,35	9,92 ± 0,35	Снижение Decline	0,11	9,38 ± 0,38	8,29 ± 0,33	Снижение Decline	0,07
ABCB3	8,66 ± 0,26	8,14 ± 0,26	Снижение Decline	0,003	7,33 ± 0,36	7,35 ± 0,31	Повышение Increase	1,00
ABCB4	11,78 ± 0,29	9,24 ± 0,26	Снижение Decline	2×10^{-5}	9,57 ± 0,38	10,41 ± 0,29	Повышение Increase	0,01
ABCB5	7,32 ± 0,46	6,43 ± 0,24	Снижение Decline	0,11	6,27 ± 0,57	7,45 ± 0,46	Повышение Increase	0,22
ABCB6	5,83 ± 0,18	8,10 ± 0,18	Повышение Increase	0,003	5,33 ± 0,27	7,33 ± 0,42	Повышение Increase	0,22
ABCB7	9,80 ± 0,37	7,00 ± 0,37	Снижение Decline	7×10^{-4}	8,55 ± 0,48	7,28 ± 0,33	Снижение Decline	0,07
ABCB8	6,36 ± 0,17	6,50 ± 0,17	Повышение Increase	0,82	5,75 ± 0,26	6,65 ± 0,33	Повышение Increase	1,00
ABCB9	6,55 ± 0,26	6,09 ± 0,26	Снижение Decline	0,82	6,03 ± 0,26	5,68 ± 0,13	Снижение Decline	0,07
ABCB10	8,42 ± 0,23	7,74 ± 0,18	Снижение Decline	0,003	7,71 ± 0,44	7,94 ± 0,23	Повышение Increase	0,07
ABCB11	5,86 ± 0,31	3,37 ± 0,26	Снижение Decline	1×10^{-4}	5,51 ± 0,42	8,07 ± 0,31	Повышение Increase	0,002
ABCC1	8,65 ± 0,33	6,82 ± 0,33	Снижение Decline	7×10^{-4}	8,44 ± 0,37	10,01 ± 0,28	Повышение Increase	0,01
ABCC2	5,26 ± 0,26	4,09 ± 0,26	Снижение Decline	0,003	5,29 ± 0,59	7,30 ± 0,22	Повышение Increase	0,01
ABCC3	9,30 ± 0,50	9,30 ± 0,35	Снижение Decline	0,11	7,58 ± 0,43	8,68 ± 0,50	Повышение Increase	0,07
ABCC4	7,49 ± 0,20	7,15 ± 0,20	Снижение Decline	0,50	7,20 ± 0,42	7,41 ± 0,21	Повышение Increase	0,54
ABCC5	8,51 ± 0,28	7,85 ± 0,28	Снижение Decline	0,50	7,51 ± 0,33	7,56 ± 0,17	Повышение Increase	0,54
ABCC6	8,53 ± 0,21	6,01 ± 0,21	Снижение Decline	2×10^{-5}	8,10 ± 0,35	6,04 ± 0,28	Снижение Decline	0,07
ABCC7	5,64 ± 0,25	10,09 ± 0,25	Повышение Increase	2×10^{-5}	5,14 ± 0,35	9,32 ± 0,36	Повышение Increase	0,002
ABCC8	6,18 ± 0,19	9,96 ± 0,19	Повышение Increase	2×10^{-5}	5,74 ± 0,24	8,58 ± 0,32	Повышение Increase	0,002
ABCC9	7,48 ± 0,21	5,64 ± 0,21	Снижение Decline	1×10^{-4}	6,82 ± 0,43	5,24 ± 0,18	Снижение Decline	0,01
ABCC10	8,48 ± 0,25	6,83 ± 0,25	Снижение Decline	1×10^{-4}	8,11 ± 0,34	9,91 ± 0,23	Повышение Increase	0,01
ABCC11	8,57 ± 0,37	6,99 ± 0,37	Снижение Decline	0,01	7,98 ± 0,76	9,04 ± 0,20	Повышение Increase	0,01
ABCC12	7,42 ± 0,20	6,22 ± 0,20	Снижение Decline	0,01	7,65 ± 0,52	10,13 ± 0,34	Повышение Increase	0,07

Окончание табл. 3

End of table 3

Ген Gene	Полная и частичная регрессия ($n = 20$) Full and partial regression ($n = 20$)			p	Прогрессирование и стабилизация ($n = 11$) Progression and stabilization ($n = 11$)			p
	до лечения before treatment	после НХТ after NAC	изменение expression change		до лечения before treatment	после НХТ after NAC	изменение expression change	
<i>ABCD1</i>	6,93 ± 0,19	8,94 ± 0,19	Повышение Increase	1×10^{-4}	6,90 ± 0,26	8,34 ± 0,40	Повышение Increase	0,07
<i>ABCD2</i>	7,55 ± 0,23	4,77 ± 0,23	Снижение Decline	2×10^{-5}	6,72 ± 0,41	6,10 ± 0,21	Снижение Decline	0,22
<i>ABCD3</i>	7,02 ± 0,24	7,71 ± 0,24	Повышение Increase	0,11	6,51 ± 0,26	7,56 ± 0,19	Повышение Increase	0,07
<i>ABCD4</i>	6,62 ± 0,19	6,49 ± 0,19	Снижение Decline	1,00	6,20 ± 0,25	6,07 ± 0,16	Снижение Decline	0,54
<i>ABCE1</i>	11,68 ± 0,40	8,93 ± 0,40	Снижение Decline	0,01	11,48 ± 0,51	8,92 ± 0,37	Снижение Decline	0,07
<i>ABCF1</i>	9,01 ± 0,25	7,72 ± 0,25	Снижение Decline	7×10^{-4}	8,35 ± 0,26	7,10 ± 0,30	Снижение Decline	0,01
<i>ABCF2</i>	6,94 ± 0,20	8,56 ± 0,20	Повышение Increase	2×10^{-5}	6,85 ± 0,34	8,83 ± 0,20	Повышение Increase	0,01
<i>ABCF3</i>	6,43 ± 0,16	7,68 ± 0,16	Повышение Increase	7×10^{-4}	5,82 ± 0,22	7,48 ± 0,25	Повышение Increase	0,07
<i>ABCG1</i>	8,02 ± 0,35	7,04 ± 0,40	Снижение Decline	0,04	7,35 ± 0,46	8,65 ± 0,35	Повышение Increase	0,001
<i>ABCG2</i>	6,92 ± 0,24	5,02 ± 0,46	Снижение Decline	7×10^{-4}	6,97 ± 0,79	7,89 ± 0,24	Повышение Increase	0,001
<i>ABCG4</i>	5,92 ± 0,25	3,11 ± 0,30	Снижение Decline	2×10^{-5}	5,08 ± 0,28	8,03 ± 0,25	Повышение Increase	0,001
<i>ABCG5</i>	5,19 ± 0,25	3,04 ± 0,26	Снижение Decline	2×10^{-5}	4,78 ± 0,30	7,28 ± 0,25	Повышение Increase	0,001
<i>ABCG8</i>	4,91 ± 0,22	3,06 ± 0,24	Снижение Decline	2×10^{-5}	4,77 ± 0,31	7,42 ± 0,22	Повышение Increase	0,001

Примечание. НХТ – неоадьювантная химиотерапия. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия в уровне экспрессии генов ABC до и после НХТ в зависимости от ответа на лечение. В группе пациенток с объективным ответом (полная и частичная регрессия) выделено только статистически значимое снижение экспрессии; в группе пациенток без ответа на лечение (прогрессирование и стабилизация) – только статистически значимое повышение экспрессии. Жирным шрифтом и курсивом выделены статистически значимые различия в уровне экспрессии генов ABC до и после НХТ в зависимости от ответа на лечение с учетом поправки Бонферрони.

Note. NAC – neoadjuvant chemotherapy. In bold, statistically significant differences in the level of ABC gene expression before and after NAC are shown in bold type depending on the response to treatment. In the group of patients with an objective response (full and partial regression), only a statistically significant decrease in expression was identified; in the group without response to treatment (progression and stabilization) – only a statistically significant increase in expression. Bold and italics indicate statistically significant differences in the level of ABC gene expression before and after NAC depending on the response to treatment, taking into account the Bonferroni correction.

ABCG8 статистически значимо изменялась и была связана с ответом на НХТ в обеих группах пациенток (см. табл. 3).

Далее с использованием метода Каплана–Майера была оценена связь показателей БМВ с экспрессией ABC-транспортеров. Для выявления связи показателей экспрессии с выживаемостью мы воспользовались статистическими характеристиками нашей выборки по медиане экспрессии исследуемых генов. Это сделано для того, чтобы было равное число пациенток в 2 противоположных группах. Соответственно группу с высоким уровнем экспрессии составили пациентки, у которых экспрессия генов выше значения медианы,

группу с низким уровнем – те, у кого значения медианы ниже. В результате установлено, что только при высоком уровне экспрессии генов *ABCB1* и *ABCB4* после НХТ наблюдаются низкие показатели БМВ (см. рисунок). Показатели 5-летней выживаемости в группе больных с высокой экспрессией гена *ABCB1* составили 43 % против 92 % в противоположной группе (*log-rank*-тест $p = 0,001$). Для гена *ABCB4* показан аналогичный результат: в группе с высоким уровнем экспрессии гена показатели 5-летней БМВ сравнительно невысокие – 58 %, а в группе с низким уровнем – 87 % (*log-rank*-тест $p = 0,04$).

Статистически значимых различий в показателях БМВ у пациенток с экспрессией других генов

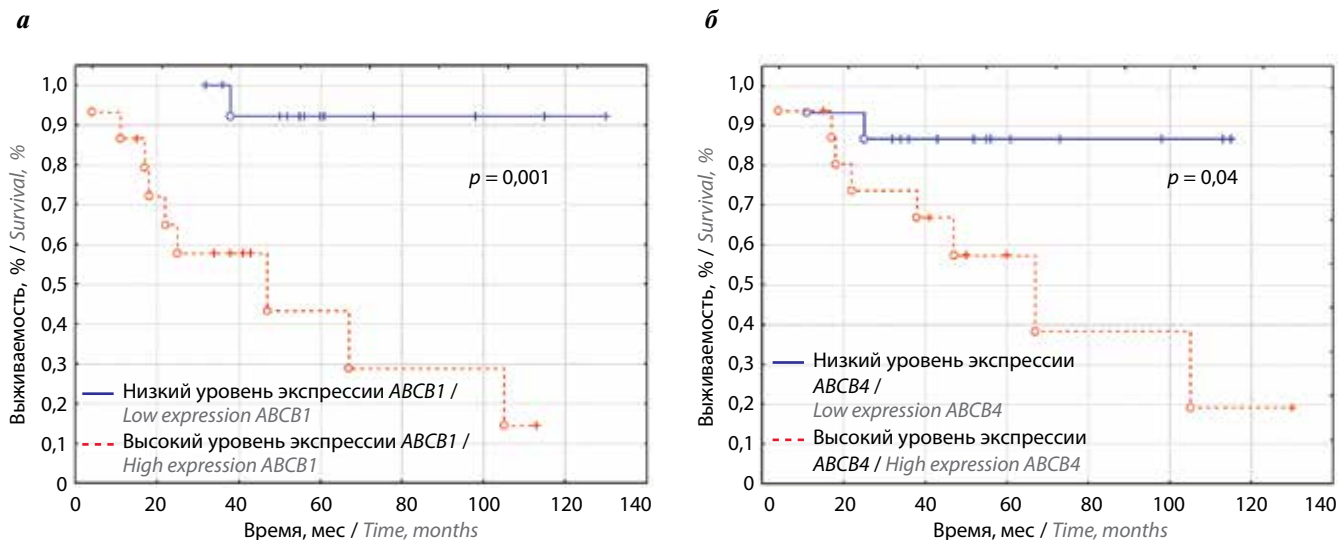


График выживаемости Каплана–Майера, представляющий связь безметастатической выживаемости с уровнем экспрессии генов ABCB1 (а) и ABCB4 (б) после неадогьювантной химиотерапии. В качестве группировочной переменной использовалась медиана экспрессии: для ABCB1 – 7,6; ABCB4 – 10,1.

Kaplan–Meyer survival graph representing the relationship between metastatic survival and the level of gene expression of ABCB1 (a) and ABCB4 (b) after neoadjuvant chemotherapy. The expression median was used as a grouping variable: for ABCB1 – 7.6; ABCB4 – 10.1.

ABC-транспортеров как до лечения, так и после НХТ не установлено.

Обсуждение

В настоящее время существует немало исследований экспрессии генов ABC-транспортеров при различных злокачественных новообразованиях. Были выделены основные гены ABC, участвующие в транспорте лекарственных препаратов при раке, к которым были отнесены такие гены, как ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCB1, ABCB4, ABCB5, ABCB11, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC6, ABCC10, ABCC11, ABCG2 [3]. Интересно, что если связь экспрессии генов ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG1, ABCG2 и некоторых других с эффективностью НХТ показана во многих исследованиях [13–15], то для генов подсемейства ABCA связь весьма неочевидна. Тем не менее было продемонстрировано, что высокая экспрессия ABCA2 и ABCA3 коррелирует с плохим химиотерапевтическим ответом [16]. Результаты предыдущего нашего исследования показали, что изменение экспрессии генов ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC5, ABCG1, ABCG2 коррелирует с ответом на НХТ, что согласуется с полученными результатами данного исследования [4]. На сегодняшний день остается непонятной роль гена ABCF1, поскольку он не имеет трансмембранного домена и его функция отличается от большинства ABC-транспортеров [17]. Тем не менее мы показали, что снижение экспрессии данного гена в опухоли молочной железы связана с химиочувствительностью. Аналогичный результат был показан при гепатоцеллюлярной карциноме [18]. Примечательно, что уровень экспрессии ABCA9, ABCA10 и ABCC9 был связан с безрецидивной выживаемостью [19]. Мы установили, что гиперэкспрессия гена ABCB4 после химиотерапии связана с эффективностью лечения и низкими показателями БМВ.

Это в определенной мере объясняет результаты исследования J. F. Huang и соавт. на клеточных линиях РМЖ, в котором было показано, что гиперэкспрессия гена ABCB4 связана с резистентностью к доксорубину и, как следствие, может определять ответ опухоли на химиотерапевтическое лечение [20]. Установлено, что ABCB4 локализуется на мембране гепатоцитов, секретирующих фосфатидилхолин в желчь, для защиты гепатобилиарного эпителия от повреждения свободными желчными кислотами. При этом нарушения в ABCB4 вызывают редкие заболевания желчевыводящих путей [21]. Тем не менее точная функция, а также потенциальные механизмы гена ABCB4 детально не определены. Однако установлено, что гиперэкспрессия ABCB4 связана с химиорезистентностью при лечении 5-фторурацилом и сопряжена с низкими показателями безрецидивной и общей выживаемости [21], связана с химиорезистентностью при лечении доксорубином [22] и др.

Связь гена ABCB1 с прогнозом в основном показана для полиморфизмов данного гена [23, 24] и для направления изменения его экспрессии в процессе НХТ [7].

Заключение

Результаты проведенного исследования позволили подтвердить результаты исследований прошлых лет и получить новые данные о связи новых генов ABC-транспортеров с эффективностью НХТ и прогнозом заболевания. Основываясь на этих результатах, мы предполагаем, что выявленные гены могут быть новыми предиктивными и прогностическими маркерами при РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Семиглазов В.Ф., Горбунова В.А., Тюляндин С.А. Химиотерапия рака молочной железы: современный взгляд на проблему. Медицинский совет 2017;1(6):56–60. DOI:10.21518/2079-701X-2017-6-56-60 [Semiglazov V.F., Gorbunova V.A., Tjuljandin S.A. Chemotherapy for breast cancer: a modern view of the problem. Meditsinskiy sovet = Medical Advice 2017;1(6):56–60. (In Russ.)].
2. Parkinson A., Ogilvie B.W. Biotransformation of xenobiotics. Casarett and Doull's toxicology: Basic Sci Poisons 2008;7(1):161–304.
3. Fletcher J.I., Haber M., Henderson M.J. et al. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. Nat Rev Cancer 2010;10(2):147–56. DOI: 10.1038/nrc278.9.
4. Litviakov N.V., Cherdyn'tseva N.V., Tsyganov M.M. et al. Changing the expression vector of multidrug resistance genes is related to neoadjuvant chemotherapy response. Cancer Chemother Pharmacol 2013;71(1):153–63. DOI: 10.1007/s00280-012-1992-x.
5. Hlavata I., Mohelnikova-Duchonova B., Vaclavikova R. et al. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. Mutagenesis 2012;27(2):187–96. DOI: 10.1093/mutage/ger075.
6. Patel A., Li T.W., Anreddy N. et al. Suppression of ABCG2 mediated MDR *in vitro* and *in vivo* by a novel inhibitor of ABCG2 drug transport. Pharmacol Res 2017;121:184–93. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.04.025.
7. Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Слонимская Е.М. и др. Связь безметастатической выживаемости больных раком молочной железы и вектора изменения экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли при проведении НХТ. Вопросы онкологии 2013;59(3):334–40. DOI: <https://doi.org/10.18722/VO2013593334-340>. [Litviakov N.V., Garbukov E.Yu., Slonimskaya E.M. et al. Connection of metastasis-free survival in breast cancer patients and an expression vector of multidrug resistance genes in tumor during neoadjuvant chemotherapy. Voprosy onkologii = Oncology Issues 2013;59(3):334–40. (In Russ.)].
8. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania. Breast J 2004;10(4):273–94.
9. Irizarry R.A., Hobbs B., Collin F. et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics 2003;4(2): 249–64. DOI: 10.1093/biostatistics/4.2.249.
10. Wind N., Holen I. Multidrug resistance in breast cancer – from *in vitro* models to clinical studies. Int J Breast Cancer 2011;2011:1–12. DOI: 10.4061/2011/967419.
11. Kim B., Fatayer H., Hanby A.M. et al. Neoadjuvant chemotherapy induces expression levels of breast cancer resistance protein that predict disease-free survival in breast cancer. PLoS One 2013;8(5):1–8. DOI: 10.1371/journal.pone.0062766.
12. Gillet J.P., Efferth T., Remacle J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. Biochim Biophys Acta 2007;1775(2):237–62. DOI: 10.1016/j.bbcan.2007.05.002.
13. Velaei K., Samadi N., Soltani S. et al. NFκBP65 transcription factor modulates resistance to doxorubicin through ABC transporters in breast cancer. Breast Cancer 2017;24(4):552–61. DOI: 10.1007/s12282-016-0738-8.
14. Patch A.M., Christie E.L., Etemadmoghadam D. et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. Nature 2015;521(7553): 489–94. DOI: 10.1038/nature14410.
15. Wilson C.S., Davidson G.S., Martin S.B. et al. Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction. Blood 2006;108(2):685–96. DOI: 10.1182/blood-2004-12-4633.
16. Steinbach D., Gillet J.P., Sauerbrey A. et al. ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res 2006;12(14):4357–63. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2587.
17. Chen Z., Shi T., Zhang L. et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: a review of the past decade. Cancer Lett 2016;370(1):153–64. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.10.010.
18. Fung S.W., Cheung P.F.Y., Yip C.W. et al. The ATP-binding cassette transporter ABCB1 is a hepatic oncofetal protein that promotes chemoresistance, EMT and cancer stemness in hepatocellular carcinoma. Cancer Lett 2019;457:98–109. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.05.010.
19. Elsnerova K., Mohelnikova-Duchonova B., Cerovska E. et al. Gene expression of membrane transporters: importance for prognosis and progression of ovarian carcinoma. Oncol Rep 2016;35(4):2159–70. DOI: 10.3892/or.2016.4599.
20. Huang J.F., Wen C.J., Zhao G.Z. et al. Overexpression of ABCB4 contributes to acquired doxorubicin resistance in breast cancer cells *in vitro*. Cancer Chemother Pharmacol 2018;82(2):199–210. DOI: 10.1007/s00280-018-3603-y.
21. Hu H., Wang M., Guan X. et al. Loss of ABCB4 attenuates the caspase-dependent apoptosis regulating resistance to 5-Fu in colorectal cancer. Biosci Rep 2018;38(1):BSR20171428. DOI: 10.1042/BSR20171428.
22. Hontecillas-Prieto L., Garcia-Dominguez D.J., Vaca D.P. et al. Multidrug resistance transporter profile reveals MDR3 as a marker for stratification of blastemal Wilms tumour patients. Oncotarget 2017;8(7):11173–86. DOI: 10.18632/oncotarget.14491.
23. Tulsyan S., Mittal R.D., Mittal B. The effect of ABCB1 polymorphisms on the outcome of breast cancer treatment. Pharmacogen Personal Med 2016;9(1):47–58. DOI: 10.2147/PGPM.S86672.
24. Kim H.J., Im S.A., Keam B. et al. ABCB1 polymorphism as prognostic factor in breast cancer patients treated with docetaxel and doxorubicin neoadjuvant chemotherapy. Cancer Sci 2015;106(1): 86–93. DOI: 10.1111/cas.12560.

Вклад авторов

М.М. Цыганов: написание текста рукописи;

М.К. Ибрагимова, А.М. Певзнер, К.А. Гаптулбарова: анализ полученных данных;

Е.Ю. Гарбуков, Е.М. Слонимская: получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи;

Е.А. Усынин, Н.В. Литвяков: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

M.M. Tsyganov: article writing;

M.K. Ibragimova, A.M. Pevzner, K.A. Gaptulbarova: analysis of the obtained data;

E.Yu. Garbukov, E.M. Slonimskaya: obtaining data for analysis, reviewing of publications of the article's theme;

E.A. Usynin, N.V. Litviakov: developing the research design.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.М. Цыганов / M.M. Tsyganov: <https://orcid.org/0000-0001-7419-4512>

М.К. Ибрагимова / M.K. Ibragimova: <https://orcid.org/0000-0001-8815-2786>

А.М. Певзнер / A.M. Pevzner: <https://orcid.org/0000-0002-9657-9058>

К.А. Гаптулбарова / K.A. Gaptulbarova: <https://orcid.org/0000-0003-1091-7528>

Е.Ю. Гарбуков / E.Yu. Garbukov: <https://orcid.org/0000-0002-2917-8158>

Е.М. Слонимская / E.M. Slonimskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4382-5697>

Н.В. Литвяков / N.V. Litviakov: <https://orcid.org/0000-0002-0714-8927>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 18-29-09131 «Феномен «замирания» опухоли в процессе химиотерапии».

Funding. This work was supported by grant number 18-29-09131 Russian Foundation for Basic Research "The phenomenon of tumor "fading" during chemotherapy".

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук». Протокол № 1 от 14.01.2013.

Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences. Protocol No 1 dated 14.01.2013.

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

Статья поступила: 26.05.2020. **Принята к публикации:** 25.06.2020.

Article submitted: 26.05.2020. **Accepted for publication:** 25.06.2020.

Исследование уровня экспрессии генов-маркеров пролиферативной активности в слизистой оболочке толстой кишки при различной патологии

Т.М. Кулинич, М.В. Захаренко, Е.Л. Джикия, А.Л. Сенчукова, У.С. Станоевич, И.Б. Грунин, Н.В. Мельникова, С.В. Гончаров, Т.В. Крашихина, Е.А. Кудинова, О.П. Близнюков, В.К. Боженко

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Профсоюзная, 86

Контакты: Маргарита Владимировна Захаренко zak-margarita@mail.ru

Введение. Поиск молекулярных маркеров диагностики заболеваний толстой кишки, способных с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять и дифференцировать патологический процесс, является актуальной клинически важной задачей. Уровень экспрессии генов, ответственных за процессы пролиферации, может отражать картину изменений в тканях пораженного органа.

Цель исследования — сравнительный анализ молекулярно-генетических маркеров пролиферативной активности при доброкачественных и злокачественных новообразованиях толстой кишки.

Материалы и методы. Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени проведен анализ изменений экспрессии маркеров пролиферации (CCND1, c-MYC, Ki-67, HER2neu, TERT) в следующих тканях: аденокарциномы толстой кишки (n = 259), края резекции (около 15–20 см от опухолевого узла) (n = 251), неизменной слизистой оболочки толстой кишки здоровых доноров (n = 247), полипов (n = 28), неизменной слизистой оболочки толстой кишки при полипах (10–15 см от полипа) (n = 75).

Результаты и заключение. Установлено, что в тканях полипов толстой кишки наблюдаются достоверные различия в уровне экспрессии генов, ответственных за процессы пролиферации (c-MYC, CCND1, TERT). Выявленные различия специфичны для типа патологического процесса, что позволяет рассматривать данные гены в качестве наиболее перспективных кандидатов при разработке дифференциального метода диагностики заболеваний толстой кишки.

Ключевые слова: колоректальный рак, экспрессия генов, морфологически неизменная ткань, полип толстой кишки, маркеры пролиферации

Для цитирования: Кулинич Т.М., Захаренко М.В., Джикия Е.Л. и др. Исследование уровня экспрессии генов-маркеров пролиферативной активности в слизистой оболочке толстой кишки при различной патологии. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(2): 39–46.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-2-39-46



Investigation of the expression level of genes-markers of proliferative activity in the mucosa at normal and various pathologies of the colon

T.M. Kulinich, M.V. Zakharenko, E.L. Dzhikiya, A.L. Senchukova, U.S. Stanoevich, I.B. Grunin, N.V. Melnikova, S.V. Goncharov, T.V. Krashikhina, E.A. Kudinova, O.P. Bliznyukov, V.K. Bozhenko

Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Ministry of Health of Russia;
86 Profsoyuznaya St., Moscow 117997, Russia

Background. The search for molecular markers of colon diseases allowing highly specific and sensitive identification and differentiation of pathological processes is a clinically important problem. Expression levels of genes responsible for proliferation can reflect the changes in the affected tissues.

The study objective is to perform comparative analysis of molecular and genetic markers of proliferative activity in benign and malignant neoplasms of the colon.

Materials and methods. Analysis of the changes in proliferation markers (CCND1, c-MYC, Ki-67, HER2neu, TERT) in adenocarcinoma of the colon (n = 259), resection margin (about 15–20 cm from the tumor lesion) (n = 251), unchanged colon mucosa from healthy donors (n = 247), polyps (n = 28), unchanged colon mucosa intestinal polyposis (10–15 cm from the polyp) (n = 75) was performed using RT-PCR.

Results and conclusion. It was shown that morphologically unchanged tissue of intestinal mucosa in malignant tumors has significant differences from normal tissue of healthy donors. Significant differences in the level of expression of genes responsible for the processes of proliferation, c-MYC, CCND1, TERT were found in benign hyperproliferative diseases (polyps). Moreover, these changes were specific to the type of pathological process, which allows us to consider these genes as the most promising candidates in the development of a differential method for diagnosing colon diseases.

Key words: colorectal cancer, gene expression, morphologically unchanged tissue, colon polyp, proliferation marker

For citation: Kulinich T.M., Zakharenko M.V., Dzhikiya E.L. et al. Investigation of the expression level of genes-markers of proliferative activity in the mucosa at normal and various pathologies of the colon. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2020;7(2):39–46. (In Russ.).

Введение

Ранняя диагностика и скрининг онкологических заболеваний желудочно-кишечного тракта являются чрезвычайно актуальной проблемой. По статистике заболеваемости населения России колоректальный рак (КРР) занимает 3-е место. При этом за последние 10 лет заболеваемость выросла на 24 % [1]. Несмотря на различные программы скрининга, выявляемость КРР на ранних стадиях составляет менее 40 %, что снижает показатели 5-летней выживаемости до 10 % [2]. Внедрение молекулярно-генетических методов исследований в клиническую онкологию позволило решить ряд вопросов этиологии и патогенеза КРР, однако проблема ранней диагностики данного заболевания остается нерешенной. Это делает необходимым поиск новых подходов к ранней диагностике КРР.

Высокую вероятность развития КРР имеют пациенты, страдающие воспалительными заболеваниями толстой кишки (прежде всего неспецифическим язвенным колитом), с семейной предрасположенностью к данной форме рака и/или имеющие полипы толстой кишки. Частота случаев развития рака из ворсинчатых аденом (полипов) диаметром >2 см составляет 35–53 %. При полипах диаметром >3 см вероятность их малигнизации приближается к 100 % [3]. Оценка вероятности малигнизации аденоматозных полипов толстой кишки в настоящее время проводится на основании их размеров, количества и патологических характеристик. Однако в ряде исследований показано, что молекулярные характеристики полипов могут предоставить информацию о канцерогенном риске прогрессии полипа [4, 5].

Поиск новых маркеров ранней диагностики рака толстой кишки, способных выявлять заболевание с высокой чувствительностью и специфичностью и дифференцировать патологический процесс, является актуальной задачей. Наиболее перспективным представляется использование комплексов/панелей патогенетически значимых молекулярных маркеров, которые смогут повысить точность дифференциальной диагностики заболеваний толстой кишки, определять факторы риска прогрессирования, а также позволят сформировать новые программы скрининга пациентов.

Цель исследования – проведение сравнительного анализа молекулярно-генетических маркеров пролиферативной активности при доброкачественных и злокачественных новообразованиях толстой кишки.

Материалы и методы

Исследование одобрено этическим комитетом Российского научного центра рентгенорадиологии. Все лица, включенные в исследование, подписали

информированное добровольное согласие. Проведен анализ образцов послеоперационного материала 215 пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом КРР, проходивших обследование и лечение в Российском научном центре рентгенорадиологии в период с 2011 по 2018 г. Образцы ткани аденокарциномы ($n = 259$) и морфологически неизменной ткани (МНТ) края резекции ($n = 215$) получены в результате оперативного лечения больных первичным раком толстой кишки стадии I–IVB. По гистологическому типу все образцы опухоли представляли аденокарциному (G_{1-3}) и были объединены в группу «опухоль». Высокодифференцированные аденокарциномы выявлены в 48 % случаев, умеренно-дифференцированные – в 45 %, низкодифференцированные – в 7 %. Образцы МНТ края резекции отбирали из зоны на расстоянии 15–20 см от опухолевого узла, при гистологическом исследовании определено отсутствие признаков инвазивного роста.

Во время диагностической колоноскопии пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом полипов толстой кишки получены образцы тканей полипов и МНТ полипа, взятой на расстоянии не менее 10 см от полипа. Образцы полипов были объединены в группу «полип» ($n = 28$). По данным гистологического исследования тубулярные аденомы диагностированы у 18, тубулярно-ворсинчатые – у 4, гиперпластические полипы – у 6 пациентов. Однако ввиду малого размера данной группы при анализе результатов не проводилось деления относительно гистологического типа при оценке полученных результатов как характеристики доброкачественного гиперпролиферативного процесса. Образцы МНТ вошли в группу «МНТ полипа» ($n = 78$). Контрольную группу «норма» составили образцы, полученные в ходе профилактической колоноскопии у добровольцев без патологии в толстой кишке ($n = 247$). Для всех образцов выполнено гистологическое исследование и получено заключение: «морфологически неизменная слизистая оболочка толстой кишки». Средний возраст пациентов группы «опухоль» составил 64,5 года, группы «полип» – 62,6 года, группы «норма» – 55,5 года.

Образцы биологического материала после получения немедленно помещали в стабилизирующий раствор (EverFresh RNA, Sileks, Россия) для сохранности нуклеиновых кислот и хранили при температуре -70°C . Выделение РНК проводили с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Для постановки двухступенчатой полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией использовали ген-специфические праймеры, наборы реагентов, протоколы и оборудование

ЗАО «НПФ ДНК-Технология» (Россия). Реакционную смесь инкубировали при температуре 40 °С в течение 30 мин с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95 °С в течение 5 мин. Полученную комплементарную ДНК сразу использовали для постановки ПЦР в реальном времени. ПЦР-анализ выполняли в 2 повторах, каждый объемом 12 мкл, по следующей программе: 15 циклов – при 80 °С 5 с, при 94 °С 5 с; 1 цикл – при 94 °С 5 мин; 50 циклов – при 94 °С 10 с, при 64 °С 20 с.

Определен уровень экспрессии генов, контролирующих процессы пролиферации: *CCND1* (циклин D1), *c-MYC*, *Ki-67*, *TERT*, *HER2neu*. Уровень экспрессии матричной РНК (мРНК) для каждого гена определяли в относительных единицах согласно методике, предложенной J. Vandesompele и соавт. в 2002 г. [6]. Мы посчитали наиболее целесообразным использовать нормировку на несколько генов для нивелирования их возможных колебаний. В качестве референсных использовали гены *GUSB*, *B2M* и *HPRT*. Выбор эталонных генов был сделан на основании результатов ряда исследований [7–9]. Статистический анализ проводили в программе Statistica 10 (StatSoft, США) с применением методов однофакторного дисперсионного анализа. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Молекулярно-биологические особенности взаимоотношений доброкачественных гиперпролиферативных заболеваний и неизмененных окружающих тканей недостаточно изучены [10, 11]. В то же время актуальными являются проблема дифференциальной диагностики заболеваний толстой кишки и изучение вероятности малигнизации доброкачественных опухолей [3, 12]. В результате проведенного исследования изменений экспрессии генов *c-MYC*, *CCND1*, *Ki-67*, *TERT*, *HER2neu* в группах «МНТ края резекции», «опухоль», «полип», «МНТ полипа» и «норма» выявлены их фенотипические особенности.

Уровень экспрессии гена *Ki-67* – стандартного маркера пролиферативной активности – был достаточно высоким для всех исследуемых типов тканей (рис. 1). Достоверно выше уровень экспрессии *Ki-67* был в тканях аденокарцином, что позволило дифференцировать ткань неизмененного эпителия толстой кишки и материал злокачественной опухоли (см. таблицу). Выявленные особенности хорошо согласуются с широко известными данными об усилении экспрессии *Ki-67* в тканях опухоли и использовании данного гена при иммуногистохимическом анализе оценки пролиферации и степени злокачественности опухоли [13, 14]. При полипозе толстой кишки достоверные различия наблюдались для групп «полип»/«норма» и отсутствовали при сравнении групп «полип»/«МНТ полипа» и «МНТ полипа»/«норма». Группа «МНТ полипа» характеризовалась большим разбросом

значений и отсутствием достоверных различий в уровне экспрессии *Ki-67* от групп «норма» и «полип», причем наблюдались как незначительные различия средних уровней экспрессии *Ki-67* в группах «полип» и «МНТ полипа», так и большой разброс значений внутри данных групп.

Отсутствие различий экспрессии *Ki-67* при сравнении групп «МНТ полипа»/«норма» определяет ограничения применения данного молекулярного маркера при доброкачественных заболеваниях толстой кишки.

Регуляторная функция *c-MYC* в отношении *CCND1* и их взаимосвязь [15] определили схожий характер изменений данных генов в исследуемых тканях (см. рис. 1). Показано, что наибольший уровень экспрессии *c-MYC* и *CCND1* определяется в тканях аденокарциномы как показатель высокой пролиферативной активности. Экспрессия снижается в ряду опухоль–МНТ края резекции–норма, причем изменения экспрессии генов *c-MYC* и *CCND1* достоверны для этих 3 типов ткани (см. таблицу). В тканях полипов толстой кишки также отмечены высокие уровни экспрессии *c-MYC* и *CCND1*, достоверно отличающиеся как от уровней в слизистой оболочке толстой кишки здоровых доноров, так и от значений в тканях опухолей и МНТ полипа. Оценка уровней экспрессии генов *c-MYC* и *CCND1*, характеризующих пролиферативную активность ткани, может

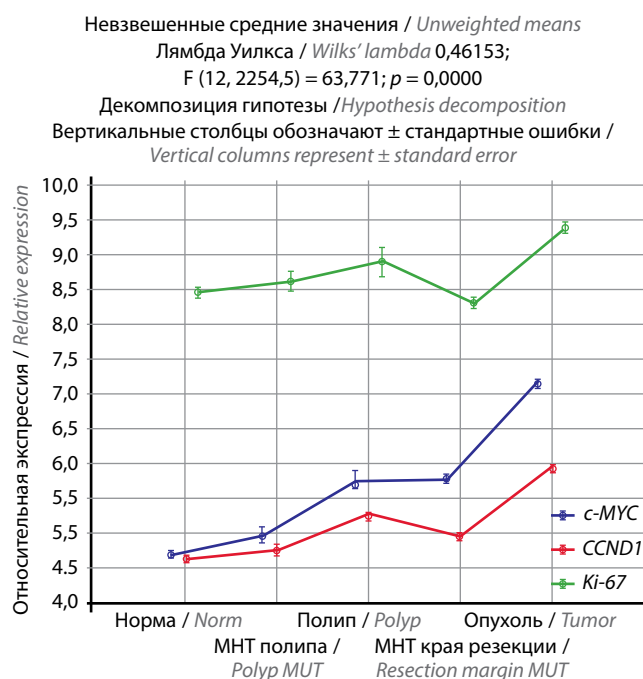


Рис. 1. Изменение экспрессии генов *Ki-67*, *c-MYC* и *CCND1* в тканях опухолей, морфологически неизмененных тканях (МНТ) края резекции при колоректальном раке, полипах, неизменной слизистой оболочке при полипозе и нормальной слизистой оболочке толстой кишки условно здоровых доноров

Fig. 1. Changes in expression of *Ki-67*, *c-MYC* and *CCND1* genes in tumor tissues, morphologically unchanged tissues (MUT) of the resection margin in colorectal cancer, intestinal polyposis, unchanged mucosa in polyposis and normal mucosa in healthy donors

Достоверность различий экспрессии исследованных генов при парном сравнении групп тканей

Significance of differences in expression of the studied genes in pairwise comparison of tissue groups

Тип ткани Tissue type	<i>c-MYC</i>	<i>CCND1</i>	<i>TERT</i>	<i>Ki-67</i>	<i>HER2neu</i>
Опухоль G ₁ /Опухоль G ₂ Tumor G ₁ /Tumor G ₂	0,440	0,743	0,003*	0,996	0,896
Опухоль G ₁ /Опухоль G ₃ Tumor G ₁ /Tumor G ₃	0,273	0,542	0,031*	0,088	0,011*
Опухоль G ₂ /Опухоль G ₃ Tumor G ₂ /Tumor G ₃	0,250	0,468	0,563	0,098	0,044*
Опухоль G ₁₋₃ /край резекции Tumor G ₁₋₃ /resection margin	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
Опухоль G ₁₋₃ /норма Tumor G ₁₋₃ /norm	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
Край резекции/норма Resection margin/norm	0,000*	0,000*	0,000*	0,001*	0,174
Опухоль G ₁₋₃ /полип Tumor G ₁₋₃ /polyp	0,000*	0,001*	0,000*	0,019*	0,040*
Опухоль G ₁₋₃ /МНТ полипа Tumor G ₁₋₃ /polyp MUT	0,000*	0,000*	0,875	0,000*	0,000*
Полип/МНТ полипа Polyp/polyp MUT	0,000*	0,001*	0,000*	0,073	0,028*
Полип/норма Polyp/norm	0,000*	0,000*	0,000*	0,001*	0,140
МНТ полипа/норма Polyp MUT/norm	0,000*	0,017*	0,000*	0,361	0,011*
МНТ полипа/край резекции Polyp MUT/resection margin	0,002*	0,015*	0,372	0,023*	0,017*

*Достоверные различия ($p < 0,05$).

Примечание. МНТ – морфологически неизменная ткань.

*Significant differences ($p < 0.05$).

Note. MUT – morphologically unchanged tissue.

служить маркером типа патологического процесса и использоваться в дифференциальной диагностике патологических изменений толстой кишки.

Изменения экспрессии генов *c-MYC* и *CCND1* специфичны для всех исследуемых типов тканей и позволяют достоверно отличить не только ткани злокачественных и доброкачественных новообразований, но и МНТ слизистой оболочки толстой кишки. Также важно отметить, что для всех исследуемых генов получены достоверные различия между группами «МНТ полипа» и «МНТ края резекции», таким образом, МНТ толстой кишки демонстрируют специфические изменения в зависимости от типа патологического процесса.

Изменения экспрессии гена *HER2neu* характеризовались снижением уровня экспрессии в группах «опухоль» и «МНТ края резекции». В группах «полип»/«норма» и «МНТ край резекции»/«норма» при парном сравнении достоверных различий не отмечено. Вероятно, изменения экспрессии гена *HER2neu* происходят непосредственно в тканях опухолевого узла при КРР и не распространяются на прилежащие ткани кишки.

При проведении сравнительного анализа изменений экспрессии исследуемых генов внутри группы «опухоль» в зависимости от степени злокачественности аденокарциномы показано наличие достоверных различий только по уровню экспрессии *HER2neu* (см. таблицу, рис. 2). Уровень экспрессии достоверно различался в подгруппах опухолей G₁/G₃ и G₂/G₃, максимально снижаясь в подгруппе опухолей G₃ (см. рис. 2).

Продукт гена *TERT* (обратной транскриптазы, основные функции которой – удлинение и стабилизация теломера), также вызывает усиление пролиферации клеток и повышение их жизнеспособности, участвует в регуляции экспрессии некоторых генов, ответа на повреждение ДНК [16]. Результаты исследования гена *TERT* показали достоверное снижение уровня его экспрессии в тканях при гиперпролиферативных заболеваниях толстой кишки, причем наиболее резкое снижение отмечено в тканях полипа (см. рис. 2). Полученный результат можно объяснить высокой активностью *TERT* в слизистой оболочке толстой кишки

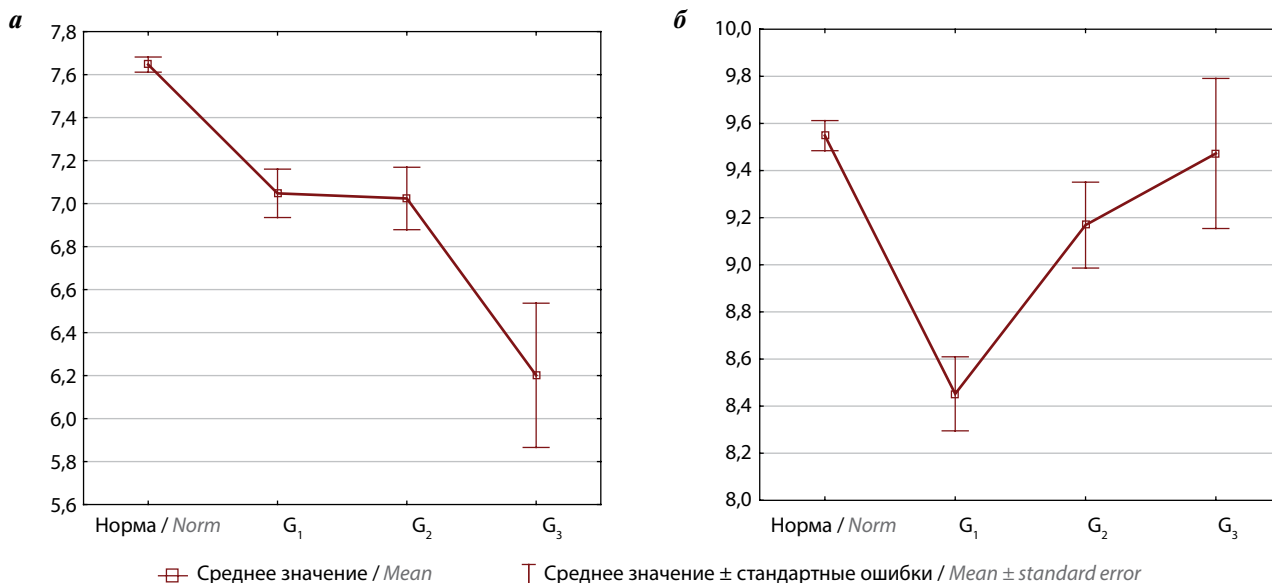


Рис. 2. Изменение среднего значения экспрессии гена *HER2neu* (а) и гена *TERT* (б) в группах «норма» и «опухоль» в зависимости от степени злокачественности *G* (Grade)

Fig. 2. Changes in mean expression of *HER2neu* (a) and *TERT* (б) genes in the “norm” and “cancer” groups, depending on the grade of malignancy *G* (Grade)

в норме в связи с высокой функционально-обусловленной пролиферативной активностью клеток и включением так называемых дисрегуляторных механизмов при злокачественных опухолях [17]. Достоверные различия получены между всеми группами, кроме групп «опухоль»/«МНТ края резекции», «опухоль»/«МНТ полипа», «МНТ полипа»/«МНТ края резекции» (см. таблицу). При анализе уровней экспрессии *TERT* в тканях полипа обнаружена большая гетерогенность. В литературе имеются единичные работы, также выделяющие большой разброс уровня *TERT* при доброкачественных заболеваниях толстой кишки и связывающие его с вероятностью озлокачествления процесса [18]. В нашем исследовании показано, что уровень экспрессии *TERT* возрастал в ряду норма–МНТ края резекции–опухоль. При сравнении образцов внутри группы «опухоль» уровень экспрессии *TERT* достоверно различался в подгруппах опухолей G₁/G₃ и G₁/G₂, максимально возрастая в подгруппе опухолей G₃ (см. рис. 2).

Обсуждение

Проллиферативная активность – одна из основных морфологических характеристик опухолевого процесса. В настоящее время наибольшую диагностическую значимость имеют иммуногистохимические маркеры пролиферации и апоптоза p53, *HER2neu* и *Ki-67* [19]. Определение уровней *HER2neu* и *Ki-67* в биопсийном и операционном материале при КРП позволяет оценить степень пролиферативной активности опухоли и является одним из определяющих факторов при выборе тактики лечения, в том числе назначения химиотерапии. При полипозе кишечника исследование молекулярно-генетических маркеров не столь распространено и не носит обязательного характера, однако высокий уровень перерождения полипов дик-

тует поиск критериев, определяющих прогноз и тактику ведения пациентов с полипозом и позволяющих оценивать риск развития КРП (озлокачествления полипов).

Так, в работе Р.М. Смоляковой и соавт. продемонстрировано, что уровень *Ki-67* в ткани полипа толстой кишки может быть прогностическим фактором, определяющим вероятность малигнизации [20]. Результаты исследования О.А. Харловой и соавт. показали ряд молекулярных отличий внутри группы зубчатых образований толстой кишки, которые могут являться факторами канцерогенного риска, а также молекулярными маркерами, позволяющими с высокой точностью проводить дифференциальную диагностику образований толстой кишки [21].

Определение уровня экспрессии *c-MYC* и *CCND1* не является «стандартным» тестом при диагностике патологий толстой кишки, однако данные гены играют фундаментальную роль в регуляции пролиферации и количества клеток крипты слизистой оболочки толстой кишки. Ген *c-MYC* участвует в различных аспектах пролиферации, инвазии и контроля апоптоза раковых клеток. Экспрессия *c-MYC* повышена в 70 % случаев КРП [22].

Кроме этого, *c-MYC* тесно связан с геном *APC* (ген аденоматозного полипа) через активацию сигнального пути *Wnt* [23]. Важная роль гена *c-MYC* в «эволюции» неопластического процесса доказана в большом количестве исследований [24–27]. Показано, что уровень цитоплазматического *c-MYC* возрастает в ряду нормальная слизистая оболочка толстой кишки–аденоматозный полип–опухоль [28].

Работ, посвященных анализу молекулярных изменений в МНТ пораженного опухолью органа, на сегодняшний день немного. Однако не вызывает

сомнений, что развитие гиперпролиферативного процесса сопровождается изменениями, затрагивающими не только весь пораженный орган, но и организм в целом [29, 30]. Интересные результаты в проведенном исследовании получены для экспрессии гена *TERT* (см. рис. 2): уровень *TERT* в норме выше, чем в тканях опухоли. Однако в большинстве данных литературы уровень *TERT* выше в опухолевых тканях, чем в норме [31, 32]. Мы объясняем эти существенные различия принципиально другим подходом в формировании контрольной группы «норма»: обычно в исследованиях в качестве нормы используют МНТ края резекции. В нашем исследовании уровень *TERT* в группе «МНТ края резекции» был ниже, чем в группе «опухоль». Таким образом, если бы группа «МНТ края резекции» использовалась в качестве контрольной, то результаты соответствовали данным литературы. Однако в настоящее время многими исследователями подчеркивается, что край резекции нельзя считать нормальной тканью [12, 33, 34], так как при формировании опухоли процессы канцерогенеза затрагивают весь орган, в данном случае толстую кишку. Полученные в нашей работе значения экспрессии *TERT* в группах «норма», «МНТ края резекции», «опухоль», во-первых, вносят дополнительную информацию об отличиях молекулярных процессов в клетке, во-вторых, подчеркивают

важность правильного выбора контрольных групп при планировании исследования.

Проведенный анализ молекулярно-генетических изменений в тканях толстой кишки показывает наличие и нарастание изменений в экспрессии генов, отвечающих за взаимодействие механизмов, регулирующих процессы клеточной пролиферации.

Заключение

Результаты проведенного исследования экспрессии генов *c-MYC*, *CCND1*, *Ki-67*, *HER2neu*, *TERT* показали, что в МНТ толстой кишки наблюдаются изменения как при возникновении злокачественных опухолей, так и при полипозе. Результаты демонстрируют, что под воздействием гиперпластического процесса изменения, возникающие в толстой кишке, затрагивают орган целиком. Установлено, что и при доброкачественных гиперпролиферативных заболеваниях (полипах) наблюдаются достоверные различия в уровне экспрессии генов, ответственных за процессы пролиферации. Эти изменения специфичны для типа патологического процесса, что позволяет рассматривать данные гены (молекулярно-генетические маркеры) в качестве наиболее перспективных кандидатов при разработке дифференциального метода диагностики заболеваний толстой кишки

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. С. 18. [State of oncological care in Russia in 2018. Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNIIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2019. P. 18. (In Russ.)].
2. Солодкий В.А., Чхиквадзе В.Д., Станоевич У.С. и др. Ранняя диагностика колоректального рака. *Врач* 2012;11:20–3. [Solodkiy V.A., Chkhivadze V.D., Stanoevich U.S. et al. Early diagnosis of colorectal cancer. *Vrach = Doctor* 2012;11:20–3. (In Russ.)].
3. Агейкина Н.В. Комбинированное эндоскопическое лечение малигнизированных полипов толстой кишки. Дис. ... канд. мед. наук. М., 2011. [Ageykina N.V. Combination endoscopic treatment of malignant colon polyps. PhD in Medicine dissertation. Moscow, 2011. (In Russ.)].
4. Juárez M., Egoavil C., Rodríguez-Soler M. et al. KRAS and BRAF somatic mutations in colonic polyps and the risk of metachronous neoplasia. *PLoS One* 2017;12(9):e0184937. DOI: 10.1371/journal.pone.0184937.
5. Xue-Qi C., Jia-Yu M., Wen-Bin L. et al. Association between CYP24A1 polymorphisms and the risk of colonic polyps and colon cancer in a Chinese population. *World J Gastroenterol* 2017;23(28):5179–86. DOI: 10.3748/wjg.v23.i28.5179.
6. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002;3(7):research0034. DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
7. Dowling S.M., Walsh D., Coffey D.S., Keely P.A. The importance of choosing the appropriate reference genes for quantitative real-time PCR, as shown using colon cancer cells and tissues. *F1000 Res* 2016;5:99. DOI: 10.12688/f1000research.7656.2.
8. Krzystek-Korpacka M., Diakowska D., Bania J., Gamian A. Expression stability of common housekeeping genes is differentially affected by bowel inflammation and cancer: implications for finding suitable normalizers for inflammatory bowel disease studies. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20(7):1147–56. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000067.
9. De Kok J.B., Roelofs R.W., Giesendorf B.A. et al. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *LabInvest* 2005;85(1):154–9. DOI: 10.1038/labinvest.3700208.
10. Станоевич У.С., Захаренко М.В., Боженко В.К. и др. Роль молекулярных изменений в морфологически неизменной слизистой оболочке толстой кишки при колоректальном раке. *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга* 2018;2:99–99a. [Stanoevich U.S., Zakharenko M.V., Bozhenko V.K. et al. The role of molecular changes in morphologically unchanged colon mucosa in colorectal cancer. *Gastroenterologiya Sankt-Peterburga = Saint Petersburg Gastroenterology* 2018;2:99–a. (In Russ.)].
11. Bujanda L., Cosme A., Gill. et al. Malignant colorectal polyps. *World J Gastroenterol* 2010;16(25):3103–11. DOI: 10.3748/wjg.v16.i25.3103.
12. Боженко В.К., Станоевич У.С., Троценко И.Д. и др. Сравнение экспрессии мРНК матричных

- металлопротеиназ в морфологически нормальной, неопластической и метастатической тканях толстого кишечника и в биоптатах здоровых доноров. Биомедицинская химия 2018;64(1):46–52. [Bozhenko V.K., Stanoevich U.S., Trotsenko I.D. et al. Comparison of matrix proteinase mRNA expression in morphologically normal, neoplastic, and metastatic colon tissue and colon biopsies from healthy donors. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry* 2018;64(1):46–52. (In Russ.)].
13. Станоевич У.С., Боженко В.К., Захаренко М.В. и др. Роль молекулярно-генетических исследований в планировании неадьювантной химиолучевой терапии при раке прямой кишки. Злокачественные опухоли 2016;4-S1(21):258–9. [Stanoevich U.S., Bozhenko V.K., Zakharenko M.V. et al. The role of molecular and genetic studies in planning of neoadjuvant chemoradiation therapy for rectal cancer. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors* 2016;4-S1(21):258–9. (In Russ.)].
 14. Reimers M.S., Zeestraten E.C.M., Kuppen P.J.K. et al. Biomarkers in precision therapy in colorectal cancer. *Gastroenterol Rep(Oxf)* 2013;1(3):166–83. DOI: 10.1093/gastro/got022.
 15. Chen Y., Jiang J., Zhao M. et al. MicroRNA-374a suppresses colon cancer progression by directly reducing CCND1 to inactivate the PI3K/AKT pathway. *Oncotarget* 2016;7(27):41306–19. DOI: 10.18632/oncotarget.9320.
 16. Gaspar T.B., Sá A., Lopes J.M. et al. Telomere maintenance mechanisms in cancer. *Genes (Basel)* 2018;9(5):241. DOI: 10.3390/genes9050241.
 17. Cordero D., Solé X., Crous-Bou M. et al. Large differences in global transcriptional regulatory programs of normal and tumor colon cells. *BMC Cancer* 2014;14:708. DOI: 10.1186/1471-2407-14-708.
 18. Druliner B.R., Ruan X., Johnson R. et al. Time lapse to colorectal cancer: telomere dynamics define the malignant potential of polyps. *Clin Transl Gastroenterol* 2016;7(9):e188. DOI: 10.1038/ctg.2016.48.
 19. Belt E.J.Th, Brosens R.P.M., Delisvan Diemen P.M. et al. Cell cycle proteins predict recurrence in stage II and III colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2012;19 Suppl 3:S682–92. DOI: 10.1245/s10434-012-2216-7.
 20. Смолякова Р.М., Машевский А.А., Кохнюк В.Т. и др. Прогностическая значимость экспрессии маркеров опухолевой пролиферации Ki-67, P53 и BCL-2 у больных колоректальным раком и полипозом. Онкологический журнал 2008;1(5):29–39. [Smolyakova R.M., Mashevskiy A.A., Kokhnyuk V.T. et al. Prognostic significance of expression of Ki-67, P53 and BCL-2 tumor proliferation markers in patients with colorectal cancer and polyposis. *Onkologicheskij zhurnal = Oncological Journal* 2008;1(5):29–39. (In Russ.)].
 21. Харлова О.А., Олейникова Н.А., Мальков П.Г., Данилова Н.В. Новые подходы в классификации зубчатых образований толстой кишки. Современные проблемы науки и образования 2018;2:24. [Kharlova O.A., Oleynikova N.A., Malkov P.G., Danilova N.V. New approaches to the classification of colon serrated lesions. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education* 2018;2:24. (In Russ.)].
 22. Dang C.V. MYC on the path to cancer. *Cell* 2012;149(1):22–35. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.003.
 23. Liu S., Tackmann N.R., Yang J. et al. Disruption of the RP-MDM2-p53 pathway accelerates APC loss-induced colorectal tumorigenesis. *Oncogene* 2017;36(10):1374–83. DOI: 10.1038/onc.2016.301.
 24. Gabay M., Li Y., Felsner D.W. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4(6):a014241. DOI: 10.1101/cshperspect.a014241.
 25. Cascon A., Robledo M. MAX and MYC: a heritable breakup. *Cancer Res* 2012;72(13):3119–24. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3891.
 26. Wolfer A., Ramaswamy S. MYC and metastasis. *Cancer Res* 2011;71(6):2034–7. DOI: 10.1158/0008-5472.can-10-3776.
 27. Melnik S., Werth N., Boeuf S. et al. Impact of c-MYC expression on proliferation, differentiation, and risk of neoplastic transformation of human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 2019;10(1):73. DOI: 10.1186/s13287-019-1187-z.
 28. Stewart J., Evan G., Watson J. et al. Detection of the c-MYC oncogene product in colonic polyps and carcinomas. *Br J Cancer* 1986;53(1):1–6.
 29. Egeblad M., Nakasone E.S., Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 2010;18:884–901. DOI: 10.1016/j.devcel.2010.05.012.
 30. Graham K., de las Morenas A., Tripathi A. et al. Gene expression in histologically normal epithelium from breast cancer patients and from cancer-free prophylactic mastectomy patients shares a similar profile. *Br J Cancer* 2010;102(8):1284–93. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605576.
 31. Ayiomamitis G.D., Notas G., Zaravinos A. et al. Differences in telomerase activity between colon and rectal cancer. *Canad J Surg* 2014;57(3):199–208. DOI: 10.1503/cjs.031312.
 32. Nowak J., Januszkiewicz D., Lewandowski K. et al. Activity and expression of human telomerase in normal and malignant cells in gastric and colon cancer patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:75–80. DOI: 10.1097/00042737-200301000-00013.
 33. Aran D., Camarda R., Odegaard J. et al. Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes. *Nat Commun* 2017;8:1077. DOI: 10.1038/s41467-017-01027-z.
 34. Sanz-Pamplona R., Berenguer A., Cordero D. Aberrant gene expression in mucosa adjacent to tumor reveals a molecular crosstalk in colon cancer. *Mol Cancer* 2014;13:46. DOI: 10.1186/1476-4598-13-46.

Вклад авторов

Т.М. Кулинич: научное редактирование текста, подготовка рукописи к публикации;
М.В. Захаренко: получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание отдельных глав рукописи;

Е.Л. Джикия: обзор публикаций по теме статьи, написание отдельных глав рукописи, формирование общего списка литературы, подготовка рукописи к публикации;

А.Л. Сенчукова: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

У.С. Станоевич: получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, научное редактирование текста;

И.Б. Грунин, С.В. Гончаров, Т.В. Крашихина: получение данных для анализа,

Н.В. Мельникова, Е.А. Кудинова: написание отдельных глав рукописи;

О.П. Близиюков: получение данных для анализа, научное редактирование текста;

В.К. Боженко: научное редактирование текста, разработка дизайна обзора.

Authors' contributions

T.M. Kulinich: scientific editing, manuscript preparation for publication;

M.V. Zakharenko: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, writing individual chapters of the manuscript;

E.L. Dzhikiya: reviewing of publications of the article's theme, writing individual chapters of the manuscript, formation of a general list of references, manuscript preparation for publication;

A.L. Senchukova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

U.S. Stanoevich: obtaining data for analysis, reviewing of publications of the article's theme, scientific editing;

I.B. Grunin, S.V. Goncharov, T.V. Krashikhina: obtaining data for analysis;

N.V. Melnikova, E.A. Kudinova: writing individual chapters of the manuscript;

O.P. Bliznyukov: obtaining data for analysis; scientific editing;

V.K. Bozhenko: scientific editing, developing the research design.

ORCID авторов / ORCID of authors

T.M. Кулинич / T.M. Kulinich: <https://orcid.org/0000-0003-2331-5753>

M.B. Захаренко / M.V. Zakharenko: <https://orcid.org/0000-0003-2480-4145>

A.L. Сенчукова / A.L. Senchukova: <https://orcid.org/0000-0001-9268-3221>

У.С. Станоевич / U.S. Stanoevich: <https://orcid.org/0000-0002-9057-6227>

Н.В. Мельникова / N.V. Melnikova: <https://orcid.org/0000-0003-1193-352X>

С.В. Гончаров / S.V. Goncharov: <https://orcid.org/0000-0001-7914-1882>

Т.В. Крашихина / T.V. Krashikhina: <https://orcid.org/0000-0001-7567-8308>

Е.А. Кудинова / E.A. Kudinova: <https://orcid.org/0000-0002-5530-0591>

О.П. Близнюков / O.P. Bliznyukov: <https://orcid.org/0000-0003-2401-5007>

В.К. Боженко / V.K. Bozhenko: <https://orcid.org/0000-0001-8351-8152>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования № 4 от 26.04.2019 одобрен комитетом по биомедицинской ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России. Председатель этического комитета Центра к.м.н. А.А. Моргунов.

Все участники исследования подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol No 4 dated 26.04.2019 was approved by the biomedical ethics committee Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Ministry of Health of Russia. Chairman of the ethics committee of the Center, Ph.D. A.A. Morgunov.

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

Статья поступила: 18.06.2020. **Принята к публикации:** 23.07.2020.

Article submitted: 18.06.2020. **Accepted for publication:** 23.07.2020.

Дифференциальная экспрессия микроРНК и их генов-мишеней при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях разной степени тяжести

Т.А. Димитриади¹, Д.В. Бурцев¹, Е.А. Дженкова², Д.С. Кутилин²

¹ГАОУ РО «Областной консультативно-диагностический центр»; Россия, 344010 Ростов-на-Дону, ул. Пушкинская, 127;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037 Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63

Контакты: Денис Сергеевич Кутилин k.denees@yandex.ru

Введение. В настоящее время недостаточно известно о специфических микроРНК (мкРНК), задействованных в развитии цервикальной интраэпителиальной неоплазии I, II, III степеней тяжести (CIN1, 2, 3) и переходе к карциноме in situ (CIS). Проведенный нами ранее метаанализ позволил выделить 8 мкРНК (hsa-miR-1246, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-375-5p, hsa-miR-96-5p), обладающих потенциальной значимостью в прогрессировании предраковых заболеваний в рак шейки матки.

Цель исследования – анализ особенностей экспрессии hsa-miR-1246, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-375-5p, hsa-miR-96-5p и их генов-мишеней, а также генов, ассоциированных с ними в общих сигнальных путях, в тканях шейки матки у пациенток с CIN1–3 и CIS.

Материалы и методы. Для оценки уровня экспрессии мкРНК и матричной РНК использовали метод количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Анализ данных проводили на языке программирования Python с использованием библиотеки SciPy. Поиск генов-мишеней осуществляли с помощью алгоритма TarPmiR и анализировали избыточную представленность мкРНК в сигнальных путях (Over-Representation Analysis). Для выявления генов, ассоциированных с генами-мишенями в общих сигнальных путях, использовали алгоритмы GIANT (Genome-scale Integrated Analysis of gene Networks in Tissues) и «сетевая интеграция с несколькими ассоциациями».

Результаты. Для мкРНК miR-145, miR-196b, miR-34a, miR-20a, miR-21, miR-375 и miR-96 обнаружено снижение экспрессии в подгруппе пациенток с CIS, при этом для 4 мкРНК (miR-145, miR-34a, miR-20a и miR-375) выявлено увеличение уровня экспрессии при CIN1, 2. Обнаруженные особенности экспрессии мкРНК в подгруппах пациенток с CIN1–3 и CIS были ассоциированы с экспрессией их генов-мишеней (CDKN2A, MKI67, TOP2A и CD82), а также генов, связанных с ними в общих сигнальных путях (PGK1, THBS4 (TSP4) и ECM1).

Заключение. Результаты исследования позволили установить, что каждая степень CIN характеризуется особым молекулярным профилем – дифференциальной экспрессией мкРНК, их генов-мишеней и генов, ассоциированных с ними в общих сигнальных путях.

Ключевые слова: микроРНК, экспрессия генов, цервикальная интраэпителиальная неоплазия, рак шейки матки

Для цитирования: Димитриади Т.А., Бурцев Д.В., Дженкова Е.А., Кутилин Д.С. Дифференциальная экспрессия микроРНК и их генов-мишеней при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях разной степени тяжести. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(2):47–61.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-2-47-61



Differential expression of microRNAs and their target genes in cervical intraepithelial neoplasias of varying severity

T.A. Dimitriadis¹, D.V. Burtsev¹, E.A. Dzhenkova², D.S. Kutilin²

¹Regional Consultative and Diagnostic Center; 127 Pushkinskaya St., Rostov-on-Don 344010, Russia;

²National Medical Research Center for Oncology; 63 14th liniya, Rostov-on-Don 344037, Russia

Background. Currently, little is known about the specific microRNAs involved in the development of cervical intraepithelial neoplasia (CIN1, 2, 3) and the transition to cancer in situ (CIS). Our meta-analysis allowed us to isolate 8 microRNAs (hsa-miR-1246, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-375-5p, hsa-miR-96-5p) with potential significance in the progression of precancerous diseases to cervical cancer.

Objective: to analyze the expression features of hsa-miR-1246, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-375-5p, hsa-miR-96-5p and their target genes, as well as genes associated with them in common signaling pathways in the tissues of the cervix in patients with CIN1–3 and CIS.

Materials and methods. To assess the expression level of microRNA and matrixRNA, the quantitative polymerase chain reaction in real time method was used. Data analysis was carried out in the Python programming language using the SciPy library. Search for target genes was performed using the TarPmiR algorithm and the overrepresentation of microRNAs in signaling pathways (Over-Representation Analysis) was

analyzed. To identify genes associated with target genes in common signaling pathways, *GIANT* (Genome-scale Integrated Analysis of gene Networks in Tissues) and network integration with several associations algorithms were used.

Results. For microRNAs miR-145, miR-196b, miR-34a, miR-20a, miR-21, miR-375 and miR-96 a decrease in expression was found in the subgroup of patients with CIS, while for 4 microRNAs (miR-145, miR-34a, miR-20a and miR-375), an increase in the expression level was found for CIN1, 2. The detected features of microRNA expression in subgroups of patients with CIN1–3 and CIS also affected the expression of their target genes (CDKN2A, MKI67, TOP2A and CD82), as well as the genes associated with them in common signaling pathways (PGK1, THBS4 (TSP4) and ECM1).

Conclusion. Thus, the study revealed that each degree of CIN is characterized by its own specific molecular profile – the differential expression of microRNAs, their target genes and the genes associated with them in the general signaling pathways.

Key words: microRNA, gene expression, cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer

For citation: Dimitriadi T.A., Burtsev D.V., Dzhenkova E.A., Kutilin D.S. Differential expression of microRNAs and their target genes in cervical intraepithelial neoplasias of varying severity. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2020;7(2):47–61. (In Russ.).

Введение

Ежегодно в мире регистрируют более 528 тыс. новых случаев заболеваемости раком шейки матки (РШМ) и 266 тыс. случаев летального исхода от этой патологии [1]. Одним из основных этиологических факторов РШМ является инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска [2]. Персистенция ВПЧ-инфекции может приводить к цервикальной интраэпителиальной неоплазии I, II, III степеней тяжести (CIN1, 2, 3). Около трети CIN3 прогрессирует до инвазии в течение 30 лет [3]. CIN1 (легкая дисплазия) характеризуется морфологическими признаками папилломавирусной инфекции и невыраженными изменениями строения эпителия (наличие атипичных клеток с признаками дискариоза, фрагментация хроматина, нарушение ядерно-цитоплазматического соотношения, патологических митозов) с умеренной пролиферацией клеток базального слоя (изменения охватывают не более 1/3 толщины эпителиального слоя). CIN2 (умеренная дисплазия) имеет более выраженные изменения, затрагивающие 1/2 эпителиального слоя. CIN3 (тяжелая дисплазия) характеризуется поражением более 2/3 эпителиального слоя и появлением патологических митозов, а также наличием огромных гиперхромных ядер клеток [4]. Прогрессирование до интраэпителиальных предраковых заболеваний происходит из-за множественных нарушений в сигнальных путях, регулирующих клеточный цикл, вызванных избыточной экспрессией вирусных белков E6 и E7, которые функционально инактивируют продукты генов *RB* и *TP53*. Данный процесс является многоэтапным и включает ряд генетических и эпигенетических изменений, в том числе изменения транскрипционной активности генов и микроРНК (мкРНК) [5].

МикроРНК – короткие некодирующие РНК, являющиеся эпигенетическими регуляторами, специфичными для определенных тканей, которые модулируют экспрессию генов путем взаимодействия с комплементарными нуклеотидными последовательностями мишеней матричной РНК (мРНК), что либо катализирует разрушение мРНК, либо ингибирует трансляцию мРНК в белок [5].

В настоящее время недостаточно известно о специфических мкРНК, задействованных в развитии CIN (в переходе от CIN1 к CIN2 и CIN3), и механизмах их регуляции [6]. Вероятно, aberrantная экспрессия мкРНК при развитии CIN является результатом инфицирования ВПЧ [5].

Проведенный нами ранее метаанализ позволил выделить 8 мкРНК (hsa-miR-1246, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-375-5p, hsa-miR-96-5p), обладающих потенциальной значимостью в прогрессировании предраковых заболеваний в РШМ [5].

Цель исследования – анализ особенностей экспрессии hsa-miR-1246, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-375-5p, hsa-miR-96-5p и их генов-мишеней, а также ассоциированных с ними в общих сигнальных путях генов в тканях шейки матки у пациенток с CIN разной степени тяжести.

Материалы и методы

В исследование включены 85 пациенток, которые были разделены на 2 группы: основную ($n = 57$) – пациентки с различной степенью диспластических повреждений эпителия: CIN1 ($n = 15$), CIN2 ($n = 17$), CIN3 ($n = 15$), карцинома *in situ* (CIS; $n = 10$); контрольную ($n = 28$) – пациентки, у которых по данным гистологического исследования дисплазия не выявлена. У всех пациенток, участвующих в исследовании, обнаружено инфицирование ВПЧ высокого канцерогенного риска (типы 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68).

Использовали образцы ткани, полученной во время эксцизионной биопсии шейки матки. Подгруппу CIN1 и контрольную группу (без CIN и CIS) составили пациентки, у которых выявлен H-SIL в цитологическом мазке и/или была неудовлетворительная кольпоскопическая картина при персистенции L-SIL (показание к эксцизии). Верификацию CIN1 и условной нормы осуществляли после эксцизии гистологическим методом. Образцы ткани сразу после биопсии помещали в раствор RNA later (Ambion, США).

Выделение суммарной РНК. Изолированные измельченные одноразовым стерильным скальпелем фрагменты ткани (размером около 2 мм в диаметре) помещали в 600 мкл лизирующего раствора (4 М гуанидин изотиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,3 % саркозил, 3 % ДТТ). Пробирки помещали в MagNa Lyser (Roche, Швейцария) и подвергали механической гомогенизации. Дальнейшее выделение РНК проводили методом гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции [7]. Для очистки от примесей геномной ДНК образцы суммарной РНК обрабатывали препаратами ДНКазы 1. Концентрацию полученных препаратов РНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0® (Invitrogen, США). Для оценки качества препарата РНК проводили электрофорез в 2 % агарозном геле (интенсивность полос 18S и 28S в соотношении 1:1 свидетельствовала о приемлемом для дальнейшей работы качестве РНК) (рис. 1) [8].

Оценка экспрессии мкРНК. Для выявления зрелых мкРНК и малой РНК U6 применяли метод, предложенный I. Balcells и соавт. [9]. Выделенную суммарную РНК использовали в реакции обратной транскрипции, которую проводили одновременно с полиаденилированием РНК с применением специфичных RT-праймеров. Далее выполняли детекцию полученной комплементарной ДНК (кДНК) с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров осуществляли с использованием алгоритма I. Balcells и соавт. [9]. Для каждой мкРНК отдельно проводили реакцию обратной транскрипции в 1 повторе. Для обратной транскрипции использовали реакционную смесь, содержащую 1x Poly(A)-буфер (BioLabs, США), 10 U/мкл Reverse Transcriptase MMLV (Синтол, Россия), 0,1 мМ dNTPs (Синтол, Россия), 0,1 мМ аденозинтрифосфата (АТФ) (BioLabs, США), 1 мкМ RT-праймера, 0,5 U/мкл Poly(A)-полимеразы (BioLabs, США) и 1 мкг тотальной РНК. Реакцию проводили в течение 15 мин при температуре 16 °С, 15 мин при 42 °С, затем обратную транскриптазу инактивировали 2 мин при 95 °С.

Изменение относительной экспрессии мкРНК оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию выполняли в 20 мкл PCR-смеси,

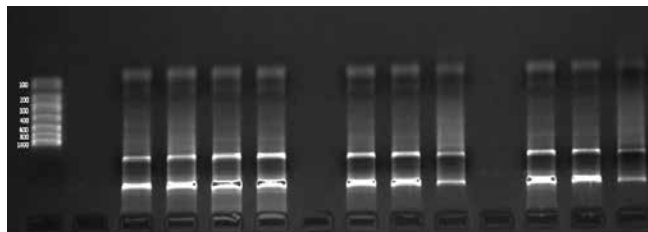


Рис. 1. Электрофореграмма РНК, выделенной из тканей шейки матки (визуализация на GelDoc XR PLUS)

Fig. 1. Electropherogram of RNA extracted from cervical tissues (visualization with GelDoc XR PLUS)

содержащей 1x PCR-буфер, 0,25 мМ dNTPs, 2 мМ MgCl₂, 1 единицу активности (ед. акт.) Taq-DNA-полимеразы, по 500 нМ прямого и обратного праймеров. Постановку количественной ПЦР в режиме реального времени каждого образца проводили в 3 повторах. Полученные смеси инкубировали в амплификаторе CFX 96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: 2 мин при 94 °С, 50 циклов: денатурация при 95 °С 10 с, отжиг и элонгация при 64 °С 20 с. Результаты, соответствующие значениям пороговых циклов (Ct) >40, были признаны отрицательными. Полученные данные подвергали статистической обработке (критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони).

Оценка экспрессии мРНК. Для наработки кДНК готовили реакционную смесь, содержащую 5 мкМ рандомных праймеров, 1x RT-буфер, 0,5 мМ dNTP микс, 0,5 ед. акт/мкл RNase Inhibitor (Thermo Scientific, США), 5 U/мкл Reverse Transcriptase MMLV (Синтол, Россия) и выделенную суммарную РНК в качестве матрицы. Полученную смесь инкубировали при температуре 44 °С в течение 1 ч, обратную транскриптазу инактивировали при 92 °С в течение 10 мин.

Методом количественной ПЦР в режиме реального времени определяли величины относительной экспрессии 7 генетических локусов (*ECM1*, *CDKN2A*, *THBS4*, *MKI67*, *TOP2A*, *CD82*, *PGK1*). В качестве референсных генов использовали *GAPDH*, *ACTB* и *HMBS* (Hydroxymethylbilane Synthase). Постановку каждого локуса проводили в 3 технических повторах. Для амплификации использовали реакционную смесь, содержащую 1x PCR-буфер, 0,2 мМ dNTP микс, 1,5–2,0 мМ MgCl₂, по 400 нМ праймеров, 0,05 U/мкл Taq-полимеразы, 10 нг кДНК. Полученные смеси амплифицировали в термоблокере CFX 96 (Bio-Rad, США) в соответствии с температурным режимом: первичная денатурация при 95 °С в течение 240 с; 40 циклов: 95 °С в течение 10 с, 58 °С в течение 30 с, 72 °С в течение 30 с.

Олигонуклеотидные праймеры, эффективность амплификации и стабильность референсных генов. Все олигонуклеотиды были синтезированы в компании «Вектор-Бест» (Россия). Олигонуклеотиды для оценки экспрессии мРНК выбирали с использованием онлайн-сервиса PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/>). Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров для мкРНК осуществляли с помощью алгоритма I. Balcells и соавт. [9] (табл. 1). Для каждой мкРНК и мРНК подбирали несколько комплектов олигонуклеотидов, из которых выбирали те, которые характеризовались наиболее высокой эффективностью обратной транскрипции и ПЦР. Эффективность обратной транскрипции оценивали по значениям пороговых циклов (Ct), полученных при анализе синтетических аналогов мкРНК и мРНК (Биосан, Россия), взятых в известной концентрации. Эффективность амплификации (E) для каждой системы оценивали с помощью построения калибровочной кривой с использованием для анализа разведения соответствующих РНК,

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры для микроРНК и их генов-мишеней

Table 1. Oligonucleotide primers for microRNAs and their target genes

Локус Locus	Прямой праймер Forward primer	Обратный праймер Reverse primer	RT-праймер RT primer
<i>miR-21-5p</i>	TCAGTAGCTTATCAGACTGATG	CGTCCAGTTTTTTTTT TTTTTTTCAAC	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTTTCA
<i>miR-145-5p</i>	AGGTCCAGTTTTCCCAGGAA	GTCCAGTTTTTTTTTTTT TTTTAGGGA	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTTAG
<i>miR-1246</i>	CGCAGAATGGATTTTTGGAG	GTCCAGTTTTTTTTTTTT TCCTG	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTCC
<i>miR-196b-5p</i>	GCAGTAGGTAGTTTCTGTGT	GTCCAGTTTTTTTTTTTT TTCCCA	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTCC
<i>miR-34a-5p</i>	GCAGTGGCAGTGTCTTAG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTTACAAC	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTAC
<i>miR-20a-5p</i>	ACAGTAAAGTGCTTATAGTGCA	GTCCAGTTTTTTTTTTTT TTCTACCT	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTCT
<i>miR-375-5p</i>	GAGCCCCTCGCACA	GGTCCAGTTTTTTTTTT TTTTGGT	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTTGG
<i>miR-96-5p</i>	CAGTTTGCACTAGCACA	GGTCCAGTTTTTTTTTT TTTTTAGCA	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTTTAG
<i>U6 snRNA</i>	CGATAAAATTGGAACGATACAGA	ATTTGGACCATTCTCGATTTGT	ATTTGGACCATTCT CGATTTGT
<i>GAPDH</i>	GTCAAGGCTGAGAACGGGAA	TCGCCCCACTTGATTTTGGAA	5'-NNNNNN-3'*
<i>ACTB</i>	AACCGCGAGAAGATGACCC	AGCACAGCCTGGTAGCAAC	
<i>HMBS</i>	ACAGCCTACTTTCCAAGCGG	GGCTGTTTTCTCCGCCGTT	
<i>MKI67</i>	TGAGCCTGTACGGCTAAAACA	TCAGTTGACTTCCTTCCATTCTGA	
<i>CDKN2A</i>	CCGGGGTTCGGGTAGAGG	CCATCATCATGACCTGGATCG	
<i>TOP2A</i>	CTGGTGCTAGTAGTGAACCTGT	TGTCTGGGCGGAGCAAATA	
<i>CD82</i>	AAGCAGAACCCGCAGAGTC	GTCTGGAGCTTCCTTCCAC	
<i>PGK1</i>	CCACTGTGGCTTCTGGCATA	ATGAGAGCTTTGGTTCCCCG	
<i>TSP4</i>	AGCCTGTGGAGTTTCTTTGAC	ACCGAAGATGGTGGCTGAAC	
<i>ECM1</i>	GGACAGAGTCAAGTGCAGCC	TTGGGCAGGTAGCAGCTTTT	

*Случайные гексонуклеотиды представляют собой олигонуклеотидные последовательности из 6 оснований, которые синтезируются случайным образом, что дает целый ряд последовательностей, которые могут действовать в качестве праймера для начала синтеза первой цепи комплементарной ДНК.

*Random hexamer nucleotides are randomly synthesized 6-base oligonucleotide sequences producing a number of sequences which can serve as a primer for synthesis of the first complementary DNA chain.

выделенных из клинических проб согласно описанному выше протоколу (эффективность амплификации 2,0).

Стабильность экспрессии для подбора референсных генов оценивали с помощью алгоритма geNorm [10]. Первоначальный список предлагаемых нормализаторов для мкРНК включал miR-191 (экспрессия этой мкРНК была наиболее стабильной в 13 сравниваемых тканях [11]), miR-23a (в качестве нормализатора, подходящего для анализа образцов шейки матки [12]) и U6 (традиционно используется в качестве отдельного эталона для нормализации данных экспрессии мкРНК);

для мРНК – *GAPDH*, *ACTB*, *B2M* и *HMBS*. С помощью алгоритма geNorm для нормализации данных экспрессии мкРНК был выбран U6, для нормализации данных экспрессии мРНК – *GAPDH*, *ACTB* и *HMBS*.

Расчет относительной экспрессии генов и мкРНК. Относительную экспрессию (RE) рассчитывали по формуле $RE = E^{-\Delta\Delta Ct}$ (E – эффективность амплификации, $E = 2,0$). Нормализацию результатов проводили по референсным локусам и уровню экспрессии соответствующих генов и мкРНК мишеней в образцах контрольной группы последовательно по схеме, приведенной ниже.

- Нормализация по среднему референсных генов:

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{target}} - C(t)_{\text{g_reference}}$$

где $C(t)_{\text{g_reference}}$ – среднее геометрическое ($C(t)$) референсных генов (для мРНК); $C(t)_{\text{target}} - C(t)$ генов-мишеней.

- Расчет $E^{-\Delta C(t)}$ по каждому гену или мкРНК для каждой пациентки контрольной группы и подгрупп основной группы.
- Расчет медианы $E^{-\Delta C(t)}$ по каждому гену для каждой пациентки контрольной группы и подгрупп основной группы.
- Нормализация по контрольной группе и окончательный результат как кратность изменения [13]:

$$RE = \frac{E^{-\Delta C(t)} \text{ медиана подгруппы основной группы}}{E^{-\Delta C(t)} \text{ медиана контрольной группы}},$$

что тождественно $RE = E^{-\Delta \Delta C(t)}$.

Статистический и биоинформационный анализ. Анализ данных проводили на языке программирования Python с использованием библиотеки SciPy [14]. Различия между группами оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни, для корректировки множественного сравнения применяли поправку Бонферрони.

Поиск генов-мишеней осуществляли с использованием алгоритма TarPmiR по базам данных TargetScan, miRDB и miRTarBase. TarPmiR использует подход на основе метода Random forest («случайный лес») для прогнозирования сайта-мишени мкРНК. «Случайный лес» – алгоритм машинного обучения, заключающийся в использовании ансамбля решающих деревьев, сочетает в себе 2 основные идеи: метод бэггинга Бреймана и метод случайных подпространств. Результат модели «случайный лес» – предсказанная вероятность того, что целевой сайт-кандидат является истинным целевым сайтом [15].

Также проводили анализ избыточной представленности мкРНК в сигнальных путях (Over-Representation Analysis, ORA). Этот метод измеряет процент мкРНК в сигнальном пути, которые имеют дифференциальную экспрессию. Целью ORA является получение списка наиболее важных сигнальных путей, упорядоченных в соответствии с уровнем значимости различий (от p_{\min} к p_{\max}). Статистическую значимость перекрытия между генами из сигнального пути и списка дифференциально экспрессируемых генов рассчитывали путем применения точного критерия Фишера [16].

Для выявления генов, ассоциированных с генами-мишенями в общих сигнальных путях, использовали 2 алгоритма:

- GIANT (Genome-scale Integrated Analysis of gene Networks in Tissues), который на основе байесовского классификатора обеспечивает интеграцию специфических для процесса функциональных сетей взаимосвязей между генами, а также позволяет оценить силу этих взаимодействий [17];

- «сетевая интеграция с несколькими ассоциациями», который также позволяет установить взаимодействия между генами. Данный алгоритм предсказывает функцию гена в составе сложной сети из множества генов, используя один из методов машинного обучения, основанный на распределении меток гауссовых полей. Алгоритм присваивает оценку каждому узлу-точке построенной сети, отражающую вычисленную силу связи [18].

Результаты

В ходе исследования экспрессии мкРНК в тканях шейки матки с различной степенью диспластических повреждений эпителия обнаружено статистически значимое ($p < 0,005$) увеличение экспрессии hsa-miR-145-5p, hsa-miR-34a-5p и hsa-miR-20a-5p в подгруппе пациенток с CIN1 в 1,5; 2,0 и 1,7 раза соответственно и hsa-miR-375-5p в подгруппе пациенток с CIN1 и CIN2 в 1,7 и 4,2 раза соответственно относительно контрольной группы. При этом обнаружено статистически значимое снижение ($p < 0,005$) экспрессии hsa-miR-145-5p в подгруппе пациенток с CIS в 1,7 раза, hsa-miR-196b-5p и hsa-miR-34a-5p в подгруппе пациенток с CIN3 и CIS в 2,0 раза, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-375-5p и hsa-miR-96-5p в подгруппе пациенток с CIS в 1,7; 1,7 и 3,3 раза соответственно и hsa-miR-21-5p в подгруппе пациенток с CIN1 и CIS в 10,0 и 3,3 раза соответственно относительно контрольной группы (рис. 2).

Также статистически значимое ($p < 0,005$) снижение уровня экспрессии мкРНК наблюдалось в подгруппе пациенток с CIS относительно CIN1: для hsa-miR-145-5p – в 2,5 раза, для hsa-miR-34a-5p – в 4,0 раза, для hsa-miR-20a-5p – в 2,8 раза и для hsa-miR-96-5p – в 3,7 раза.

Для hsa-miR-34a-5p обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение экспрессии в подгруппе CIN3 в 4,0 раза относительно CIN1. Для hsa-miR-21-5p выявлено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение экспрессии в подгруппах CIN2 и CIN3 в 11,0 и 6,7 раза относительно CIN1. Для hsa-miR-375-5p обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение экспрессии в 2,5 раза в подгруппе CIN2 относительно CIN1 и снижение экспрессии в 3,3 раза в подгруппе CIN3 относительно CIN2.

Таким образом, для 7 исследованных мкРНК (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-375-5p, hsa-miR-96-5p) обнаружено снижение экспрессии в подгруппе пациенток с CIS по сравнению с подгруппой пациенток без диспластических повреждений в эпителии шейки матки. При этом для 4 исследованных мкРНК (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p и hsa-miR-375-5p) выявлено увеличение уровня экспрессии при CIN низкой степени тяжести (CIN1, CIN2).

Обнаруженные особенности экспрессии 7 мкРНК в подгруппах пациенток с CIN1–3 и CIS, вероятно, должны отразиться и на транскрипционной активности их генов-мишеней.

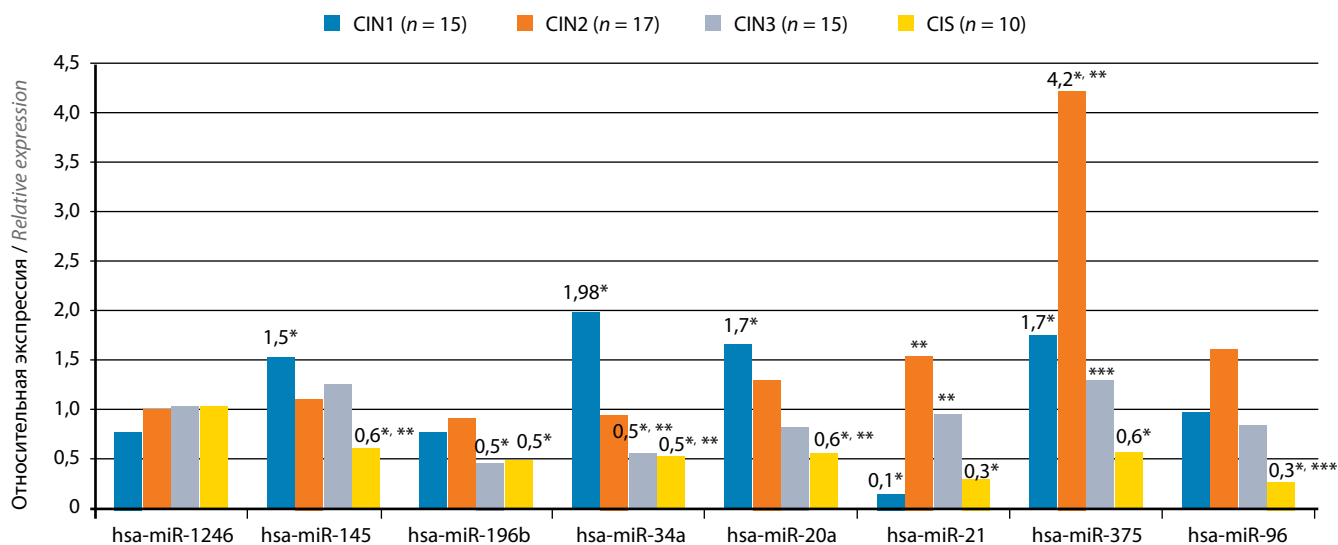


Рис. 2. Относительные уровни экспрессии микроРНК в тканях шейки матки с различной степенью диспластических повреждений эпителия. Статистически значимые различия показателей для тканей шейки матки с различной степенью диспластических повреждений эпителия выявлены с помощью критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони: *относительно показателей эпителия без диспластических повреждений, $p < 0,005$; **относительно показателей CIN1, $p < 0,05$; ***относительно показателей CIN2, $p < 0,05$. CIN – цервикальная интраэпителиальная неоплазия; CIS – карцинома in situ

Fig. 2. Relative microRNA expression levels in cervical tissues with varying severity of dysplastic changes in the epithelium. Statistically significant differences in characteristics of cervical tissues with varying severity of dysplastic changes in the epithelium were identified using the Mann–Whitney test with Bonferroni correction: *relative to the epithelium without dysplastic changes, $p < 0.005$; **relative to CIN1, $p < 0.05$; ***relative to CIN2, $p < 0.05$. CIN – cervical intraepithelial neoplasia; CIS – carcinoma in situ

Для мкРНК, дифференциально экспрессирующихся при CIN разной степени тяжести, проведен поиск целевых генов с использованием алгоритма TarPmiR. Для 7 мкРНК, статистически значимо изменяющих экспрессию, предсказано 7597 генов-мишеней, из них подтверждено в базах данных TargetScan, miRDB и miRTarBase взаимодействие мкРНК–мРНК для 59 генов-мишеней, в том числе 4 генов-мишеней с минимальной свободной энергией взаимодействия мкРНК–мРНК: *CDKN2A*, *MKI67*, *TOP2A* и *CD82* (рис. 3).

Для оценки биологической значимости дифференциально экспрессирующихся мкРНК и построения списка наиболее важных сигнальных путей, в которых они участвуют, был применен метод ORA. Данные, полученные в ходе реализации алгоритма ORA, приведены в табл. 2, 3.

Аннотации, представленные в табл. 2, получены с помощью баз данных miRTarBase (Gene Ontology) и miRWalk (Gene Ontology). С использованием первой выделены 45 сигнальных каскадов, с использованием второй – 154 сигнальных каскада, в которых участвуют исследуемые мкРНК.

Аннотации, представленные в табл. 3, получены с использованием баз MNDR (Mammalian ncRNA-disease repository) и miRWalk.

Следующим этапом исследования стал анализ экспрессии генов-мишеней мкРНК, дифференциально экспрессирующихся в эпителии шейки матки с различной степенью диспластических повреждений. Ген-мишеней (с высокой устойчивостью образуемого комплекса мкРНК–мРНК) на основании алгоритма

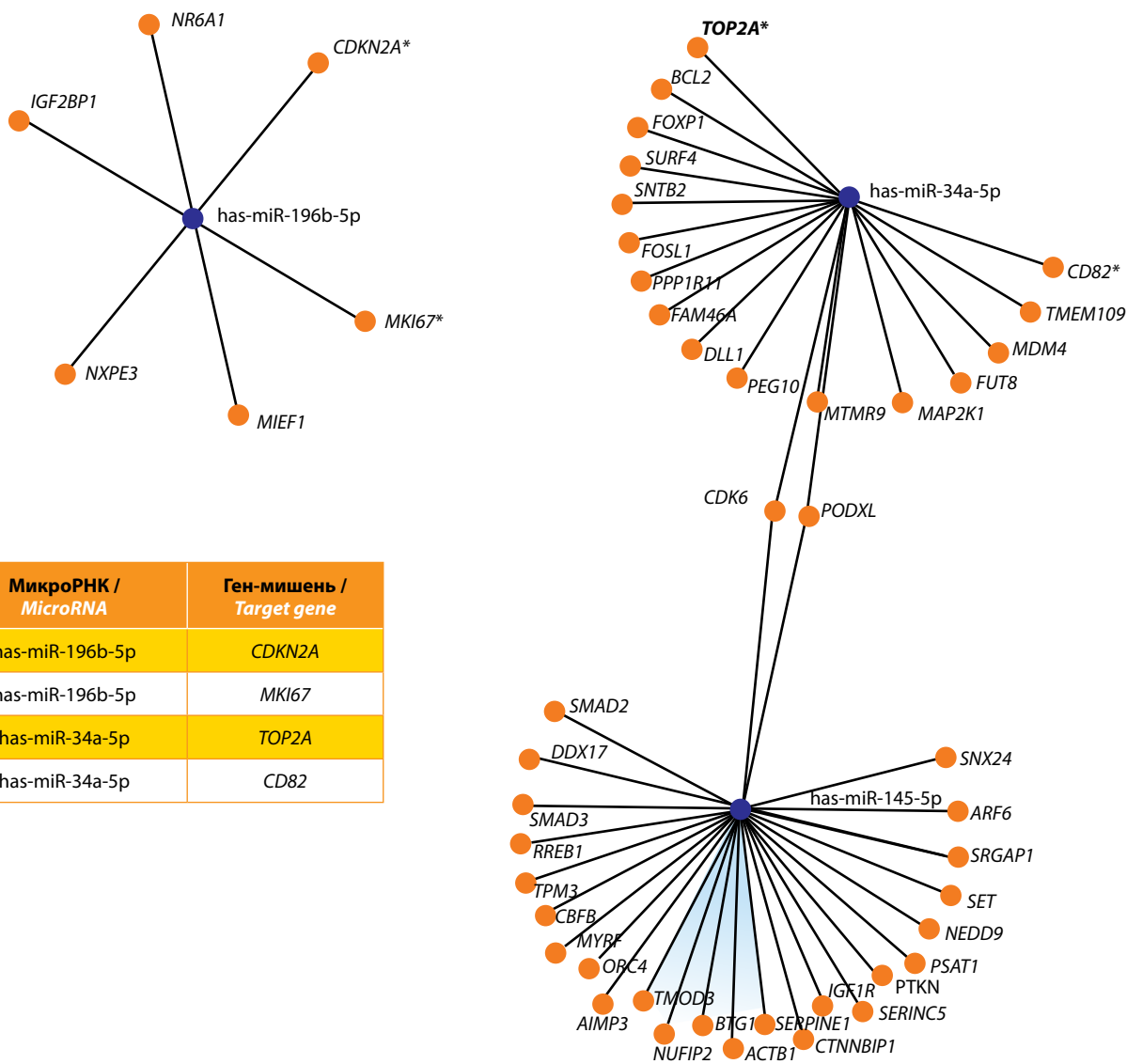
TarPmiR выявлено только 4 (*CDKN2A*, *MKI67*, *TOP2A* и *CD82*). Поэтому для этих локусов осуществлен поиск ассоциированных с ними в общих сигнальных путях генов. Для этого использовали алгоритмы GIANT и «сетевая интеграция с несколькими ассоциациями» (рис. 4, табл. 4).

Для 4 генетических локусов (*CDKN2A*, *MKI67* (*Ki-67*), *TOP2A* и *CD82*) наиболее сильное взаимодействие (оценивали на нескольких уровнях: совместная экспрессия генов (базы NCBI, Gene Expression Omnibus), взаимодействие с белком (базы BioGRID, IntAct, MINT и MIPS), общая регуляция транскрипционными факторами (JASPAR), солокализация) выявлено с генами *PGK1*, *THBS4* (*TSP4*) и *ECM1* (см. табл. 3, рис. 4).

Проведена оценка уровней экспрессии генов *CDKN2A*, *MKI67*, *TOP2A*, *CD82*, *PGK1*, *THBS4* и *ECM1* у пациенток с CIN разной степени тяжести относительно таковых у пациенток без неоплазий.

Обнаружено статистически значимое увеличение (критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони, $p < 0,005$) экспрессии генов *PGK1*, *THBS4* и *CD82* в 1,7; 2,7 и 1,9 раза в подгруппе пациенток с CIN1, генов *PGK1*, *CDKN2A*, *THBS4*, *MKI67*, *TOP2A* и *CD82* в 2,2; 8,0; 2,3; 4,6; 5,2 и 1,8 раза в подгруппе пациенток с CIN2, а также генов *CDKN2A*, *MKI67* и *TOP2A* в 3,9; 2,8 и 3,2 раза соответственно в подгруппе пациенток с CIN3 относительно контрольной группы (рис. 5).

Во всех подгруппах обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение экспрессии гена *ECM1* для CIN1 и CIN2 в 2 раза, для CIN3 – в 2,5 раза, для CIS – в 5 раз относительно контрольной группы. У па-



МикроРНК / MicroRNA	Ген-мишень / Target gene
has-miR-196b-5p	CDKN2A
has-miR-196b-5p	MKI67
has-miR-34a-5p	TOP2A
has-miR-34a-5p	CD82

Рис. 3. МикроРНК и их гены-мишени (использован алгоритм TarPmiR)
 Fig. 3. MicroRNAs and their target genes (the TarPmiR algorithm was used)

Таблица 2. Избыточная представленность в основных сигнальных путях дифференциально экспрессирующихся микроРНК

Table 2. Excessive representation in the main signal pathways of differentially expressed microRNAs

Источник аннотации Annotation source	Сигнальный путь Signal pathway	p	Число микроРНК Number of micro-RNAs	МикроРНК MicroRNA
miRTar-Base (Gene Ontology)	Репарация ДНК (GO0006298) DNA repair (GO0006298)	0,0000014	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Сигнальный путь апоптоза (GO0097190) Apoptosis signal pathway (GO0097190)	0,0000945	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p

Продолжение табл. 2

Continuation of table 2

Источник аннотации Annotation source	Сигнальный путь Signal pathway	<i>p</i>	Число микроРНК Number of micro-RNAs	МикроРНК MicroRNA
miRTar-Base (Gene Ontology)	Клеточный ответ на механический стимул (GO0071260) Cell response to mechanical stimulus (GO0071260)	0,0002000	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Активация JUN-киназы (GO0007257) JUN-kinase activation (GO0007257)	0,0002470	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Эпителиально-мезенхимальный переход (GO0001837) Epithelial-to-mesenchymal transition (GO0001837)	0,0002530	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Поддержание длины теломер (GO0000723) Telomere length maintenance (GO0000723)	0,0002820	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Активация MAPKK (GO0000186) MAPKK activation (GO0000186)	0,0003240	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Сигнальный путь Notch (GO0007219) Notch signal pathway (GO0007219)	0,0003910	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Регуляция воспалительного ответа (GO0050728) Inflammatory response regulation (GO0050728)	0,0006810	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Дифференцировка эпителиальных клеток (GO0030855) Epithelial cell differentiation (GO0030855)	0,0007760	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
miRWalk (Gene Ontology)	Регуляция активности транскрипционного фактора NF-κB (GO0032088) Regulation of NF-κB transcription factor activity	0,0009430	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p

Окончание табл. 2

End of table 2

Источник аннотации Annotation source	Сигнальный путь Signal pathway	<i>p</i>	Число микроРНК Number of micro-RNAs	МикроРНК MicroRNA
miRWalk (Gene Ontology)	Связывание рецептора эстрогена (GO0030331) Estrogen receptor binding (GO0030331)	0,0000015	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Метаболический процесс активных форм кислорода (GO0072593) Reactive oxygen species metabolic process (GO0072593)	0,0000040	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Гуморальный иммунный ответ (GO0006959) Humoral immune response (GO0006959)	0,0000112	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Ответная реакция на вирус (GO0051607) Response to viruses (GO0051607)	0,0000167	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Рост клеток (GO0016049) Cell growth (GO0016049)	0,0000508	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Ответ на цитокиновый стимул (GO0034097) Response to cytokine stimulus (GO0034097)	0,0001080	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Старение клеток (GO0007569) Cell senescence (GO0007569)	0,0001620	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Wnt-сигнальный путь (GO0016055) Wnt signaling pathway (GO0016055)	0,0002480	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Взаимодействие с вирусом (GO0019048) Interaction with viruses (GO0019048)	0,0053569	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p

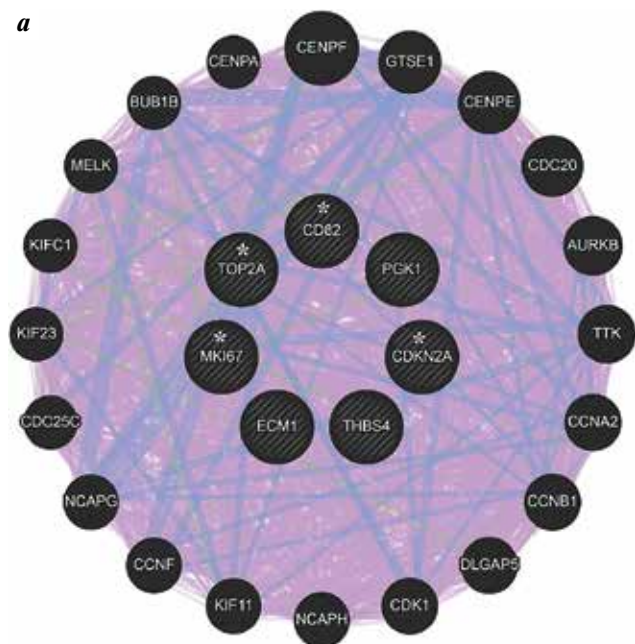
Таблица 3. Заболевания, ассоциированные с изменением экспрессии исследуемых микроРНК

Table 3. Disorders associated with changes in expression of the studied microRNAs

Источник аннотации Annotation source	Заболевание Disorder	<i>p</i>	Число микроРНК Number of microRNAs	МикроРНК MicroRNA
Diseases (miRWalk)	Аденокарцинома Adenocarcinoma	0,0031665	4	hsa-miR-145-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p
	Карцинома <i>in situ</i> Carcinoma <i>in situ</i>	0,0029936	2	hsa-miR-145-5p hsa-miR-21-5p
Diseases (MNR)	Аденовирусные инфекции Adenoviral infections	0,0000000	6	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p
	Инфекция вирусом гепатита С Hepatitis C viral infection	0,0000002	5	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p
	Опухоли Tumors	0,0000001	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Нарушение липидного обмена Lipid metabolism disorders	0,0000001	5	hsa-miR-145-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Новообразования шейки матки Cervical neoplasms	0,0000003	6	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p
	Рак эндометрия Endometrial cancer	0,0000028	5	hsa-miR-145-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Плоскоклеточный рак полости рта Oral squamous cell carcinoma	0,0000069	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p

циенток с CIS выявлено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение экспрессии генов *PGK1*, *THBS4*, *MKI67*, *TOP2A* и *CD82* в 2,0; 2,5; 5,0; 3,3 и 5,0 раза соответственно относительно контрольной группы (см. рис. 5).

Также необходимо отметить следующие статистически значимые (критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони, $p < 0,05$) изменения экспрессии генов: 1) снижение экспрессии гена *PGK1* в 3,4 раза в CIN3



■ Соэкспрессия / Co-expression
 ■ Солокализация / Co-localization
 ■ Генетическое взаимодействие / Genetic interaction

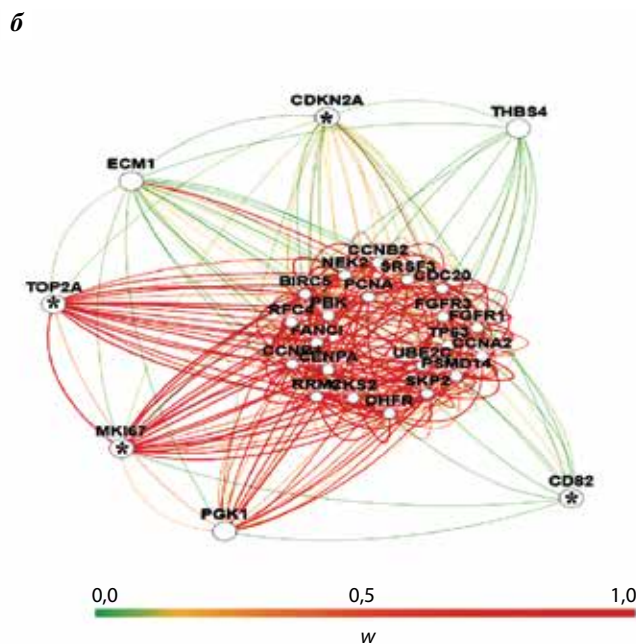


Рис. 4. Графическое представление функциональных сетей взаимосвязей между генами, а также силы этих взаимосвязей, рассчитанной с помощью алгоритма «сетевая интеграция с несколькими ассоциациями» (а) и алгоритма GIANT (б). *Гены-мишени микроРНК

Fig. 4. Graphic representation of functional connections between genes and their strength calculated using the network integration with several associations (а) and GIANT (б) algorithms. *MicroRNA target genes

Таблица 4. Сила взаимосвязей между генами, рассчитанная с помощью алгоритмов GIANT и «сетевая интеграция с несколькими ассоциациями»

Table 4. Strength of interactions between genes calculated using the GIANT and network integration with several associations algorithms

Ген 1 Gene 1	Ген 2 Gene 2	W**
CD82*	MKI67*	0,00786
CD82*	PGK1	0,00420
CD82*	CDKN2A*	0,02087
MKI67*	TOP2A*	0,91309
MKI67*	PGK1	0,30838
MKI67*	THBS4	0,01263
MKI67*	CDKN2A*	0,09281
TOP2A*	ECM1	0,04369
TOP2A*	CDKN2A*	0,06414
PGK1	ECM1	0,02685

*Гены-мишени микроРНК. **Среднее геометрическое значение W, рассчитанное с помощью алгоритмов GIANT и «сетевая интеграция с несколькими ассоциациями».

*MicroRNA target genes. **W geometric mean calculated using the GIANT and network integration with several associations algorithms.

относительно CIN1; 2) снижение экспрессии *CDKN2A* в 2,8 и 3,4 раза в CIN1 и CIS относительно CIN3; 3) снижение экспрессии *MKI67* в 14 раз в CIS относительно CIN3; 4) снижение экспрессии *TOP2A* и *CD82* в 17 и 9 раз в CIS относительно CIN2.

Таким образом, каждая степень CIN характеризовалась особым молекулярным профилем (табл. 5).

Обсуждение

Результаты проведенного исследования позволили выявить особенности экспрессии 7 мкРНК (miR-145, miR-196b, miR-34a, miR-20a, miR-21, miR-375 и miR-96) в CIN разной степени тяжести. Так, у пациенток с CIN1 экспрессия данных мкРНК носит разнонаправленный характер: повышена экспрессия miR-145, miR-34a, miR-20a и miR-375, снижена экспрессия miR-21 и не изменена экспрессия miR-196b и miR-96 относительно пациенток контрольной группы. У пациенток с CIN2 повышена экспрессия только miR-375, а экспрессия остальных мкРНК не изменена. У пациенток с CIN3 наблюдалось снижение экспрессии miR-196b и miR-34a, при том что экспрессия остальных мкРНК не изменена. У пациенток с CIS наблюдалось подавление экспрессии всех исследованных мкРНК в 2,5–5,0 раза относительно контрольной группы (см. табл. 5).

Результаты биоинформационного анализа показывают, что данные мкРНК вовлечены в регуляцию

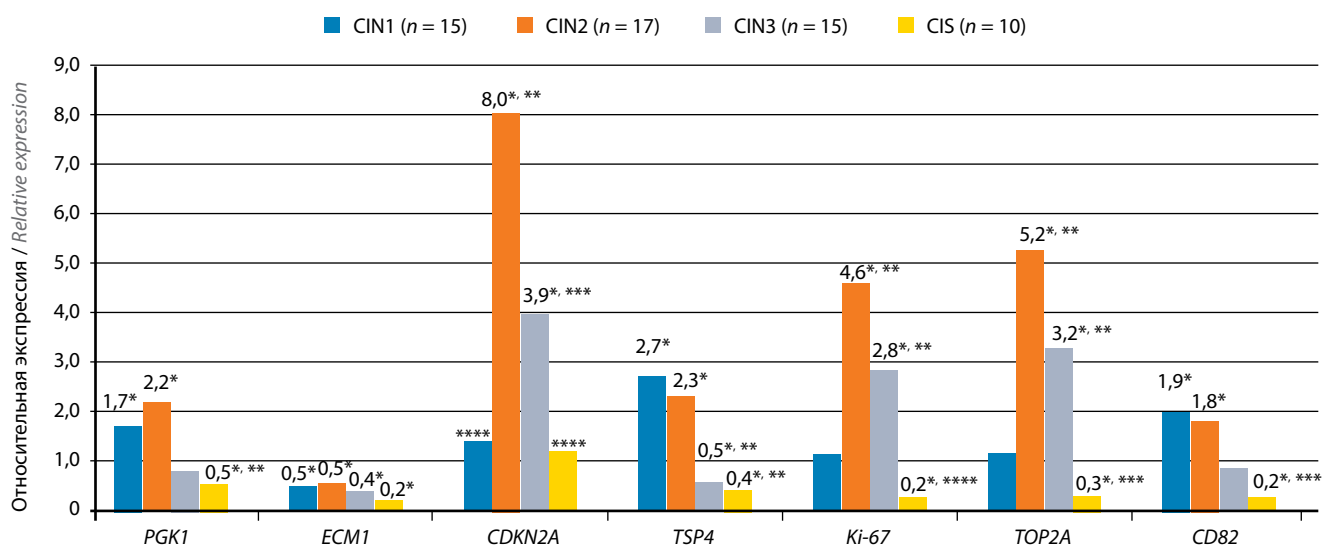


Рис. 5. Относительные уровни экспрессии матричной РНК (экспрессия генов) в тканях шейки матки с различной степенью диспластических повреждений эпителия. Статистически значимые различия показателей тканей шейки матки с различной степенью диспластических повреждений эпителия выявлены с помощью критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони: *относительно показателей эпителия без диспластических повреждений, $p < 0,005$; **относительно показателей CIN1, $p < 0,05$; ***относительно показателей CIN2, $p < 0,05$; ****относительно показателей CIN3, $p < 0,05$. CIN – цервикальная интраэпителиальная неоплазия; CIS – карцинома in situ

Fig. 5. Relative matrix RNA expression levels (gene expression) in cervical tissues with varying levels of dysplastic changes in the epithelium. Statistically significant differences in characteristics of cervical tissues with varying severity of dysplastic changes in the epithelium were identified using the Mann–Whitney test with Bonferroni correction: *relative to the epithelium without dysplastic changes, $p < 0.005$; **relative to CIN1, $p < 0.05$; ***relative to CIN2, $p < 0.05$; ****relative to CIN3, $p < 0.05$. CIN – cervical intraepithelial neoplasia; CIS – carcinoma in situ

Таблица 5. Молекулярный профиль цервикальных интраэпителиальных неоплазий разной степени тяжести

Table 5. Molecular profile of cervical intraepithelial neoplasias of varying severity

Степень тяжести Severity	miR-145	miR-196b	miR-34a	miR-20a	miR-21	miR-375	miR-96	CDKN2A	Ki-67	TOP2A	CD82	PGK1	TSP4	ECM1
CIN1	+	0	+	+	-	+	0	0	0	0	+	+	+	-
CIN2	0	0	0	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	-
CIN3	0	-	-	0	0	0	0	+	+	+	0	0	-	-
CIS	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-

Примечание. Относительно контрольной группы с эпителием без диспластических повреждений повышение экспрессии (+); отсутствие изменений (0); снижение экспрессии (-).

Note. Relative to the control group with epithelium without dysplastic changes: increased expression (+); no changes (0); decreased expression (-).

репарации ДНК, апоптоза, эпителиально-мезенхимального перехода, сигнальных путей MAPKK и Notch, регуляцию воспалительного ответа и дифференцировки эпителиальных клеток, регуляцию рецепции эстрогена и иммунного ответа, в том числе на вирусную инфекцию (см. табл. 2). Следует отметить, что на начальной стадии диспластических повреждений (CIN1) повышается экспрессия именно мкРНК (miR-145, miR-34a, miR-20a и miR-375), регулирующих иммунный ответ и взаимодействие с вирусом, в данном случае с ВПЧ.

Анализ базы данных MNDR (см. табл. 3) [19] показал, что мкРНК, изменяющие свою экспрессию в нашем исследовании, ассоциированы с новообразованиями шейки матки (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-196b-5p,

hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p) и вирусными инфекциями (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p). По данным базы miRWalk (см. табл. 3), 4 из исследованных мкРНК ассоциированы с развитием аденокарцином (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p), 2 мкРНК – с развитием CIS (hsa-miR-145-5p и hsa-miR-21-5p).

Полученные результаты согласуются с данными других авторов. Так, В. Li и соавт. исследовали экспрессию miR-34a в нормальном эпителии шейки матки, при CIN3 и РШМ с помощью ПЦР с обратной транскрипцией [20]. По их данным, экспрессия miR-34a была значительно снижена в группах CIN и РШМ по сравнению с нормальным эпителием. Авторы пришли

к выводу о том, что это начальное событие в развитии РШМ и miR-34a можно рассматривать как потенциальный молекулярный маркер для скрининга РШМ.

В ряде исследований также показана дифференциальная экспрессия miR-145, miR-20a, miR-21 [21, 22]. В 2013 г. M. Bierkens и соавт. обнаружили, что miR-375 снижает экспрессию при переходе от нормального эпителия к РШМ как в тканях, так и в клетках цитологических мазков [23].

Особый интерес представляет дифференциальная экспрессия мкРНК miR-21 [24]. Определение функции miR-21 было объектом для многих исследовательских групп в последние 10 лет. Она взаимодействует с большим количеством генов-мишеней и тонко реагирует на внеклеточные сигналы. Несмотря на то что miR-21 была признана ключевым регулятором процессов, вовлеченных в контроль пролиферации клеток, она также связана с ключевыми процессами и при воспалении. В отличие от других мкРНК miR-21 не просто характерна для провоспалительного или иммуносупрессивного статуса, но она действует как ключевой сигнал, опосредующий их баланс [25].

Однако имеющиеся в настоящее время данные (учитываются базы данных, публикации и собственные исследования) не позволяют объяснить биологический смысл обнаруженных нами разнонаправленных флуктуаций экспрессии мкРНК при CIN1–3 и CIS.

МикроРНК hsa-miR-196b-5p и hsa-miR-34a-5p таргетируют гены *CDKN2A*, *MKI67* и *TOP2A*, *CD82* соответственно. При этом общепринято [5], что повышение уровня мкРНК должно приводить к снижению уровня экспрессии гена-мишени и наоборот. МикроРНК hsa-miR-196b-5p снижает свою экспрессию у пациенток с CIN3 и CIS, при этом экспрессия *CDKN2A* и *MKI67* повышается только в подгруппе CIN3, а в CIS не изменяется либо снижается соответственно. Экспрессия мкРНК hsa-miR-34a-5p повышается при CIN1 и снижается у пациенток с CIN3 и CIS, при этом экспрессия *TOP2A* и *CD82* не изменяется и повышается при CIN1 соответственно, снижается у пациенток с CIS, у пациенток с CIN3 экспрессия *TOP2A* повышается, а *CD82* не изменяется, т. е. в полученных данных наблюдается неполное соответствие изменения экспрессии мкРНК и их эффекта на гены-мишени. Данный эффект можно объяснить множеством других молекулярных факторов, влияющих на транскрипционную активность генов, таких как изменение копийности генов, метилирование и изменение уровня длинных некодирующих РНК [5, 26].

Тем не менее у 7 генетических локусов (*CDKN2A*, *MKI67*, *TOP2A*, *CD82*, *PGK1*, *THBS4* и *ECM1*), выбранных на основе биоинформационного анализа, выявлено изменение экспрессии у пациенток с CIN разной степени тяжести относительно пациенток без неоплазий.

Так, для гена *ECM1* обнаружено снижение транскрипционной активности при неоплазиях всех степе-

ней тяжести (CIN1–3 и CIS). *ECM1* (Extracellular Matrix Protein 1) кодирует белок, стимулирующий пролиферацию эндотелиальных клеток и способствующий ангиогенезу. В настоящее время показано, что *ECM1* играет важную роль при РШМ, регулируя активацию эпителиально-мезенхимального перехода [27]. Обнаруженное изменение экспрессии, возможно, отражает компенсаторный ответ ткани, снижающий рост кровеносных сосудов в очаге поражения.

Ген *CDKN2A*, не изменяющий свою экспрессию при CIN1 и CIS, но гиперэкспрессированный при CIN2, 3, кодирует белки p16INK4A и p14ARF. Оба действуют как опухолевые супрессоры, регулируя клеточный цикл: p16INK4A ингибирует циклинзависимые киназы 4 и 6, p14ARF активирует супрессор опухоли p53. Поэтому гиперэкспрессия при CIN2, -3 также может быть компенсаторным механизмом, направленным на подавление развития вирусассоциированной опухоли.

Ген *TSP4*, гиперэкспрессированный при CIN1, 2 и гипоекспрессированный при CIN3 и CIS, кодирует адгезивный гликопротеин, который опосредует межклеточные взаимодействия и участвует в различных процессах, включая клеточную пролиферацию, миграцию, адгезию и прикрепление, воспалительный ответ на повреждение, регуляцию воспаления и ремоделирования. *TSP4* связывается с белками структурного внеклеточного матрикса и модулирует в ответ на повреждение ткани, способствуя адаптивному ремоделированию [28]. Соответственно, при CIN1, 2 повышение экспрессии данного гена может быть адаптивным ответом на повреждение, а снижение при CIN3 и CIS может отражать нарушение межклеточных взаимодействий, происходящих при формировании неоплазий.

Ген *CD82* кодирует мембранный гликопротеин, экспрессия которого подавляется при прогрессии опухолей. Снижение его экспрессии наблюдается при РШМ и в других исследованиях и ассоциировано с плохой выживаемостью больных [29].

Ген *PGK1* кодирует гликолитический фермент (фосфоглицераткиназу), который катализирует превращение 1,3-дифосфоглицерата в 3-фосфоглицерат (образование АТФ при аэробном гликолизе). Помимо регуляции клеточного метаболизма *PGK1* участвует во множестве биологических процессов, включая ангиогенез, аутофагию и репарацию ДНК. Из-за своих многогранных функций роль *PGK1* в развитии рака является неоднозначной. Высокая внутриклеточная экспрессия *PGK1* приводит к пролиферации опухолевых клеток. При этом высокая внеклеточная экспрессия *PGK1* подавляет рост злокачественных опухолей за счет остановки ангиогенеза [30].

Ген *MKI67*, гиперэкспрессированный при CIN2, 3 и гипоекспрессированный при CIS, кодирует белок, который предотвращает коллапс хромосом в единую массу хроматина, образуя барьер стерического и электростатического заряда: белок обладает высоким

суммарным электрическим зарядом и действует, как поверхностно-активное вещество, диспергируя хромосомы и обеспечивая независимую подвижность хромосом. Заболевания, ассоциированные с гиперэкспрессией *MKI67*, включают неоплазии шейки матки. При РШМ показатель экспрессии *MKI67* используется в качестве маркера индекса пролиферации злокачественных клеток, связанного со специфическими характеристиками опухоли, но не в качестве прогностического фактора выживания или рецидива заболевания [31].

TOP2A (DNA topoisomerase 2-alpha) кодирует ДНК-топоизомеразу, фермент, который контролирует и изменяет топологические состояния ДНК во время транскрипции, играет важную роль в регулировании продолжительности периода транскрипционных колебаний. Повышенная экспрессия *TOP2A* была выявлена при РШМ с использованием различных высоко-

производительных технологий профилирования экспрессии. Также было показано, что *TOP2A* был гиперэкспрессирован в клетках и тканях шейки матки с повышенной экспрессией белков E6/E7 ВПЧ [32]. Дисбаланс в транскрипционной активности *TOP2A*, наблюдаемый при CIN2, 3 и CIS, может привести к аномальному течению процесса митоза.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование позволило установить, что каждая степень CIN характеризуется своим особым молекулярным профилем — дифференциальной экспрессией мкРНК, их геномишней и ассоциированных с ними в общих сигнальных путях генов. Это позволяет рассматривать эти гены и мкРНК в качестве потенциальных маркеров как предраковых состояний, так и процесса перехода интраэпителиальных неоплазий в CIS.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019;144(8):1941–53. DOI: 10.1002/ijc.31937.
2. Bosch F.X., Broker T.R., Forman D. et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine* 2013;31(7):1–31. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.10.003.
3. McCreddie M.R., Paul C., Sharples K.J. et al. Consequences in women of participating in a study of the natural history of cervical intraepithelial neoplasia 3. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2010;50(4):363–70. DOI: 10.1111/j.1479-828X.2010.01170.x.
4. Доброхотова Ю.Э., Боровкова Е.И. Международные алгоритмы ведения пациенток с дисплазией шейки матки. *Гинекология* 2018;20(5):27–32. DOI: 10.26442/2079-5696_2018.5.27-32. [Dobrokhotova Yu.E., Borovkova E.I. International algorithms for the management of patients with uterine cervical dysplasia. *Ginekologiya = Gynecology* 2018;20(5):27–32. (In Russ.)].
5. Димитриади Т.А., Бурцев Д.В., Дженкова Е.А., Кутилин Д.С. МикроРНК как маркеры прогрессирования предраковых заболеваний в рак шейки матки. *Современные проблемы науки и образования* 2020;1. Доступно по: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29529> (дата обращения 29.05.2020). DOI: 10.17513/spno.29529. [Dimitriadi T.A., Burtsev D.V., Dzhenkova E.A., Kutilin D.S. MicroRNA as markers of pre-cancer diseases progression in cervical cancer. *Sovremennye problem nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education* 2020;1. Available at: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29529> (accessed 29.05.2020). (In Russ.)].
6. Wilting S.M., Steenberg R.D., Tijssen M. et al. Chromosomal signatures of a subset of high-grade premalignant cervical lesions closely resemble invasive carcinomas. *Cancer Res* 2009;69(2):647–55. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2478.
7. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006;1(2):581–5. DOI: 10.1038/nprot.2006.83.
8. Кутилин Д.С., Никитин И.С., Кит О.И. Особенности экспрессии генов некоторых транскрипционных факторов при малигнизации тканей тела матки. *Успехи молекулярной онкологии* 2019;6(1):57–62. DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-57-62. [Kutilin D.S., Nikitin I.S., Kit O.I. Features of some transcription factors gene expression in the malignancy tissues of the corpus uteri. *Uspekhii molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(1):57–62. (In Russ.)].
9. Balcells I., Cirera S., Busk P.K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol* 2011;11(1):70. DOI: 10.1186/1472-6750-11-70.
10. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3(7):research0034. DOI:10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
11. Peltier H.J., Latham G.J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 2008;14(5):844–52. DOI: 10.1261/rna.939908.
12. Shen Y., Li Y., Ye F. et al. Identification of miR-23a as a novel microRNA normalizer for relative quantification in human uterine cervical tissues. *Exp Mol Med* 2011;43(6):358–66. DOI: 10.3858/emmm.2011.43.6.039.
13. Кутилин Д.С., Димитриади С.Н., Водолажский Д.И. и др. Влияние тепловой ишемии-реперфузии на экспрессию апоптоз-регулирующих генов в почечной ткани больных с почечно-клеточным раком. *Нефрология* 2017;21(1):80–6. DOI:10.24884/1561-6274-2017-21-1-80-86. [Kutilin D.S., Dimitriadi S.N., Vodolazhsky D.I. et al. Effect of thermal ischemia-reperfusion on expression of apoptosis-regulating genes in the renal tissue of patients with renal cell carcinoma. *Nefrologiya = Nephrology* 2017;21(1):80–6. (In Russ.)].
14. Jones E., Oliphant E., Peterson P. SciPy: open source scientific tools for python, 2001. Available at: <http://www.scipy.org/>.
15. Ding J., Li X., Hu H. TarPmiR: a new approach for microRNA target site prediction. *Bioinformatics* 2016;32(18):2768–75. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw318.

16. Backes C., Khaleeq Q.T., Meese E., Keller A. miEAA: microRNA enrichment analysis and annotation. *Nucleic Acids Res* 2016;44(W1):W110–6. DOI: 10.1093/nar/gkw345.
17. Greene C.S., Krishnan A., Wong A.K. et al. Understanding multicellular function and disease with human tissue-specific networks. *Nat Genet* 2015;47(6):569–76. DOI: 10.1038/ng.3259.
18. Кутилин Д.С., Кошелева Н.Г., Гусарева М.А. и др. Копийность генов как фактор радиорезистентности клеток аденокарциномы толстой кишки линии HT-29. Современные проблемы науки и образования 2019;5. Доступно по: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29224> (дата обращения 22.05.2020). DOI: 10.17513/spno.29224. [Kutulin D.S., Kosheleva N.G., Gusareva M.A. et al. Gene copy number variation as a factor of radioresistance of colon adenocarcinoma cells of the line HT-29. *Sovremennye problem nauki i obrazovaniya* = Modern Problems of Science and Education 2019;5. Available at: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29224> (accessed 22.05.2020). (In Russ.)].
19. Wang Y., Chen L., Chen B. et al. Mammalian ncRNA-disease repository: a global view of ncRNA-mediated disease network. *Cell Death Dis* 2013;4(8):e765. DOI: 10.1038/cddis.2013.292.
20. Li B., Hu Y., Ye F. et al. Reduced miR-34a expression in normal cervical tissues and cervical lesions with high-risk human papillomavirus infection. *Int J Gynecol Cancer* 2010;20(4):597–604. DOI: 10.1111/IGC.0b013e3181d63170.
21. Shishodia G., Shukla S., Srivastava Y. et al. Alterations in microRNAs miR-21 and let-7a correlate with aberrant STAT3 signaling and downstream effects during cervical carcinogenesis. *Mol Cancer* 2015; 14:116. DOI: 10.1186/s12943-015-0385-2.
22. Li Y., Wang F., Xu J. et al. Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29. *J Pathol* 2011;224(4):484–95. DOI: 10.1002/path.2873.
23. Bierkens M., Krijgsman O., Wilting S.M. et al. Focal aberrations indicate EYA2 and hsa-miR-375 as oncogene and tumor suppressor in cervical carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 2013;52(1): 56–68. DOI: 10.1002/gcc.22006.
24. Zeng K., Zheng W., Mo X. et al. Dysregulated microRNAs involved in the progression of cervical neoplasm. *Arch Gynecol Obstet* 2015;292(4):905–13. DOI: 10.1007/s00404-015-3702-5.
25. Sheedy F.J. Turning 21: induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. *Front Immunol* 2015;6:19. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00019.
26. Колесников Е.Н., Максимов А.Ю., Кит О.И., Кутилин Д.С. Зависимость общей и безрецидивной выживаемости больных от молекулярно-генетического подтипа плоскоклеточного рака пищевода. *Вопросы онкологии* 2019;65(5):691–700. [Kolesnikov E.N., Maksimov A.Yu., Kit O.I., Kutulin D.S. Dependence of overall and relapse-free patients survival from molecular genetic subtype of esophageal squamous cell cancer. *Voprosy onkologii* = Problems in Oncology 2019;65(5):691–700. (In Russ.)].
27. Gan L., Meng J., Xu M. et al. Extracellular matrix protein 1 promotes cell metastasis and glucose metabolism by inducing integrin β /FAK/SOX2/HIF-1 α signaling pathway in gastric cancer. *Oncogene* 2018;37(6):744–55. DOI: 10.1038/onc.2017.363.
28. Martin C.M., Astbury K., McEvoy L. et al. Gene expression profiling in cervical cancer: identification of novel markers for disease diagnosis and therapy. *Methods Mol Biol* 2009;511:333–59. DOI: 10.1007/978-1-59745-447-6_15.
29. Zhou X.L., Wang M. Expression levels of survivin, Bcl-2, and KAI1 proteins in cervical cancer and their correlation with metastasis. *Genet Mol Res* 2015;14(4):17059–67. DOI: 10.4238/2015.December.16.6.
30. He Y., Luo Y., Zhang D. et al. PGK1-mediated cancer progression and drug resistance. *Am J Cancer Res* 2019;9(11):2280–302.
31. Li H., Shen H., Xu Q. et al. Expression of Pin1 and Ki67 in cervical cancer and their significance. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2006;26(1):120–2. DOI: 10.1007/BF02828056.
32. Xu Z., Zhou Y., Shi F. et al. Investigation of differentially-expressed microRNAs and genes in cervical cancer using an integrated bioinformatics analysis. *Oncol Lett* 2017;13(4):2784–90. DOI: 10.3892/ol.2017.5766.

Вклад авторов

Т.А. Димитриади: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа;
 Д.В. Бурцев: обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа;
 Е.А. Дженкова: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи;
 Д.С. Кутилин: анализ полученных данных (включая статистический), написание текста рукописи.

Authors' contributions

T.A. Dimitriadi: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme, obtaining data for analysis;
 D.V. Burtsev: reviewing of publications of the article's theme, obtaining data for analysis;
 E.A. Dzhenkova: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme;
 D.S. Kutulin: analysis of the obtained data (including statistical), article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Дженкова / E.A. Dzhenkova: <https://orcid.org/0000-0002-3561-098X>
 Д.С. Кутилин / D.S. Kutulin: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России. Протокол № 4 от 20.03.2019.

Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee National Medical Research Center for Oncology. Protocol No 4 dated 20.03.2019. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 29.05.2020. Принята к публикации: 21.07.2020.

Article submitted: 29.05.2020. Accepted for publication: 21.07.2020.

К 100-летию юбилею Ирины Николаевны Крюковой, доктора биологических наук, заслуженного работника здравоохранения Российской Федерации (1920–2013)

Ирина Николаевна Крюкова родилась 18 июня 1920 г. в г. Москве в семье врачей. Ее мать, Александра Петровна, была педиатром, отец, Николай Иванович Латышев, – военным врачом Ташкентского госпиталя. Позже они увлеченно занимались медицинской паразитологией, и Н.И. Латышев стал известным ученым, членом-корреспондентом Академии медицинских наук СССР.

Закончив классическую гимназию на Таганке, Ирина Николаевна Крюкова поступила на биологический факультет Московского университета, и ее выпускной курс совпал с началом Великой Отечественной войны. К этому времени Ирина Николаевна уже успела поработать лаборантом на кафедрах университета. С сентября 1941 г. она 3 года трудилась в нескольких подмосковных эвакуационных госпиталях. Огромный поток раненых, бесчисленные анализы и тревожные ночи, проведенные за просмотром препаратов под портативным микроскопом, были для нее неоценимым опытом, который так пригодился в становлении будущего экспериментатора с незаурядным кругозором и научной интуицией. Оригинальность и яркость мышления, упорство в достижении целей отличали Ирину Николаевну в течение всей ее долгой и плодотворной научной деятельности, которая началась под руководством Л.А. Зильбера в отделе иммунологии и вирусологии Института микробиологии и эпидемиологии им. Н.Ф. Гамалеи.

Атмосфера, царившая в то время в отделе, хорошо описана в книге академика Г.И. Абелева «Очерки научной жизни»: «При Л.А. Зильбере все группы и сотрудники его отдела замыкались прямо на него... и он старался руководить



и направлять их работу, контролируя все до деталей. Взаимодействие между институтскими лабораториями шло на всех уровнях и по всем каналам. Было обычным делом обмениваться реактивами, экспериментальными животными и даже приборами. Освоенные новые методы быстро становились достоянием всех заинтересованных лабораторий, которые были открыты для стажировки или совместной работы. Доминирующими среди сотрудников и руководителей были уважительные и дружеские отношения». В эти годы Ирина Николаевна увлеченно работала под руководством Л.А. Зильбера над проблемой патогенности для млекопитающих вируса куриной саркомы Рауса (RSV). Ей вместе с другими молодыми исследователями удалось доказать видовую неспецифичность этого вируса, о чем свидетельствует диплом на открытие № 53 Государственного реестра открытий СССР, полученный ими в 1957 г. Развернутое изучение этой проблемы было продолжено уже после смерти Л.А. Зильбера, когда его отдел возглавил Г.И. Абелев.

И.Н. Крюковой с ее учениками, среди которых были будущие доктора наук И.Б. Обух и А.В. Гудков, были выделены и детально проанализированы варианты RSV, высокоонкогенного для клеток млекопитающих. Цикл их работ стал весомым вкладом в мировую вирусологию.

В 1977 г. возглавляемый Г.А. Абелевым отдел перевели в Онкологический научный центр АМН СССР. С этого момента по 1988 г. доктор биологических наук И.Н. Крюкова бесценно руководила лабораторией иммунологии онкогенных вирусов, созданной на базе Центра.

С работой в Научно-исследовательском институте канцерогенеза Всесоюзного онкологического научного центра АМН (впоследствии РОНЦ РАМН) связан еще один плодотворный этап научной биографии И.Н. Крюковой. Она была вдохновителем большой и важной работы по выявлению дефектных копий эндогенных вирусов С-типа у безлейкозных кур в экспериментальном питомнике ВОНЦ АМН. Доктором биологических наук А.В. Гудковым, ныне успешно работающим в США, в вирусных геномах были впервые выявлены и описаны нуклеотидные последовательности, ассоциированные с репликацией вирусного генома. Под руководством И.Н. Крюковой продолжались пионерские исследования профессора К.В. Ильина с описанными в 1972 г. и родственными вирусом Мазон–Пфайзера ретровирусами типа D, которые были выделены в лаборатории из клеток рака гортани человека линии HEr-2. Изучением структуры вирусов типа D и их ассоциации с лимфоаденопатиями и иммунодефицитными состояниями у детей с T- и B-клеточными лимфомами в лаборатории активно

занимались К.В. Ильин, доктор биологических наук В.А. Морозов и их многочисленные ученики.

Наконец, И.Н. Крюковой и ее сотрудникам, выросшим в стенах лаборатории иммунологии онкогенных вирусов, принадлежит уникальный цикл работ по биологии и иммунологии вируса рака молочной железы мышей (MMTV). Позже у больных раком молочной железы были выявлены антитела к белкам оболочки MMTV, исследована их природа и молекулярная структура.

Ирина Николаевна всегда живо интересовалась современными методами исследования, участвовала в научных семинарах, конференциях и конгрессах. Она посетила ряд ведущих лабораторий в странах Европы и США, в которых занимались изучением ретровирусов человека. Благодаря блестящей эрудиции, свободному владению английским и личному обаянию у Ирины Николаевны повсюду находились единомышленники, между исследователями возникали хорошие отношения и развивалось плодотворное сотрудничество. В архиве И.Н. Крюковой сохранились многочисленные письма, монографии с дарственными надписями, копии статей, включая публикации ее учеников, многие из которых оказались в зарубежных лабораториях и успешно там работают, например профессор А.В. Гудков, Е. Комарова, Т.В. Головкина и А.И. Червонский, С.В. Литвинов, П.Б. Махов и др. Ирине Николаевне удалось воспитать целую плеяду талантливых исследователей, которые развивают новые научные направления. Она всегда искренне радовалась успехам своих учеников и коллег.

В последние 15 лет работы в лаборатории иммунологии онкогенных вирусов и позже – в лаборатории онкогеномики И.Н. Крюкова продолжала участвовать в экспериментах, получала гранты Российского фонда фундаментальных исследований, обучала приемам работы стажеров и студентов, которые массово приходили в лабораторию во время

практики. Она была соавтором принципиальных исследований структуры и происхождения гомологичных MMTV антигенов и кодирующих их нуклеотидных последовательностей, обнаруженных в ткани рака молочной железы и в крови пациентов с раком молочной железы, а также у небольшого числа здоровых людей. В ходе этих исследований выяснились причины дефектности обнаруженных у человека вирусных частиц с высокой гомологией MMTV (hMTV) – небольшая делеция в гене, кодирующем коровый белок вируса, вследствие которой прерывается трансляция провирусной мРНК. В лаборатории были разработаны методы выделения гликопротеинов вирусной оболочки с помощью магнитных частиц, конъюгированных с соответствующими антителами, что позволило эффективно анализировать клинические образцы крови и биопсийный материал. Впервые была доказана экзогенная природа gp52-кодирующих и других провирусных последовательностей, гомологичных MMTV, а также исследованы закономерности и частота встречаемости этих последовательностей у больных раком молочной железы, пациентов с сочетанными опухолями и когорты здоровых лиц. Была доказана возможность горизонтальной передачи вирусного генома при кокультивировании MMTV-продуцирующих клеток с клетками эпителия зародышевой почки человека.

Этот этап научной деятельности И.Н. Крюковой совпал с непростыми условиями, реформированием лаборатории и онкоцентра. Однако природный оптимизм и умение ясно определять цели и средства для их достижения помогли сохранить научный потенциал и взаимовыручку, теплые человеческие отношения между сотрудниками. Организованность и сила воли в сочетании с прекрасным чувством юмора, артистичностью и умением увидеть суть проблемы всегда выручали Ирину Николаевну в непростых жизненных ситуациях, которых было немало в ее насыщенной, яркой и де-

ятельной жизни. Это помогло ей сохранить ясность ума и желание работать вплоть до 87 лет, когда она ушла из лаборатории на заслуженный отдых. Однако перемена образа жизни не помешала ей интересоваться научной литературой, «освежить» свой французский и читать классиков в оригинале, писать яркие мемуары, часть которых удалось опубликовать в журнале «Наука и жизнь». В свои 93 года она сохранила в памяти множество событий в научной и личной жизни и как незаурядный ученый могла четко определить причины и последствия, проследить логику процесса и предвидеть итог.

Светлая память о замечательном исследователе, очаровательной и талантливой женщине, прекрасной супруге, матери и бабушке навсегда останется в сердцах тех, кому посчастливилось работать и общаться с Ириной Николаевной.

Научные идеи И.Н. Крюковой продолжают развивать ее многочисленные ученики, которые усвоили также и ее требовательное отношение к работе, оригинальные методические приемы, организованность и четкость в планировании экспериментов. Будучи ученицей Л.А. Зильбера, сотрудницей выдающихся исследователей отечественной школы вирусологов и иммунологов, Ирина Николаевна сумела не только продолжить их дело, но и сохранить традиционно высокий научный уровень, поддерживать новые направления, связанные с молекулярно-генетическими исследованиями вирусов, вовлеченных в канцерогенез.

*А.А. Лушникова
(НИИ канцерогенеза
ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России)*

Статья поступила: 29.05.2020.

Принята к публикации: 01.07.2020.

Article submitted: 29.05.2020.

Accepted for publication: 01.07.2020.